

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

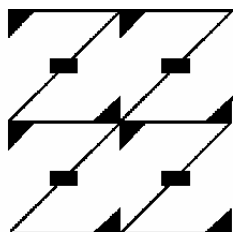
Efecto relajante en el músculo liso traqueal de extractos y
productos naturales derivados de plantas medicinales
utilizadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MATEO MAJIN LEÓN



LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASINADO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Presidente:	Dr. Andrés Navarrete Castro
Vocal:	M. en C. Ma. Martha Ugalde Hernández
Secretario:	Q.F.B. Esperanza Jiménez Castañeda
1 er. Suplente:	M. en C. José Luis Balderas López
2º. Suplente:	Dra. Patricia García López

Lugar donde se desarrollo el proyecto:

Laboratorio 126, Conjunto E del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Director de tesis: Dr. Andrés Navarrete Castro

Asesor de tesis: M. en C. Ma. Martha Ugalde Hernández

Sustentante: Mateo Majin León



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno MAJIN LEÓN MATEO con número de cuenta 40101253-8 de la carrera de Q. F. B. se le ha fijado el día 26 del mes de noviembre de 2007 a las 15:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
VOCAL M. en C. MA. MARTHA UGALDE HERNÁNDEZ
SECRETARIO Q.F.B. ESPERANZA JIMÉNEZ CASTAÑEDA
SUPLENTE M. en C. JOSÉ LUIS BALDERAS LÓPEZ
SUPLENTE DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ

Handwritten signatures of the jury members on horizontal lines.

El título de la tesis que se presenta es : Efecto relajante en el músculo liso traqueal de extractos y productos naturales derivados de plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias

Opción de titulación: Tesis Experimental

ATENTAMENTE "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU" México, D.F. a 18 de octubre de 2007.

C. D. ALFREDO SALVADOR SÁNCHEZ FIGUEROA DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA DIRECCION

RECIBI: OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

Vo.Bo. DRA. MARTHA ASUNCIÓN SÁNCHEZ RODRÍGUEZ JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

Agradecimientos

El presente trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado por la Dirección General de Asuntos de Personal Académico a través del proyecto DGAPA IN 201506 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto CONACyT C01-18.

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México.**

Por la formación académica en la FES Zaragoza y a cada uno de mis profesores les agradezco las enseñanzas obtenidas.

Al **Dr. Andrés Navarrete Castro.**

Por su apoyo, comprensión, por sus conocimientos transmitidos en la realización de este trabajo. Por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.

A la **M. en C. Martha Ugalde Hernández**

Por el apoyo y confianza que me brindo para poder realizar este trabajo.

A mis **Compañeros del laboratorio 126. José Luis Balderas, Alejandro Alfaro y Norma Gutiérrez**

Por su apoyo moral y por los momentos divertidos que pasamos los cuales los llevo conmigo.

A mis **Sinodales**

Por su tiempo brindado para la revisión de esta tesis.

Dedicatoria

A Dios.

Por haberme dado la oportunidad de vivir, a lado de una familia muy bonita, por poner en mi camino las fuerza necesarias para ser mejor cada día, por darme la bendición de cada día y nunca dejarme solo.

A mi Madre.

Por haberme dado la vida, por el infinito amor que me has demostrado, por la enorme paciencia que has tenido, por tu apoyo moral que tanta falta me hizo, por la comprensión a lo largo de mi carrera. Esta meta que he alcanzado es gracias a ti. Te quiero mucho.

A la memoria de mi Padre.

Porque desde pequeño has sido para mi un hombre grande y maravilloso, y que siempre he admirado. Donde quiera que te encuentres te doy gracia por que siempre has estado conmigo y seguirás estando en mi corazón.

A mi Hermanos.

Le doy gracias a Dios por la vida de cada uno de ustedes y por haberme permitido compartir sus experiencias, cariño, amor y comprensión.

A la Familia Osorio Hernández.

Por permitirme ser parte de sus vidas, por su apoyo incondicional y sobre todo por su amistad.

Una dedicatoria especial a *Virginia Osorio Hernández*

Gracias por que nunca dejaste de creer en mí a pesar de las adversidades, gran parte de este logro ha sido por que siempre has permanecido a mi lado en las buenas y en las malas pero sobre todo, mil gracias por tu amor. Te Amo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. FUNDAMENTO TEÓRICO	4
2.1. Asma bronquial	4
2.1.1. El asma como enfermedad inflamatoria	5
2.1.2. Tratamiento del asma	6
2.1.2.1. Broncodilatadores	8
2.1.2.2. Adrenérgicos	9
2.1.2.3. Metilxantina	10
2.1.2.4. Glucocorticoides	11
2.1.2.5. Anticolinérgicos	12
2.1.2.6 Anti-leucotrienos	13
2.2. Generalidades de la <i>Bougainvillea sp</i>	15
2.2.1. Descripción	15
2.2.2. Compuestos químicos	16
2.2.3. Acción biológica	18
2.3. Otras plantas utilizadas para enfermedades respiratorias en México	19
2.3.1. Saúco (<i>Sambucus mexicana</i>)	19
2.3.2. Poleo (<i>Mentha pulegium</i>)	21
2.3.3. Toronjil morado (<i>Agastache mexicana</i>)	22
2.3.4. Axocopaque (<i>Gaultheria procumbens</i>)	22
2.3.5. Axihuitl (<i>Eupatorium aschenbornianum</i>)	23

2.4. Modelo de tráquea de cobayo	26
2.5. Interacciones de los fármacos	26
2.5.1. Tipos de interacciones	27
2.5.2. Estudio de las interacciones	28
2.6 Análisis Isobolográfico	28
2.6.1. Aplicaciones y ventajas del análisis	28
2.6.2. Fundamento y bases estadísticas para el análisis	29
III. JUSTIFICACIÓN	35
IV. OBJETIVOS	36
4.1. Objetivos generales	36
4.2. Objetivos particulares	36
V. HIPÓTESIS	37
VI. MATERIAL Y MÉTODO	38
6.1. Material vegetal	38
6.2. Fármacos	38
6.3. Preparación de los extractos y aceites esenciales	38
6.3.1. Extractos	38
6.3.2. Preparación de la infusión de <i>Bougainvillea sp</i>	39
6.3.3. Obtención de los aceites esenciales	40
6.3.4. Análisis de los aceites esenciales	40
6.3.5. Separación por cromatografía en columna del extracto hexánico de <i>Bougainvillea sp</i>	41
6.4. Animales	41

6.5. Disección de la tráquea y montaje de la preparación	42
6.6. Evaluación del efecto relajante de los productos naturales y fármacos	42
6.7. Determinación de las curvas dosis-respuesta	43
6.8. Análisis de la interacción	44
6.8.1. Análisis estadístico	45
6.8.2. Representación gráfica de la interacción	47
VII. RESULTADOS	49
VIII. DISCUSIÓN	68
IX. CONCLUSIONES	72
X. PERSPECTIVAS	73
XI. BIBLIOGRAFÍA	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de los fármacos adrenérgicos	10
Figura 2. Estructuras de las metilxantina y aminofilina	11
Figura 3. Estructura de dos anticolinérgicos	13
Figura 4. <i>Bougainvillea sp</i>	15
Figura 5. Isoblograma	29
Figura 6. Efecto relajante de los extractos de <i>Bougainvillea sp</i> en tráquea aislada de cobayo	49
Figura 7. Efecto relajante de las fracciones del extracto hexánico de <i>Bougainvillea sp</i> en tráquea aislada de cobayo	47
Figura 8. Efecto relajante de los extractos diclorometano/metanol (1:1) poleo, toronjil morado y saúco en tráquea aislada de cobayo	51
Figura 9. Efecto relajante de los aceites esenciales en tráquea aislada de cobayo	52
Figura 10. Cromatograma de gases del aceite esencial de Axocopaque (<i>Gautheria procumbrens</i>)	54
Figura 11. Espectro de masas del salicilato de metilo del aceite de axocopaque	55

Figura 12. Espectro de masas del salicilato de metilo de la Biblioteca NIST versión 2.0	55
Figura 13. Cromatograma de gases del aceite esencial de toronjil morado (<i>Agastache mexicana</i>)	55
Figura 14. Espectros de masas de limoneno del aceite de toronjil morado	56
Figura 15. Espectro de masas de limoneno de la Biblioteca NIST versión 2.0	56
Figura 16. Espectro de masa de anisol del aceite de toronjil morado	57
Figura 17. Espectro de masas de anisol de la Biblioteca NIST versión 2.0	57
Figura 18. Cromatograma de gases del aceite esencial de Axihitl (<i>Eupatorium aschenbornianum</i>)	57
Figura 19. Efecto relajante de bromuro de ipratropio, salbutamol y berberina	58
Figura 20. Efecto relajante de fármacos y extracto diclorometano/metanol de <i>Bougainvillea sp</i> en forma individual y en combinación 3:1, 1:1, 1:3	60
Figura 21. Efecto relajante del salbutamol y berberina en forma individual y en combinación 3:1, 1:1 y 1:3	61
Figura 22. Efecto relajante del salbutamol y bromuro de ipratropio en forma individual y en combinación 3:1, 1:1 y 1:3	62

Figura 23. Isoblograma de la interacción del salbutamol y el extracto diclorometano/methanol (1:1) de <i>Bougainvillea sp</i> en proporciones 3:1, 1:1 y 1:3	64
Figura 24. Isoblograma de la interacción de salbutamol y berberina en proporciones 3:1, 1:1 y 1:3	65
Figura 25. Isoblograma de la interacción de salbutamol con bromuro de ipratropio en combinaciones 3:1, 1:1 y 1:3	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Mediadores del proceso inflamatorio provenientes de células cebadas	7
Cuadro 2. Células y mediadores durante la inflamación asmática	8
Cuadro 3. Compuestos químicos de las brácteas de Bugambilia	16
Cuadro 4. Betacianinas de la <i>Bougainvillea glabra</i>	17
Cuadro 5. Compuestos de <i>Sambucus nigra</i>	20
Cuadro 6. Compuestos de <i>Eupatorium aschenbornianum</i> con actividad antimicrobiana	25
Cuadro 7. Concentraciones utilizadas para evaluar el efecto relajante de fármacos y productos naturales en la combinación	46
Cuadro 8. Valores de las CE ₅₀ de las sustancias evaluadas	53
Cuadro 9. Valores de Z _{ad} y Z _{exp} ± EEM para la administración conjunta de salbutamol con fármacos y extractos relajantes del músculo liso traqueal en diferentes proporciones	59

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto relajante sobre el músculo liso traqueal de cobayo de los extractos de bugambilia (*Bougainvillea sp*), saúco (*Sambucus mexicana*), poleo (*Mentha pulegium*), toronjil morado (*Agastache mexicana*); de los aceites esenciales de axocopaque (*Gaultheria procumbens*) y axihuitl (*Eupatorium aschenbornianum*) a las concentraciones de 31.6, 56.2, 100.0, 177.0, 316.0, 562.0 $\mu\text{g/mL}$. También se evaluó el efecto relajante de la berberina (10, 17.7, 31.6, 56.2, 100, 177 y 316 $\mu\text{g/mL}$), compuesto relajante aislado de chicalote (*Argemone ochroleuca*) y de los fármacos bromuro de ipratropio (7.3×10^{-5} , 4.1×10^{-4} , 7.3×10^{-4} , 1.3×10^{-3} , 2.3×10^{-3} $\mu\text{g/mL}$) y salbutamol (2.39×10^{-4} , 2.39×10^{-3} , 0.023, 0.23, 2.39 $\mu\text{g/mL}$). Adicionalmente se realizó el análisis isobolográfico de la interacción entre el extracto de diclorometano/metanol (1:1) de bugambilia con salbutamol, entre bromuro de ipratropio con salbutamol y entre berberina con salbutamol en las proporciones 3:1, 1:1 y 1:3. Encontrándose que los extractos y aceites esenciales tienen actividad relajante sobre el músculo liso de tráquea de cobayo. El efecto relajante de salbutamol se potenció al administrarlo junto con los extractos de bugambilia en las tres proporciones evaluadas, así como también con bromuro de ipratropio a las proporciones 3:1 y 1:3 y con la proporción (1:1) presentó un efecto de simple adición. La administración en forma conjunta de berberina con salbutamol potenció el efecto relajante, con excepción de la proporción (1:3). El efecto relajante encontrado con los diferentes extractos y aceites esenciales de las plantas evaluadas, proporciona el sustento experimental de su uso tradicional en el tratamiento del asma. También se encontró que la administración simultánea del extracto de diclorometano/metanol (1:1) de bugambilia y del alcaloide berberina potencia el efecto relajante, lo que puede tener aplicaciones clínicas importantes. Finalmente se demostró que se produce un efecto sinergista entre salbutamol y bromuro de ipratropio, combinación comúnmente utilizada en la clínica pero que no se había dado una explicación básica de la forma en la que interactúan.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas en conjunto con las neumonías e influenza continúan ocupando los primeros lugares dentro de las causas de mortalidad infantil y adultos mayores. (Arenas *et al.*, 1999). Dentro de las acciones que se realizan para disminuir la morbilidad y mortalidad causadas por estas enfermedades, se encuentra aquellas actividades preventivas dirigidas a capacitar a los profesionales de la salud en la detección de la sintomatología y el manejo de estas patologías, así como en el uso de fármacos y de algunas plantas medicinales en pacientes que no cuentan con los recursos para adquirir los fármacos.

El uso de las plantas medicinales hoy en día comienza a ser aceptado en nuestro país por los médicos. Las grandes civilizaciones antiguas como los Chinos y los Hindúes proporcionaron escritos como evidencia de la ingeniosidad del hombre en utilizar las plantas en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades (Phillipson, 2001). En México, esta medicina se ha utilizado desde nuestros antepasados para aliviar algunas enfermedades y aún, hoy en día se siguen utilizando, gracias al conocimiento que se ha transmitido de generación en generación. La llamada medicina tradicional ha demostrado que puede utilizarse para el tratamiento de muchas de las enfermedades con resultados favorables (Taddei-Bringas *et al.*, 1999).

Para evaluar la actividad biológica de las plantas medicinales es necesario hacer uso de los modelos experimentales farmacológicos para demostrar científicamente los efectos terapéuticos que se les atribuyen, lo que puede conducir al desarrollo de nuevos fármacos que ayuden a combatir diversas enfermedades.

Algunas de las plantas medicinales que se utiliza para el alivio de problemas respiratorios como bronquitis, tos y asma son la bugambilia (*Bougainvillea sp*), saúco (*Sambucus mexicana*), poleo (*Mentha pulegium*), toronjil morado (*Agastache mexicana*), axocopaque (*Gaultheria procumbens*), axihuitl (*Eupatorium aschenbornianum*) y chicalote (*Argemone ochroleuca*) entre otros.

Este trabajo se desarrollo con el objetivo de validar el uso tradicional de estas plantas medicinales midiendo el efecto relajante sobre el músculo liso traqueal de cobayo de extractos o de productos derivados de las plantas mencionadas anteriormente. Además, se exploró a través de un análisis isoblográfico la interacción entre salbutamol y el extracto de bugambilia; salbutamol y el alcaloide berberina, que se ha identificado como uno de los principios activos relajante de *Argemone ochroleuca* (Sánchez- Mendoza *et al.*, 2007a).

II. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Asma Bronquial

El asma es un problema de salud que afecta a aproximadamente a 150 millones de personas en el mundo, además, de que se sigue incrementado a lo largo del tiempo (Braido *et al.*, 2005).

La palabra asma, que significa literalmente “jadeo”, era empleado ya por los médicos griegos de la antigüedad, como Hipócrates. Aretaeus de Cappadocia en el Segundo Siglo de nuestra era dio la primera descripción clínica exacta del asma, “los síntomas de su acercamiento son opresión del pecho; lentitud en su trabajo acostumbrado y a cada esfuerzo, dificultad de la respiración en el funcionamiento en un camino inclinado”, y reconoció que la enfermedad era potencialmente fatal. No fue sino hasta antes de 1910 que los asmáticos eran considerados individuos sensibles a una sustancia específica. De aquí en adelante, las investigaciones en alergia y asma se han convertido rápidamente en prioridad y el asma ahora se considera un síndrome complejo con muchos fenotipos clínicos (Smit y Lukacs, 2005).

El asma bronquial es caracterizado por la obstrucción generalizada reversible de las vías aéreas, que se establecen de forma recurrente, provocada por estímulos que por sí mismos no son nocivos y que no afectan a individuo que no son asmáticos. Como factor subyacente existe una hiperreactividad bronquial o, lo que es lo mismo, una tendencia incrementada a la broncoconstricción como respuesta a una gran variedad de estímulos tales como: alergenicos (individuos atópicos), ejercicio, frío, infecciones respiratorias, tabaco, contaminantes atmosféricos, estados emocionales, etc. (Flórez *et al.*, 1997).

Su inicio se presenta generalmente en la infancia aunque se puede manifestar en cualquier edad y tiene gran impacto en la calidad de vida, provoca una alta incidencia de ausentismo escolar y laboral por la enfermedad y produce un importante impacto social y económico, así como la carga emocional que supone para el paciente y su familia (Martínez, 2004).

2.1.1. El asma como enfermedad inflamatoria

El asma se conoce también como bronquitis crónica eosinofílica descamativa. Existen dos fases principales implicadas en el asma. La primera es la fase inicial o *respuesta inmediata* que se caracteriza por la existencia de broncoespasmo. Las células implicadas son los mastocitos, también participan plaquetas y macrófagos alveolares (Flórez *et al.*, 1997).

Aunque las células cebadas pueden cumplir una función importante en la respuesta a los alérgenos y al ejercicio, todavía es incierto como participan en el asma crónico y, posiblemente los fármacos que las estabilizan no sirvan para controlar los síntomas de dicho padecimiento. Los corticoides no ejercen acción directa sobre las células cebadas e inhiben la respuesta tardía a los alérgenos; por tanto, pueden evitar o reducir una respuesta bronquial excesiva (Kalant, 1998).

Para el diagnóstico es importante tomar en cuenta la historia clínica del paciente, pues es un diagnóstico predominante clínico, basándose en la presencia de signos objetivos de obstrucción bronquial, básicamente por medio de la exploración física (signos de dificultad respiratoria, sibilancias, expiración prolongada, hipoventilación, etc.). Estos signos obstructivos deben de ser recurrentes, esto es, se presentan en forma de exacerbaciones episódicas (crisis), aunque en grados más severos los síntomas obstructivos pueden ser persistentes y aún así, presentar episodios de agravamiento (Martínez, 2004).

En el Cuadro 1, se enlistan los mediadores del proceso inflamatorio provenientes de las células cebadas y sus efectos y en el Cuadro 2, se enlistan las células que intervienen en la inflamación asmática y los efectos que presentan.

2.1.2. Tratamiento del asma

Evidencias recientes han demostrado que los esteroides inhalados tienen efectos significativos sobre sistema inmunológico del pulmón en pacientes asmáticos. Notablemente, los esteroides incrementan la transcripción del número de genes incluyendo lipocortin-1, β_2 -adrenoreceptores, proteína inhibitoria de la secreción del leucocitos, proteína celular-10 clara (CC10, uteroglobina), agonista del receptor de interleucina 1 (IL)-1 y endopeptidasa neutral (Braidó *et al.*, 2005).

La aplicación local de medicamentos a los pulmones se logra por medio de aerosoles. En teoría, este procedimiento debe generar una concentración local alta en los pulmones con poca difusión a nivel sistémico y mejorar en un grado notable la proporción terapéutica al llevar al mínimo los efectos adversos a nivel general. Los fármacos antiasmáticos más utilizados son los agonistas β_2 -adrenérgicos (Hardman *et al.*, 2001).

Cuadro 1. Mediadores del proceso inflamatorio provenientes de células cebadas

Clase	Mediador	Efectos
Preformados	Histamina	Vasodilatación, permeabilidad vascular, prurito, tos, broncoconstricción, rinorrea
	TNF- α	Regulación de las moléculas de adherencia
	Proteasas	Vasodilatación, permeabilidad vascular, broncoconstricción
	Heparina	?
Derivados de lípidos	LTC ₄	Broncoconstricción, vasodilatación, permeabilidad vascular
	LTB ₄	Quimiotaxia de leucotrienos
	PGD ₂	Vasodilatación, permeabilidad vascular broncoconstricción, secreción de moco
Citocinas	PAF	Broncoconstricción, quimiotaxia de leucocitos
	TNF- α	Regulación de las moléculas de adherencia
	IL-1	Estimulación amplia de la inflamación
	IL-3	División de células cebadas
	IL-4	División de células cebadas, cambio en la clase de Inmunoglobulina de linfocitos B para la producción de IgE
	IL-5	Diferenciación y quimiotaxia de eosinófilos
	IL-6	Crecimiento y diferenciación de linfocitos
	IL-8	Quimiotaxia de leucocitos
	GM-CSF	Estimulación de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos
	MIP-1 α	Quimiotaxia de monolitos, linfocitos T y eosinófilos

GM-CSF= factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos; LT= leucotrieno; MIP= proteína inflamatoria de macrófagos; PG= prostaglandinas; TNF= factor de necrosis tumoral; PAF= factor activador de plaquetas; IL= interleucina (Velásquez, 1993).

Cuadro 2. Células y mediadores durante la inflamación asmática

Célula	Mediadores	Efectos
Eosinófilo	Proteína básica mayor, ECP, EDNT, LTC ₄ , IL-1, IL-6, GM-CSF, superóxido	Exfoliación epitelial, broncoconstricción estimulación de la inflamación
Linfocitos T	Diversas citocinas	Estimulación de la inflamación
Basófilo	Histamina, LTC ₄ , IL-4	Broncoconstricción, multiplicación de células cebadas
Macrófago	TNF- α , superóxido, proteasa, LTB ₄ , PGD ₂	Daño tisular, quimiotaxia, broncoconstricción, secreción de moco

ECP, proteína catiónica eosinófila; EDNT, neurotoxina derivada de eosinófilos; LT, leucotrieno; IL, interleucina; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos; TNF, factor de necrosis tumoral; PG, prostaglandinas (Velásquez, 1993).

2.1.2.1. Broncodilatadores

Los broncodilatadores, son fármacos capaces de relajar el músculo liso de las vías aéreas. Su uso clínico se basa en dos supuestos: primero, que en la patología a tratar, el componente motor (broncoconstricción) tiene un papel significativo; y segundo, que este componente motor es de naturaleza reversible e influenciado por fármacos relajantes. El asma y en menor medida la bronquitis crónica, constituyen indicaciones para el uso de broncodilatadores (Velásquez, 1993).

Dada la importancia del componente inflamatorio en la patología del asma, se ha modificado el criterio de abordar su tratamiento, acentuando más el recurso a la acción antiinflamatoria que a la estrictamente broncodilatadora. Y dentro de esta última, se prefiere utilizar fármacos de acceso directo a la pared bronquial y de acción rápida como los β_2 -adrenérgicos que otros de acción más lenta e insegura, como la teofilina (Flórez *et al.*, 1997).

De acuerdo con lo anterior, la clasificación de los broncodilatadores es la siguiente:

- a) *Broncodilatadores*: comprenden los estimulantes de β_2 -adrenoreceptores (salbutamol), los inhibidores de fosfodiesterasas (teofilina y derivados), y los inhibidores de la actividad parasimpática (bromuro de ipratropio).
- b) *Modificadores de la respuesta inflamatoria*: corticosteroides
- c) *Inhibidores de la liberación de histamina y mediadores*: cromoglicato y nedocromilo.
- d) *Agonistas de mediadores*: antihistamínicos y antileucotrienos.

2.1.2.2. Adrenérgicos

El músculo liso de las vías aéreas se relaja por el estímulo de los β -adrenorreceptores. Al igual que en el estímulos con catecolaminas, los β_2 -adrenérgicos o agonistas selectivos elevan en el tejido el contenido de AMPc en el músculo liso traqueal (Koike *et al*, 2004). Los adelantos recientes en el campo de la farmacología molecular tratan de explicar en forma más clara los mecanismos por los que actúan los β_2 -agonistas para relajar el músculo liso de las vías aéreas (Hall y Tattersfield, 1998).

La mayoría de los efectos intracelulares de los β_2 -adrenoreceptores, son mediados a través de la activación de la adenilato ciclasa y la producción intracelular del segundo mensajero AMPc. El AMPc puede modular un número de procesos que son importantes en la relajación del músculo liso. La activación posterior de proteincinasas AMPc-dependientes produce la relajación a través de mecanismos directos (inhibición de la cinasa de la cadena ligera de miosina) e indirectos (secuestro de calcio en retículos sarcoplásmico y/o extrusión de calcio) (Flórez *et al.*, 1997).

El isoproterenol (Figura 1a) es una catecolamina sintética de acción directa que estimula de forma predominante los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 . En el pulmón, el fármaco produce broncodilatación rápida e intensa, es un activo como la adrenalina que alivia con rapidez un ataque agudo del asma, si se administra por inhalación. Su acción dura aproximadamente una hora y pueden usarse dosis subsecuentes (Mycek *et al.*, 2007).

El salbutamol (Figura 1b) estimula selectivamente a los receptores β_2 del pulmón, útero y músculo liso vascular. (Mc Van, 1995).

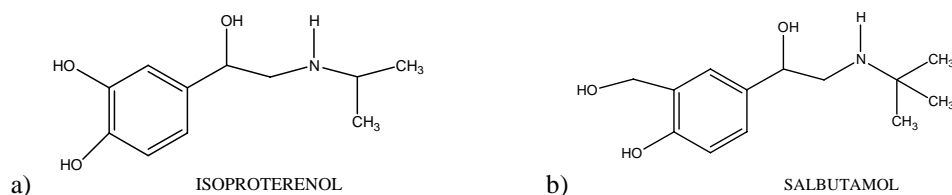


Figura 1. Estructuras de los fármacos adrenérgicos

La amplia distribución pulmonar de adrenoreceptores β_2 sugiere que los efectos derivados de la administración de un simpaticomimético β excede la mera broncodilatación. Los efectos adicionales posibles son: inhibición de la liberación de neurotransmisores (acetilcolina) y mediadores (histamina), reducción de la permeabilidad microvascular y aumento de la aclaración mucociliar.

2.1.2.3. Metilxantinas

Las fosfodiesterasas o PDE por sus siglas en ingles, regulan las concentraciones celulares de los segundos mensajeros AMPc y GMPc, y juega un papel importante en muchos procesos biológicos. La teofilina ha sido utilizada en el tratamiento del asma por más de 50 años. En los últimos 20 años se ha encontrado que la teofilina y la metilxantina actúan inhibiendo de forma inespecífica a las fosfodiesterasas (Wang *et al.*, 2007).

Los inhibidores selectivos de fosfodiesterasas ofrecerían la posibilidad de la regulación selectiva de la función del tejido liso, con menos efectos secundarios indeseados, según lo que se conoce para la teofilina en el tratamiento de asma. Por lo tanto, los inhibidores isoenzimáticos-selectivos de fosfodiesterasa están siendo explorados como una nueva y prometedora clase de fármacos con características antiinflamatorias y broncodilatadoras que puedan utilizarse en la intervención terapéutica del asma (Santing *et al.*, 2001).

Además de la teofilina anhidra (Figura 2a) debido a su escasa solubilidad, se utilizan derivados de la misma que la liberan en el organismo. El más importante es la aminofilina (Figura 2b). Existen otros derivados que no liberan teofilina en el organismo y su uso clínico es limitado.

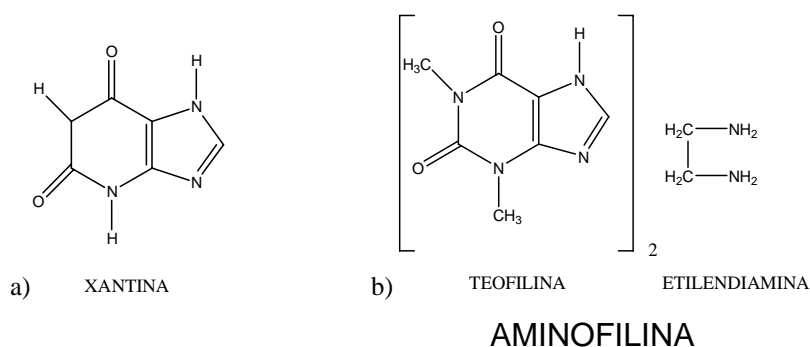


Figura 2. Estructuras de las metilxantina y aminofilina

2.1.2.4. Glucocorticoides

Es bien sabido que los glucocorticoides desempeñan un papel muy importante para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, basados en su acción antiinflamatoria, antiploriferativo y antiinmunosupresor. En la mayoría de los casos, los glucocorticoides son útiles en casos clínicos severos (Fukushima *et al.*, 2007).

Los corticoesteroides inhalados son el estándar del cuidado en asma y es ampliamente utilizado en el tratamiento de pacientes con enfermedad pulmonar crónica obstructiva. Inhiben con éxito la inflamación de las vías aéreas en asma, pero su eficacia sigue siendo polémica. Las características deseadas del corticoesteroide inhalado incluyen un receptor glucocorticoide de alta afinidad y un largo tiempo de residencia a nivel pulmonar (Sadowska *et al.*, 2006).

La introducción de esteroides inhalados redujo notablemente los efectos tóxicos, permitiendo su uso crónico. Este enfoque ha sido uno de los avances más importantes de los últimos años en la terapia del asma, hasta el punto de que hoy en día es el método de elección en el tratamiento crónico del asma. Por el contrario, su eficacia en bronquitis crónica y el enfisema es mucho menor y motivo de controversia.

2.1.2.5. Anticolinérgicos

Los medicamentos anticolinérgicos son de uso general en el tratamiento de enfermedades obstructivas crónicas como el asma y otras enfermedades de las vías aéreas. El músculo liso de las vías aéreas contiene receptores muscarínicos M_2 y M_3 , dependiendo de la especie es el número de receptores M_2 o M_3 . La contracción y broncodilatación del músculo liso son mediados por receptor M_3 . Aunque, del 50-80% de los receptores muscarínicos en las vías aéreas del músculo liso son M_2 , la función de estos receptores no es todavía clara.

Varios estudios han demostrado que la atropina (Figura 3a) intravenosa o inhalada induce totalmente el aumento en la resistencia a alérgenos de las vías aéreas en asmáticos (Jacoby y Fryer, 2001). Aunque los alcaloides anticolinérgicos naturales tales como, la atropina y la escopolamina se han utilizado en la medicina por muchos años, estos agentes se absorben bien en la circulación sistémica y tienen múltiples efectos secundarios que limitan su utilidad clínica. El descubrimiento de fármacos cuaternarios sintéticos de la atropina y el

desarrollo de análogos de la atropina tales como bromuro de ipratropio (Figura 3b), oxitropio, y tiotropio, se han convertido en importantes broncodilatadores inhalados de uso clínico (Gross, 2006).

El bromuro de ipratropio, no puede cruzar la barrera hematoencefálica y por lo tanto, prácticamente no actúa sobre el sistema nervioso central; además, tiene cierto grado de broncoselectividad. Los efectos del bromuro de ipratropio son similares a los que produce la atropina y su única forma de administración terapéutica es en aerosol. No se sabe a ciencia cierta cuál es la función del bromuro de ipratropio en el tratamiento del asma pero se ha observado que tiene ligera ventaja sobre los agonistas β_2 selectivos (Flórez *et al.*, 1997).

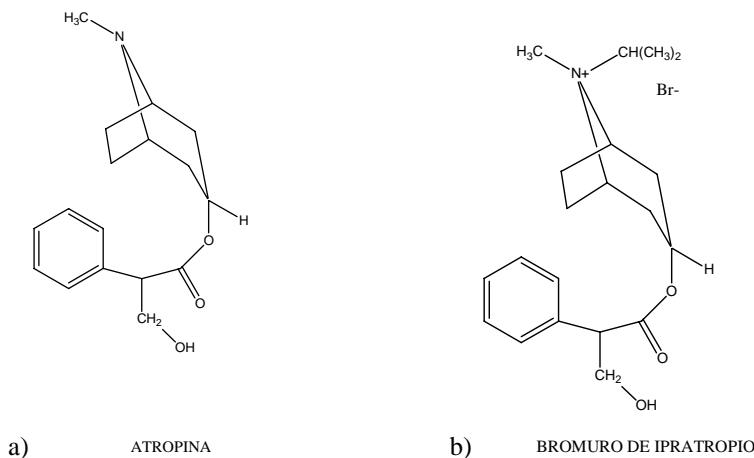


Figura 3. Estructura de dos anticolinérgicos

2.1.2.6. Anti-leucotrienos

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por crecimiento de células inmunes dentro de las vías aéreas, incluyendo los eosinófilos, linfocitos T, mastocitos, neutrófilos y macrófagos. Los leucotrienos, incluyendo el cisteinil (CysLTs); éstos incluyen (LTC₄, LTD₄ y LTE₄) y LTB₄, son biomoléculas giratorias en una red compleja de mediadores inflamatorios. Los leucotrienos son mediadores potentes del lípido derivados del ácido araquidónico a través de la lipoxigenasa 5 (5-LO). Las enzimas específicas para la síntesis de

leucotrienos están presentes en varios tipos de células inflamatorias y son activados durante la inflamación alérgica de las vías aéreas (Montuschi *et al.*, 2007).

Los leucotrienos de Cisteinil (CysLTs) contribuyen a la patogénesis del asma y de otros desórdenes alérgicos, participan en el desarrollo de la inflamación de las vías aéreas. La aparición de fármacos que interfieren con la producción o la acción de los receptores CysLTs ha conducido a los cambios importantes en el manejo del asma. Los nuevos datos sugieren que estos fármacos pueden también ser aprovechados en el manejo de otros desórdenes alérgicos. Estos agentes pueden ser llamados modificantes de leucotrienos (LTMs) (Calhoun, 2001).

2.2. Generalidades de la *Bougainvillea sp*

2.2.1. Descripción

La *Bougainvillea glabra* (*Nyctaginaceae*) es una planta ornamental. (Simon *et al.*, 2006). Es una enredadera grande, leñosa, ramas puberulentas o glabras, espinas cortas, recurvadas. Hojas alternas, pecioladas, anchamente ovaladas a ovalanceoladas, de 4-10 cm de largo, gradual o abruptamente agudas o acuminadas; puberulentas cuando jóvenes pero luego glabras. Flores blanco cremosas, de 14 mm de largo; brácteas de vistoso colores (morado, rojo, rosado, anaranjado o blancas), anchamente ovaladas o ovals, de 2.5-4.5 cm de largo, algunas veces acuminadas, puberulentas o glabra. Fruto de 7-13 mm de largo, puberulento o glabro (Cáceres, 1999).



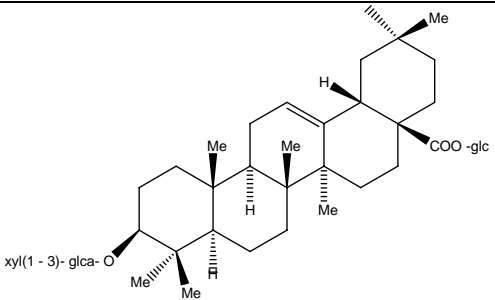
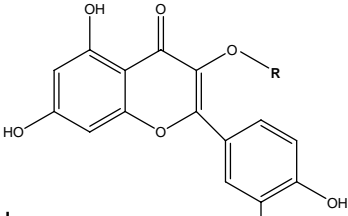
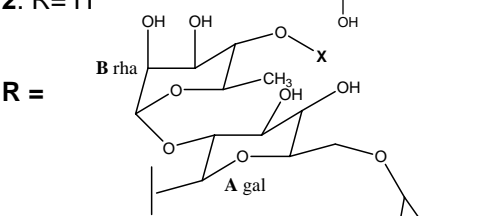
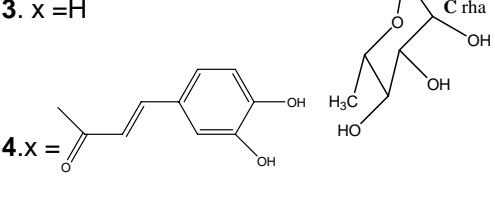
Figura 4. *Bougainvillea sp*.

2.2.2. Compuestos químicos

Se han encontrado compuestos químicos en las brácteas de la planta que se caracterizan por la presencia de betacianinas y betaxantinas.

En el Cuadro 3, se muestran algunos de los compuestos químicos que se han encontrado en las brácteas de *Bougainvillea glabra*.

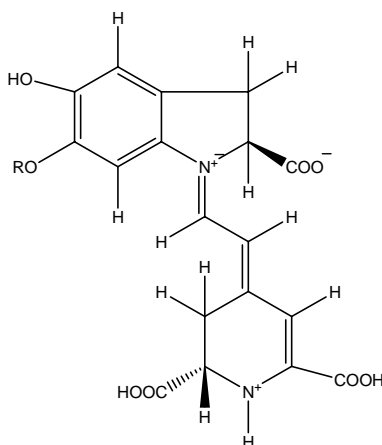
Cuadro 3. Compuestos químicos de las brácteas de Bugambilia.

COMPUESTO	NOMBRE	REFERENCIA
	<p>1. Momordin $(\beta\text{-D-glucopiranosil } 3\text{-}[O\text{-}\beta\text{-D-xilopiranosil-(1}\rightarrow\text{3)-}O\text{-}(\beta\text{-D-ácido glucopiranosilurónico)]\text{oleanolato}$</p>	Simon <i>et al.</i> , 2006
 <p>2. R= H</p>  <p>R =</p> <p>3. x =H</p>  <p>4. x =</p>	<p>2. Quercetina</p> <p>3. 3-O-α-L-(ramnopiranosil) (1\rightarrow6)-[α-L-ramnopiranosil (1\rightarrow2)]-β-D-galactopiranosido.</p> <p>4. 3-O-α-L-(4-cafeoilramnopiranosil) (1\rightarrow6)-[α-L-raminopiranosil (1\rightarrow2)]-β-D-galactopiranosido.</p>	Simon <i>et al.</i> , 2006

glca= ácido glucopiranosilurónico, glc= glucopiranosil, gal= galactopiranosil, rha= raminopiranosil, xyl= xilopiranosil

En el Cuadro 4, se muestran las estructuras químicas de las betacianinas de la *Bougainvillea glabra* que son responsables del color rojo-violeta de las brácteas. Las betacianinas extraídas de la *Bougainvillea glabra* son: la gomfrenina I (betanidina 6-O-β-glucósido) y varios derivados de bougainvilleina-v (betanidina 6-O-β-soforósido). Otro ejemplo es la mono y diglucosilsoforosida la cual está esterificada con ácido 4-cumárico y ácido caféico (mono y diésteres). Por otro lado las betacianinas de *Bougainvillea glabra* presentes en las brácteas acumulan grandes cantidades de flavonoides (kaempferol y quercetina conjugadas) que alcanzan cocientes de flavonoides y betacianinas en proporción 1:1 (Heuer *et al.*, 1994).

Cuadro 4. Betacianinas de la *Bougainvillea glabra*.



COMPUESTOS R =	NOMBRE	REFERENCIA
1. —Glc—Glc	bougainvilleina-v (15S-betanidina 6-O-soforósido) (=[^{2'} -O-β-glucosil]-β-glucósido).	Heuer <i>et al.</i> , 1994
2. —Glc	gomfrenina I (15S-betanidin 6-O-β-glucósido).	Heuer <i>et al.</i> , 1994

3.	$\begin{array}{c} \text{---Glc---Glc} \\ \\ \text{Caf} \end{array}$	15S-betanidin 6-O-(6'-O-E-cafeoil)- β -soforósido.	Heuer <i>et al.</i> , 1994
4.	$\begin{array}{c} \text{---Glc---Glc} \\ \\ \text{Coum} \end{array}$	15S-betanidin 6-O-(6''-O-E-4-coumaroil)- β -soforósido.	Heuer <i>et al.</i> , 1994
5.	$\begin{array}{c} \text{---Glc---Glc} \\ \\ \text{Coum} \end{array}$	15S-betanidin 6-O-(6'-O-E-4-coumaroil)- β -soforósido.	Heuer <i>et al.</i> , 1994
6.	$\begin{array}{c} \text{---Glc---Glc---Glc---Glc} \\ \quad \\ \text{Caf} \quad \text{Coum} \end{array}$	15S-betanidin 6-O-{2''-O- β -soforosil [(6'-O-E-cafeoil)-(6''-O-E-4-coumaroil)]}- β -soforósido.	Heuer <i>et al.</i> , 1994
7.	$\begin{array}{c} \text{---Glc---Glc---Glc} \\ \quad \\ \text{Caf} \quad \text{Coum} \end{array}$	15S-betanidin 6-O-{2'-O- β -glucosil [(6'-O-E-cafeoil)-(6''-O-E-4-coumaroil)]}- β -soforósido.	Heuer <i>et al.</i> , 1994
8.	$\begin{array}{c} \text{---Glc---Glc---Glc} \\ \quad \\ \text{Coum} \quad \text{Coum} \end{array}$	15S-betanidin 6-O-[2'-O- β -glucosil)(6',6''-di-O-E-coumaroil)]- β -soforósido.	Heuer <i>et al.</i> , 1994
9.	$\begin{array}{c} \text{---Glc---Glc} \\ \quad \\ \text{Coum} \quad \text{Coum} \end{array}$	15S-betanidin 6-O-(6',6''-di-O-E-coumaroil)- β -soforósido.	Heuer <i>et al.</i> , 1994

Glc= Glucósido, Caf= Cafeoil, Coum= Coumaroil.

2.2.3. Acción biológica

Existe pocos reportes sobre la actividad biológica de la *Bougainvillea sp*, un reporte demuestra que se ha utilizado el extracto acuoso para acabar con plagas de *Plutella xylostella*, un gusano en estado larvario que ataca a las cosechas en Sudamérica con una efectividad del 72.9% (Júnior *et al.*, 2005).

También se ha reportado actividad antimicrobiana del extracto metanólico inhibiendo el crecimiento de dos bacterias Gram positivas como *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* (Rojas *et al.*, 2000). Además, posee propiedades hepatoprotectoras, antibacteriales e insecticida (Simon *et al.*, 2006).

2.3. Otras plantas utilizadas para enfermedades respiratorias en México

2.3.1. Saúco (*Sambucus mexicana*)

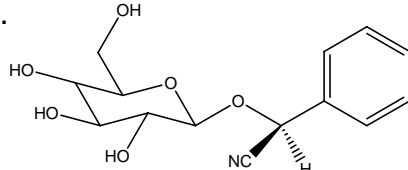
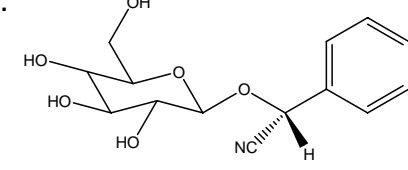
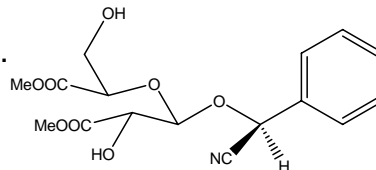
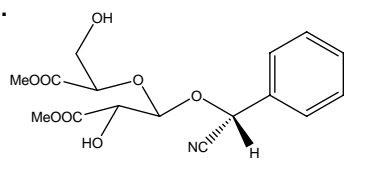
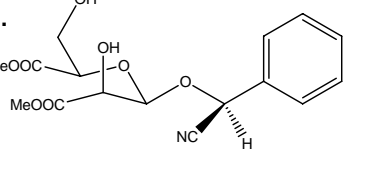
Sambucus mexicana es de la familia (Caprifoliaceae) es un pequeño árbol, utilizado en la medicina tradicional en México para el tratamiento de fiebre, varios dolores del sistema gastrointestinal, reumatismo y en general dolores del cuerpo. Para aliviar dolor y prevenir enfermedades posparto. Se ha reportado la actividad antiinflamatoria de las partes aéreas de esta planta, probada contra úlceras producidas por carragenina en ratas. Se aislaron los ácidos triterpénicos identificándose ácidos ursólico y ácido oleanoico. Recientemente se ha reportado actividad antiinflamatoria, hipoglucemiante y citotóxica del ácido ursólico aislado de esta especie (Martinez-Vasquez *et al.*, 1997).

Otra especie del género *Sambucus* es, *S. nigra* la cual es utilizada en la medicina tradicional principalmente para combatir el herpes Zoster (Unicini *et al.*, 2005). Las flores constituyen un viejo y eficaz remedio para la lucha contra los resfriados y las alergias, también es utilizado como diurético y antiinflamatorio. Además, tiene la capacidad de proteger las mucosas respiratorias aumentando la resistencia del organismo a la infección (Martínez, 1996).

Sambucus nigra, es considerada una mala hierba, que se encuentra en el sur de Italia, en la cual se reporta la presencia de glucósidos cianogénicos en la fracción acuosa de el extracto metanólico de la planta identificados como sambunigrina (1) y prunasina (2), (Cuadro 5) que son los metabolitos más abundantes. De la fracción acetato de etilo del extracto metanólico, fueron

identificadas tres cianohidrinas (Cuadro 5), **3-5**, que se podrían implicar en el proceso de la desintoxicación de la planta. En una prueba de fototoxicidad usando la inhibición de la germinación de las especies *Sorghum bicolor* y *Linum usitatissimum* han demostrado que la sambunigrina (**1**) y la prunasina (**2**), tienen efectos fuertes mientras que los compuestos **3-5** son más leves, debido a la expulsión de HCN por la acción de la glucosidasa y hidroxinitriliasa (DellaGreca *et al.*, 2000).

Cuadro 5. Compuestos de *Sambucus nigra*

COMPUESTOS	NOMBRE	REFERENCIA
<p>1.</p> 	Sambunigrina	DellaGreca <i>et al.</i> , 2000
<p>2.</p> 	Prunasina	DellaGreca <i>et al.</i> , 2000
<p>3.</p>  <p>4.</p>  <p>5.</p> 	<p>3-4. Derivado de la sambunigrina y prunasina con oxidación en C-3' y C-4' configuración C-2' S y C-5' R</p> <p>5. Derivado de sambunigrina con oxidación en C-3' y C-4', configuración C-2' R y C-5' R</p>	DellaGreca <i>et al.</i> , 2000

2.3.2. Poleo (*Mentha pulegium*)

La *Mentha pulegium*, es una planta herbácea que pertenece a la familia de Labiatae. Es principalmente caracterizado por su intenso aroma y su uso en complicaciones digestivas, en el tratamiento de flatulencia y el cólico intestinal. Además, es empleado en la industria en la elaboración de detergentes y perfumes, como una fuente natural del pulegona. Aunque la información sobre la composición del *M. pulegium* herbal y la preparación de la infusión es escasa en la literatura, el fragmento aromático del aceite esencial de *M. pulegium* ha sido estudiado por varios métodos. Como resultado, se han encontrado pulegone, mentona, e isomentona como los componentes principales, también varios compuestos menores como, el α -pineno, β -pineno, limoneno, y mentol, entre otros (Brokl *et al.*, 2006).

La familia Labiatae tiene varios miembros con un significativo contenido de aceites esenciales, algunos de ellos que son utilizados en perfumería, o como especias en alimentos. En Irán, el género *Mentha* (*Labiatae*) es representado por cinco variedades endémicas. La *Mentha pulegium* que crece naturalmente ahora en Golestan y Gilan, provincias en el norte de Irán, es fuertemente aromática y se ha utilizado tradicionalmente para desórdenes digestivos, del hígado, vesícula biliar, gota, frialdad, micción creciente; externamente, para las enfermedades de la piel. Estudios anteriores en el aislamiento del aceite esencial de *Mentha pulegium* en diferentes regiones del mundo, dieron lugar a la identificación de componentes principales de los aceites. Los componentes principales fueron pulegona (37.8%), mentona (20.3%), piperitenona (6.8%), y *p*-menta-1,8-dien-2-ona (5.1%). El 81% de estos compuestos eran monoterpenos y 83.0% de ellos fueron terpeneoides oxigenados (Aghel *et al.*, 2004).

2.3.3. Toronjil morado (*Agastache mexicana*)

El género *Agastache* (Lamiaceae) consiste en aproximadamente 20 especies distribuidas en Asia y América del Norte, 12 de éstos son endémicos de México.

El *Agastache mexicana* ha sido dividido en dos subespecie: la *mexicana* y la *xolocotziana* conocidos en la medicina tradicional como “toronjil morado y toronjil blanco”, respectivamente, la infusión de ambas plantas, junto con *Dracocephalum moldavica* L., también conocido como “toronjil azul”, son formas de plantas medicinales complejas. Estos juntos reciben el nombre de “los tres toronjiles”, que normalmente se usa para el tratamiento de varias dolencias gastrointestinales, nerviosas, y cardiovasculares, así como culturalmente las enfermedades definidas, como el “espanto” y “susto”, aunque la clasificación de éstas subespecies estaba principalmente basado en diferencias morfológicas, *A. mexicana* subespecie *xolocotziana* y *mexicana* contienen compuestos químicos comunes, como breviflorina, clerodina de tipo diterpeno, crisina y flavonoide del pratol, el aceite esencial contiene principalmente acetato de borneol. Sin embargo, una revisión de la bibliografía extensa indica que el género de *Agastache* es químicamente definido principalmente por la presencia de metil-chavicol, estragol y limoneno en sus aceites esenciales y flavonoides derivados de 4',5,7-trihidroxi flavona en sus constituyentes polares. De un análisis de *A. mexicana*, la pulegona y mentona se identificaron como los compuestos mayoritarios de sus aceites esenciales. Sin embargo, los autores no especifican la taxonomía (Estrada-Reyes *et al.*, 2004).

3.3.4. Axocopaque (*Gaultheria procumbens*)

La *Gaultheria procumbens* mejor conocido como axocopaque es de la familia de las Ericáceas, existen en México 11 especies de las cuales la más aromática es la *Gaultheria acuminata*, la cual tiene efecto analgésico,

antirreumático y antiséptico. La esencia de la especie no ha sido explorada, que podría sustituir a la de Wintegreen que procede de una especie de Canadá llamada *Gaultheria procumbens* L. Esta esencia se compone de 90% de salicilato de metilo y de 10% de un carburo llamado gaulterileno (Martínez, 1996).

Aunque el salicilato de metilo se ha detectado en otras plantas tales como miembros del Betulaceae o el Poligalaceae es quizás más conocido el de *Gaultheria* (Ericaceae), particularmente *G. procumbens* o Wintergreen. Encontrándose en *G. procumbens*, *G. cumingiana* y *G. pyroloides* compuestos como gaulterín, glucosil-xilosil-salicilato de metilo. Se han encontrado numerosos compuestos relacionados con los ácidos hidroxibenzoicos como ocurre en el género *G. procumbens* (Towers *et al.*, 1966).

2.3.5. Axihuitl (*Eupatorium aschenbornianum*)

El *Eupatorium* L. pertenece a la familia (Compositae) y abarca cerca de 1200 especies, que se encuentran en gran parte en América, pero algunas especies también pueden ser encontradas en Europa, Asia, y África. La clasificación de la especie Eupatorieae. Una especie de este género se encuentra en Irán. Existen estudios de la composición de las flores y hojas de los aceites esenciales del *Eupatorium cannabinum* de Irán. Esta planta es una hierba perdurable de campo, comúnmente encontradas a los lados de los ríos, zanjas y en otros lugares húmedos de Irán. Como planta medicinal, el *Eupatorium cannabinum* ha sido tradicionalmente utilizado como antifebril, catártico, diurético, escorbuto, expectorante, antiséptico.

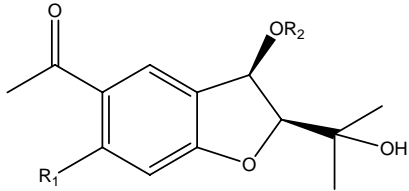
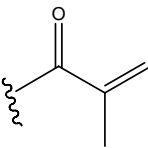
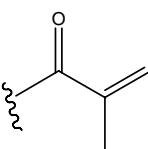
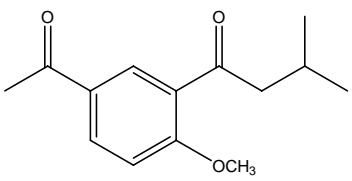
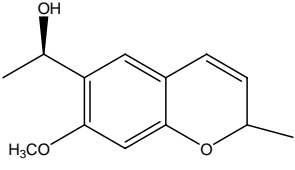
Una infusión de la hierba fresca se utiliza como purgativo y emético fuerte. Debido a su contenido de alcaloides, la planta debe ser utilizada bajo supervisión profesional. El aceite esencial de *E. cannabinum* fue analizado en la India, del aceite esencial de las hojas frescas se identificaron catorce compuestos.

Se han investigado la composición cualitativa y cuantitativa de los aceites esenciales de 3 especies de *Eupatorium*. Se han aislado seis flavonoides de los extractos de la hoja de *E.cannabinum* en los Países Bajos. Recientemente se ha demostrado que la planta puede tener actividad antitumoral, la planta también contiene alcaloides de pirrolizidina, que pueden causar daños o cáncer al hígado (Mirza *et al.*, 2006).

Los aceites volátiles obtenidos por destilación de las flores y de las hojas del *Eupatorium cannabinum* L., fueron recolectados en Touchal en la montaña Alborz (provincia de Tehran) en Irán, se identificaron treinta y nueve componentes en el aceite esencial. Los componentes principales en flores y hojas fueron germacreno D (27.3% a 37.1%), germacreno B (12.4% a 11.7%) y β -cariofileno (8.6% a 10.1%). Aunque los componentes principales de todos los aceites son similares, sus porcentajes son diferentes (Mirza *et al.*, 2006).

Las partes aéreas de *Eupaorium aschenbornianum* comúnmente llamada Axihuit, popularmente se ha utilizado para el tratamiento de problemas en la piel, úlceras bucales, tumores, además con actividad antimicrobiana. En un ensayo-dirigido de la fracción, en extracto hexánico de la planta mostró actividad antimicrobiana y la actividad de tres fracciones contra tres microorganismos. Las fracciones activas contienen dos nuevos compuestos de benzofuranos, 5-acetil-3 β -angeloiloxi-2 β -(1-hidroxiisopropil)-2,3-dihidrobzofurano y 5-acetil-3 β -angeloiloxi-2 β -(1-hidroxiisopropil)-6-metoxi-2,3-dihidrobzofurano, además de los componentes espeletona, eneccaliol (Cuadro 6), los compuestos **1-3** demostraron actividad contra dermatofitos (*Trycophyton mentagrophytes* y *Trycophyton rubrum*) el compuesto **4** mostró actividad contra estos dermatofitos, además de *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Rios *et al.*, 2003).

Cuadro 6. Compuestos de *Eupatorium aschenbornianum* con actividad antimicrobiana

		(Rios <i>et al.</i> , 2003)
1. R ₁	R ₂	(Rios <i>et al.</i> , 2003)
H		5-acetil-3β-angeloiloxi-2β-(1-hidroxiisopropil)-2,3-dihidrobenzofurano
2. R ₁	R ₂	(Rios <i>et al.</i> , 2003)
OCH ₃		5-acetil-3β-angeloiloxi-2β-(1-hidroxiisopropil)-6-metoxi-2,3-dihidrobenzofurano
3.		(Rios <i>et al.</i> , 2003) 4-hidroxi-3,5-diprenilacetatofenona (espeletona)
4.		(Rios <i>et al.</i> , 2003) Encecaliol
5. R ₁	R ₂	(Rios <i>et al.</i> , 2003)
H	H	5-acetil-3β-2β-(1-hidroxiisopropil)-2,3-dihidrobenzofurano

2.4. Modelo de tráquea aislada de cobayo

Los anillos de tráquea de cobayo aislados pueden ser utilizados para estudiar la actividad de los β -bloqueadores. Este modelo es utilizado para la detección de β -simpaticomiméticos, bloqueadores de los receptores H_1 , la broncoconstricción de leucotrienos por la vía 5-lipoxigenasa y la habilidad de los anticolinérgicos para inhibir a la acetilcolina en músculo liso de las vías aéreas.

Si se aplica un agente bloqueador β -receptor como el propranolol y si se observa relajación del músculo liso a través de esta activación, se observará que el efecto espasmolítico decreciente es proporcional a la concentración del propranolol. Los efectos de los canales de potasio pueden ser estudiados también con esta técnica (Vogel, 2002).

2.5. Interacciones de los fármacos

Se denomina interacción farmacológica a la acción que un fármaco ejerce sobre otro, de modo que el primero experimente un cambio cuantitativo o cualitativo en sus efectos. En toda interacción hay, un fármaco cuya acción es modificada y otro u otros que actúan como precipitantes o desencadenantes de la interacción. En algunos casos, la interacción es bidireccional.

En ocasiones, al asociar fármacos, se potencian sus efectos terapéuticos, ocurriendo este fenómeno con gran frecuencia que utilizamos esta interacción para obtener, mediante su asociación, un beneficio terapéutico.

Sin embargo, las interacciones que más preocupan, porque complican la evolución clínica del paciente, son aquellas cuyas consecuencias no resulta beneficiosa sino perjudicial, porque originan efectos adversos por exceso, porque tienen una respuesta insuficiente por defecto. (Flórez *et al.*, 1997).

La administración de un fármaco A puede alterar la acción de otro B por medio de uno de los dos mecanismos generales.

- Modificación del efecto farmacológico de B sin alterar su concentración en el líquido hístico (interacción farmacodinámica)
- Alteración de la concentración de B que llega al lugar de acción (interacción farmacocinética). (Rang., 2000).

2.5.1. Tipos de interacciones

- a) *De carácter farmacéutico*: se refiere a las incompatibilidades de tipo físico-químicas, que impiden mezclar dos o más fármacos en una misma solución.
- b) *De carácter farmacodinámico*: se deben a modificaciones en la respuesta del origen efector, dando origen a fenómenos de sinergia, antagonismo y potenciación. Esta interacción puede ser realizada 1) en los receptores farmacológicos (fenómenos de antagonismo, agonismo parcial, hipersensibilización y desensibilización de receptores; 2) en los procesos moleculares subsiguientes a la activación de receptores, y 3) en sistemas fisiológicos distintos que se contrarrestan o se contraponen entre sí.
- c) *De carácter farmacocinético*: se deben a modificaciones producidas por el fármaco desencadenante sobre los procesos de absorción, distribución y eliminación del otro fármaco cuyo efecto es modificado. En definitiva, lo que cambia es el número de moléculas que han de actuar en el órgano efector: aumentará la potencia de un fármaco en su sitio de acción si se favorece la absorción, disminuirá la unión a proteínas, disminuirán los mecanismos de eliminación o aumentará la formación de metabolitos activos, mientras que disminuirá dicha presencia si ocurren los mecanismos contrarios. (Flórez *et al.*, 1997).

2.5.2. Estudio de las interacciones

Un fármaco o una sustancia química pueden producir múltiples efectos en el sistema con el cual interactúa. Los efectos pueden ser deseables o indeseables (efectos adversos). El estudio de dos o más sustancias químicas que actúan conjuntamente para producir efectos similares, la relación entre concentración y efecto y la metodología para distinguir entre la interacción aditiva y la no aditiva de las diferentes combinaciones son analizadas con el análisis estadísticos y diferentes modelos que dan pie a otros experimentos.

Existen situaciones en las que uno de los dos fármacos de interés carece de eficacia o tiene muy poca eficacia en la producción de algún efecto se pueden estudiar como: combinación de un fármaco activo y un fármaco inactivo, interacción sitio-sitio, antagonismo competitivo, combinación del efecto inhibitorio.

Para conocer si la combinación es una aditividad o no aditividad se utilizan método para su análisis como el isoblograma o el análisis de superficie (Tallarida, 2000).

2.6. Análisis Isobolográfico

2.6.1. Aplicaciones y ventajas del análisis

La metodología cuantitativa para estudiar combinaciones químicas biológicamente activas, comenzó a aplicarse en venenos. El método isobolográfico tuvo sus primeras aplicaciones en estudios de análisis de toxicidad de insecticidas y fungicidas y este uso, posteriormente condujo a aplicaciones farmacológicas más amplias y a nuevos procesos estadísticos (Villagómez, 2007).

Hoy en día los libros más comunes de farmacología, aun no incluyen entre sus temas, métodos cuantitativos para estudiar combinaciones de fármacos. Sin embargo, en años recientes este tema está siendo cada vez más apreciado por más y más farmacólogos, especialmente aquellos que estudian fármacos que afectan el sistema nervioso central, para alterar la percepción del dolor, el comportamiento, la locomoción y el estado de ánimo.

De hecho varios fármacos que tienen su acción sobre el sistema nervioso central son del tipo de fármacos que tienden a ser de abuso entre las personas que lo consumen, quizá a ello se deba el creciente uso del método isoblográfico por los investigadores. Es bien sabido que las personas que abusan de una sustancia, rara vez hacen uso de solo un tipo de fármaco, sino que, el abuso es con múltiples fármacos.

Los fármacos utilizados adecuadamente también presentan interacciones, de tal modo que pueden incrementar los efectos deseados y los no deseados también. Aparte de la importancia clínica, se empieza a reconocer, que el estudio cuantitativo de las combinaciones de fármacos, especialmente cuando se detecta sinergismo, puede ser un primer paso muy útil, para elucidar el mecanismo de acción (Villagómez, 2007).

2.6.2. Fundamento y bases estadísticas para el análisis

Dos o más fármacos que producen efectos similares o iguales, a menudo se prescriben en combinación para reducir las dosis individuales y/o para reducir los efectos adversos de cada uno. Las combinaciones de fármacos también se emplean en experimentos para reducir y explorar su mecanismo de acción (Tallarida *et al.*, 1997a).

Cuando dos sustancias con efectos similares se administran juntas, el efecto combinado puede ser una simple adición de los efectos individuales e independientes, a lo que se le nombra *aditividad*. En contraste, el efecto de la combinación puede ser exagerado o atenuado. El efecto exagerado es nombrado *superaditividad* o sinergismo, en cambio el efecto atenuado se nombra *subaditividad*. En cualquiera de los casos los compuestos individualmente contribuyen al efecto, pero algo ocurre al ponerlos juntos que aumenta o disminuye el efecto esperado de ambos (Tallarida, 2000).

El estudio entre sustancias activas se puede realizar utilizando el análisis isobolográfico, el cual permite realizar una evaluación rigurosa de la interacción entre dos sustancias activas. El isoblograma proporciona una interpretación visual de las dos técnicas aditivas (y de los pares experimentales) y además es adecuado para mostrar los resultados (Tallarida *et al.*, 1997a; Tallarida, 2000).

Un isoblograma (Figura 5) es una gráfica en coordenadas rectangulares de los pares de dosis o concentraciones (a , b), de las sustancias respectivas que producen el nivel o efecto específico (por ejemplo CE_{50} , CE_{70} , CE_{30} , etc.) cuando se aplican en forma conjunta y de la línea de aditividad la cual representa todas las posibles combinaciones equivalentes para producir el efecto deseado (Tallarida *et al.*, 1997a; Tallarida, 2000).

Como se observa en la Figura 5, la línea de aditividad está definida por los puntos $(Z_1^*, 0)$ y $(0, Z_2^*)$. Siendo Z_1^* la concentración del compuesto menos activo y Z_2^* la concentración del compuesto más activo y que producen individualmente el mismo nivel de efecto. En este método el valor de Z^* para cada fármaco, se calcula de la regresión de la curva dosis-respuesta en donde existe una clara relación entre la dosis y el efecto y que pueden relacionarse literalmente, aunque también puede existir una relación no lineal y entonces se puede utilizar el análisis no lineal de Z^* (Tallarida, 2000). Se calcula la Z^* para cada fármaco de la regresión lineal del efecto en función del logaritmo de la dosis, de donde se obtiene el $\log Z^*$

y el error estándar del estimado SE ($\log Z^*$) para cada fármaco, que posteriormente se utilizará para realizar el análisis estadístico (Tallarida *et al.*, 1997b).

Todos los puntos sobre la línea de aditividad, que tiene las coordenadas (a, b) , donde a y b son las fracciones de la dosis respectivas (Z_1^* y Z_2^*) en la combinación binaria (Tallarida, 2000) del fármaco A y del fármaco B que provocan el mismo nivel de efecto de los fármacos sin combinarse y que satisfacen la ecuación.

$$a/A + b/B = 1$$

En donde A y B son las dosis equiefectivas (Z_1^* y Z_2^* que producen el mismo nivel de efecto) de los fármacos individuales cuando cada uno está presente solo. Los pares de dosis equiefectivas son denominadas *isobolas*, de tal forma que $(A, 0)$, $(0, B)$ y los pares (a, b) son isobolas. Cuando la combinación de las dosis a del fármaco A y la dosis b del fármaco B cumplen con la relación $a/A + b/B = 1$ se dice que los fármacos A y B presentan una relación *aditiva*. La relación $a/A + b/B < 1$ indica una relación *superaditiva* entre los fármacos A y B , en tanto que la relación $a/A + b/B > 1$ indica la relación *subaditiva* entre los fármacos A y B (Tallarida, 2000).

En el análisis isobolográfico primero se determinan las dosis o concentraciones que provocan un determinado nivel de efecto (Z^*) de cada fármaco. Generalmente este nivel es de 50% del máximo nivel (CE_{50}) con un intervalo de confianza al 95%, aunque se puede utilizar otro nivel siempre y cuando éste sea proporcionado por cada fármaco (Tallarida, 2000).

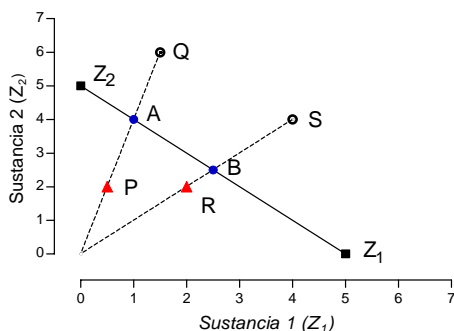


Figura 5. Isoblograma en donde la línea continua es la línea de aditividad para la sustancia 1 y 2; Z_1^* y Z_2^* son las dosis equiefectivas individuales. Los puntos A y B representan las cantidades teóricas aditivas (Z_{ad}). P y R son puntos que representan las cantidades experimentales (Z_{exp}) con un efecto superaditivo, en tanto que Q y S son puntos que representan las cantidades experimentales (Z_{exp}) con un efecto subaditivo. Las líneas radicales discontinuas 0-Q y 0-S representan las combinaciones de las sustancias en diferentes proporciones.

La Z^* del fármaco A se denotará como A y la Z^* del fármaco B, se denotará como B. Las cantidades en la combinación activa son fracciones de la dosis de cada compuesto de manera que la suma de las fracciones sea igual a la unidad; así entonces $a = fA$ del fármaco A y $b = (1-f) B$ del fármaco B en otras palabras, para que sea una combinación aditiva se debe cumplir con la relación **$a/A + b/B = 1$** .

Cuando estas cantidades son expresadas en unidades de masa comunes (mg o μg) o dosis (mg/Kg) la cantidad total en la mezcla es la suma denominada Z_{ad} :

$$Z_{ad} = fA + (1-f) B$$

Esta relación representa la cantidad teórica de la combinación que dará una interacción aditiva. Las proporciones de cada fármaco en la mezcla estarán dadas por $\rho_A = fA/Z_{ad}$ y $\rho_B = (1-f)B/Z_{ad}$ respectivamente (Tallarida, 2000).

La combinación que resulte con estas proporciones se administra experimentalmente al sistema biológico, como si fuese un tercer fármaco. Esto es, se administra en diferentes dosis o concentración conservando la misma proporción (p). Se calcula la dosis o concentración que proporciona el mismo nivel de efecto que los fármacos individuales y a este valor se le denomina Z_{exp} (cantidad experimental que provoca el mismo nivel del efecto). Se calcula también el intervalo de confianza al 95%, que posteriormente se transforma en el error estándar de la media (EEM).

Se realiza el análisis estadístico a la diferencia $M = \log Z_{ad} - \log Z_{exp}$. Si la diferencia no es significativamente diferente de cero se concluye que la combinación es una simple adición del efecto de cada uno de los fármacos. En contraste, una diferencia significativa indicará una relación no aditiva entre los dos fármacos como sigue: se establecerá una relación de superaditividad o sinergista si $Z_{exp} < Z_{ad}$ ($M > 0$) y una relación subaditiva si $Z_{exp} > Z_{ad}$ ($M < 0$). Se aplica un análisis estadístico basado en la prueba t de Student con algunas modificaciones para aplicarse al análisis isoblográfico (Tallarida *et al.*, 1997a; Tallarida, 2000).

La prueba de significancia de la diferencia $M = \log Z_{ad} - \log Z_{exp}$ brevemente consiste en determinar el valor de t' dado por:

$$t' = M / [SE (Z_{ad}^*)^2 + SE (Z_{exp}^*)^2]^{1/2}$$

En la ecuación anterior Z_{ad} se refiere a los valores aditivos y Z_{exp} a los valores experimentales. Los errores estándar estimados se calculan con la relación: $SE (Z^*) = 2.3 X Z^* X SE (\log Z^*)$, con lo que se calculan con las varianzas respectivas: $V (Z^*) = [SE (Z^*)]^2$.

La varianza de Z_{ad}^* está dada por $V(Z_{ad}^*) = f^2V(Z_1^*) + (1-f)^2V(Z_2^*)$, de esta relación se obtiene el error estándar de Z_{ad} : $SE(Z_{ad}^*) = [V(Z_{ad}^*)]^{1/2}$

Conociendo el valor de Z_{ad} y Z_{exp} con sus respectivos errores estándar, se calcula el valor de t' y se compara con el valor de T dado por:

$$T = [t_{ad}(SE(Z_{ad}^*))^2 + t_{exp}(SE(Z_{exp}^*))^2 + SE(Z_{exp}^*)^2]$$

El valor de t_{ad} , es el valor en la tabla de distribución t con $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad, en donde n_1 y n_2 son el número de dosis del fármaco 1 y del fármaco 2 respectivamente, que se utilizaron en el cálculo y t_{exp} es el valor en la tabla de distribución t para $n_{exp} - 2$ grados de libertad, en donde n_{exp} es el número de dosis de la combinación. Si el valor absoluto de t' es mayor al valor de T ($|t'| > T$) la diferencia es significativa (Tallarida, 2000).

III. JUSTIFICACIÓN

Para el tratamiento de las enfermedades de las vías aéreas como el asma o bronquitis se utilizan fármacos capaces de causar una broncodilatación, entre estos fármacos se encuentran los β_2 -adrenérgicos como el salbutamol, que se recomienda en casos agudos de asma, también están los fármacos anticolinérgicos como el bromuro de ipratropio, que relajan el músculo liso a través del efecto antagonista de los receptores muscarínicos.

Existen algunas plantas medicinales a las cuales se les atribuye propiedades para aliviar las enfermedades respiratorias entre ellas están: la bugambilia (*Bougainvillea sp*), el saúco (*Sambucus mexicana*), el toronjil morado (*Agastache mexicana*), el poleo (*Mentha pulegium*), el chicalote (*Argemone ochroleuca*), el axocopaque (*Gaultheria procumbens*) y el axihuitl (*Eupatorium aschenbornianum*), entre otras. Con el fin de comprobar científicamente si estas plantas relajan el músculo liso de las vías aéreas, se realizó la evaluación en tráquea aislada de cobayo. Así como también se realizó el estudio de la interacción entre salbutamol y el extracto diclorometano/metanol (1:1) de bugambilia que resultó con mayor actividad. Y la interacción entre salbutamol y el alcaloide berberina que se ha identificado como uno de los principios activos relajante de *Argemone ochroleuca* (Sánchez-Mendoza et al., 2007a).

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto relajante, en el músculo liso traqueal de cobayo de las plantas; bugambilia (*Bougainvillea sp*), saúco (*Sambucus mexicana*), poleo (*Mentha pulegium*), toronjil morado (*Agastache mexicana*), de los aceites esenciales de toronjil morado (*Agastache mexicana*), axocopaque (*Gaultheria procumbens*) y axihuitl (*Eupatorium aschenbornianum*) y evaluar la interacción del extracto más activo de bugambilia y del alcaloide berberina con salbutamol.

4.2. Objetivos particulares

Evaluar el efecto relajante de los extractos de bugambilia (*Bougainvillea sp*), saúco (*Sambucus mexicana*), poleo (*Mentha pulegium*) y toronjil morado (*Agastache mexicana*), así como de los aceites esenciales de toronjil morado (*Agastache mexicana*), axocopaque (*Gaultheria procumbens*), axihuitl (*Eupatorium aschenbornianum*), del bromuro de ipratropio y de salbutamol, en tráquea de cobayo.

Realizar el análisis isoblográfico de la interacción del extracto más activo de bugambilia con salbutamol, así como entre salbutamol y bromuro de ipratropio, salbutamol y berberina, en tráquea de cobayo.

V. HIPÓTESIS

Los extractos de Bugambilia (*Bougainvillea sp*), poleo (*Mentha pulegium*), saúco (*Sambucus mexicana*), toronjil morado (*Agastache mexicana*), y los aceites esenciales de toronjil morado (*Agastache mexicana*), axocopaque (*Gaultheria procumbens*) y axihuitl (*Eupatorium aschenbornianum*), tendrán actividad relajante en tráquea de cobayo.

El efecto relajante de salbutamol en el músculo liso de la tráquea aislada de cobayo se potenciará con la administración concomitante del extracto de bugambilia, con berberina y bromuro de ipratropio.

VI. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Material vegetal

Las brácteas secas de *Bougainvillea sp* se obtuvieron de los Laboratorios Mixim S.A. de C.V. en Febrero del 2006.

El poleo (*Mentha pulegium*), toronjil morado (*Agastache mexicana*), saúco (*Sambucus nigra*), axocopaque (*Gaultheria procumbens*) y axihutl (*Eupatorium aschenbornianum*), fueron adquiridos en el Mercado de Sonora en la ciudad de México en Mayo del 2007 y su identidad botánica fue comprobada por un botánico del Herbario del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

6.2. Fármacos

El bromuro de ipratropio fue adquirido de Sigma Aldrich (St. Louis Mo. USA) y el salbutamol de Helm de México S.A. (México).

6.3. Preparación de los extractos y aceites esenciales

6.3.1. Extractos

a) Bugambilia

Los extractos se prepararon a partir de 3 Kg de las brácteas secas de bugambilia (*Bougainvillea sp*), mediante maceración a temperatura ambiente en forma sucesiva con 20 litros de hexano, 18 litros de diclorometano y 15 litros de metanol y 1 Kg bugambilia en 10 litros de diclorometano/metanol (1:1), en un período de tres días con cada disolvente. Este procedimiento se repitió dos veces más. Después de la evaporación de los disolventes se obtuvieron, 39 g (1.3%) del

extracto hexánico, 27 g (0.9%) del extracto de diclorometano, 129 g (4.3%) del extracto metabólico y 57 g (5.7%) del extracto de diclorometano/metanol (1:1).

b) Toronjil morado, saúco y poleo

Para los extractos de plantas se pesaron 87.7 g de toronjil morado en (1.1 L), 177 g de saúco en (2 L) y 45 g de poleo en (1 L), de diclorometano/metanol (1:1), cada planta se maceró por un periodo de tres días con el disolvente, este procedimiento se repitió dos veces más. Después de la evaporación de los disolventes se obtuvieron 3.2 g (3.6%) del extracto de toronjil morado, 27.01 g (15.25%) del extracto de saúco y 4.7 g (2.6%) del extracto de poleo.

De un estudio previo que se realizó en este mismo laboratorio se aisló la berberina como principio activo del chicalote (*Argemone ochroleuca*) (Sánchez-Mendoza et al., 2007a). Misma que se utilizó en este trabajo para realizar el estudio de interacción con salbutamol.

6.3.2. Preparación de la infusión de *Bougainvillea sp*

En un vaso de vidrio de 500 mL se calentaron 250 mL de agua hasta ebullición, se retiró del calentamiento y se colocaron 0.9 g de brácteas de bugambilia las cuales se dejaron en contacto por 5 minutos, enseguida se filtró por gravedad en un embudo de vidrio. El filtrado se colocó en cajas petri, se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 hora, el residuo se raspó, obteniéndose 0.134 g (14.8%) de material rojo característico de las brácteas.

6.3.3. Obtención de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se obtuvieron de las partes aéreas de las plantas frescas, a través de una destilación durante 30 minutos por arrastre de vapor de agua, utilizando el aparato descrito en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos para preparar aceites esenciales (FHEUM, 2001). Los aceites esenciales obtenidos se guardan en viales de color ámbar, manteniéndolos en refrigeración. Las cantidades obtenidas fueron, para el toronjil morado 87.7 g de planta (0.239 g 0.27% de aceite), axocopaque 100 g (0.272 g 0.27% de aceite) y axihuitl 74.37 g (0.202 g 0.27% de aceite).

6.3.4. Análisis de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se analizaron utilizando un cromatógrafo de gases LECO Modelo Pegasus AD acoplado a un espectrómetro de masas marca Agilet modelo 6890N con inyector automático Agilet modelo T5606-01.

Se inyectaron 1.0 µL de la muestra en una columna Capilar Fase DB5 de Agilet (10m X 0.18mm de diámetro interno espesor de partícula 0.18µm). El gas acarreador fue helio a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. La temperatura del inyector fue de 300 °C, con la temperatura de línea de transferencia de 250 °C y la temperatura de la cámara de 200 °C. El retraso de encendido del filamento fue de 100 segundos.

En el espectrómetro de calentamiento utilizado fue temperatura inicial de 40 °C durante 3 minutos, la velocidad de calentamiento de 50 °C por minuto hasta 280 °C durante 10 minutos. El intervalo de masa 45-550 U. La adquisición espectral 10 espectros por segundo. La inyección fue con división de flujo (split). La técnica utilizada fue de baja resolución por impacto electrónico y detección de iones positivos. Los componentes fueron identificados utilizando la biblioteca NIST versión 2.0.

6.3.5. Separación por cromatografía en columna del extracto hexánico de *Bougainvillea sp*

En un estudio previo al evaluar los compuestos responsables de la actividad relajante de la *Bougainvillea sp* y con la finalidad de aislar a los compuestos responsables de la actividad relajante de la *Bougainvillea sp*, se procedió a efectuar un fraccionamiento del extracto hexánico por cromatografía en columna abierta. Se pesaron 29.2 g del extracto hexánico, se adsorbió con 29 g de gel de sílice (0.063-0.2 mm) y se dejó secar hasta la obtención de un polvo fino. Se colocó algodón en la columna previamente desengrasado con hexano, se adicionaron 60 g de gel de sílice suspendido en hexano hasta que se compactó, a continuación se le agregó el extracto adsorbido en gel de sílice y se añadió hexano hasta cubrir la columna. Se tomo en cuenta el volumen de cambio de 125 mL.

Se realizó el cambio de disolvente monitoreándolo por cromatografía en capa fina. De los extractos se obtuvieron 3.6 g de la fracción de hexano, 8.3 g de la fracción de hexano/acetato de etilo (9:1), 1.8 g de la fracción de hexano/acetato de etilo (5:5), 1.3 g de la fracción de acetato de etilo, 1.4 g de la fracción de metanol y 2.63 g de la fracción de hexano/acetato de etilo (7:3). Esta última fracción resulto con mayor actividad relajante.

6.4. Animales

Para realizar los experimentos se utilizaron cobayos con peso corporal de 300-400 g. Siguiendo la Norma Oficial Mexicana sobre el Cuidado y Manejo de Animales NOM-062-ZOO-1999 y manteniéndolos a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) con libre acceso al alimento y al agua.

6.5. Disección de la tráquea y montaje de la preparación

Los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico, inmediatamente se realizó la disección de la tráquea limpiándola del tejido circundante. El órgano se mantuvo en una solución de Krebs a 37° C cuya composición en (mM) fue: NaCl 118, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 7 H₂O 1.2, NaHCO₃ 25.0, CaCl 2H₂O 2.2 y glucosa 11.0. (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2007 b). Posteriormente se obtuvieron 8 anillos de aproximadamente 2 mm de longitud, cada uno se colocó en una cámara para órgano aislado con 10 mL de solución Krebs a 37° C. La preparación se suspendió entre dos ganchos de alambre de Nicromel, uno de los extremos se fijó a la cámara y el otro al transductor de fuerza (Grass FT 03E) conectado a un polígrafo Biopack System, que permitió obtener los datos mediante el programa Acknowledge MP100 versión 3.5.3.

El órgano se sometió a una tensión inicial de 1.5 g y se dejó estabilizar por una hora; se realizaron lavados con solución de Krebs cada 15 minutos durante este periodo. A continuación el órgano se estimuló con clorhidrato de acetilcolina 3x10⁻⁵ M, tres veces a intervalos de treinta minutos. Después de la estimulación, los órganos se lavaron tres veces con solución de Krebs. Posteriormente se permitió que la preparación se equilibrara por una hora antes de realizar los experimentos.

6.6. Evaluación del efecto relajante de los productos naturales y fármacos

Para evaluar el efecto relajante, el tejido se contrajo con carbacol 3 x 10⁻⁶ M (en experimentos independientes) dejando en contacto al fármaco con el tejido hasta alcanzar una meseta (aproximadamente 6 minutos). Una vez en la meseta se aplicaron los extractos de hexano, diclorometano, metanol y diclorometano/metanol 1:1 de *Bougainvillea sp*, los aceites esenciales de toronjil morado (*Agastache mexicana*), axocopaque (*Gaultheria procumbens*) y axihuti (*Eupatorium aschenbornianum*) suspendidos en agua destilada con trazas de

tween 80 a las concentraciones de 31.6, 56.2, 100.0, 177.0, 316.0, 562.0 µg/mL, de manera acumulativa.

Se evaluó la berberina a las concentraciones de 10.0, 17.7, 31.6, 56.2, 100.0, 177.0 y 316.0 µg/mL comparándolo con los datos experimentales realizado anteriormente en este laboratorio (Sánchez-Mendoza et al, 2007a).

Se evaluaron los fármacos, bromuro de ipratropio a las concentraciones de 7.3×10^{-5} , 4.1×10^{-4} , 7.3×10^{-4} , 1.3×10^{-3} , 2.3×10^{-3} µg/mL y de salbutamol 2.39×10^{-4} , 2.39×10^{-3} , 0.023, 0.23, 2.39 µg/mL, el control se realizó con trazas de tween 80 disuelto en agua destilada.

6.7. Determinación de las curvas dosis-respuesta

Se construyeron las curvas dosis-respuesta de los extractos, aceites esenciales y fármacos. Para el estudio de interacción se determinaron las curvas dosis-respuesta, en las tres proporciones evaluadas con las dosis que se muestran en el Cuadro 8. La dosis que provocó 50% del efecto relajante (CE_{50}) y su intervalo de confianza al 95% asociado, se calculó utilizando un análisis de regresión lineal del logaritmo de la dosis como variable independiente y la respuesta como variable dependiente (Tallarida, 2000).

Para las curvas dosis-respuesta, solamente se trabajó con la parte lineal de la curva, donde r^2 tendía a un valor mayor a 0.8. Para cada curva se determinó la CE_{50} de forma individual y de cada combinación en sus diferentes proporciones evaluadas.

6.8. Análisis de la interacción

Se realizó un análisis isoblográfico para caracterizar la interacción de la relajación del músculo liso entre el salbutamol con el ipratropio, el salbutamol con el extracto diclorometano/metanol 1:1 de *Bougainvillea sp* y salbutamol con berberina. Para el análisis sólo se consideraron las dosis equiefectivas (CE_{50}) de cada fármaco individual obtenidas de las curvas dosis-respuestas.

Las dosis efectivas teóricas (Z_{ad}) con su error estándar de la media (EEM) para cada combinación y en la misma proporción (1:1) se calcularon las dosis equiefectivas (CE_{50}) de los fármacos individuales y de acuerdo al método descrito por Tallarida *et al.*, (1997a) para satisfacer la ecuación $Z_{ad} = f A + (1-f) B$, en donde A es la CE_{50} del salbutamol y B es la CE_{50} del bromuro de ipratropio, del extracto de bugambilia o de berberina en la combinación. Para este caso el valor de $fA = a$ representa la fracción de la CE_{50} del salbutamol en la combinación y $(1-f) B = b$ representa la fracción de la CE_{50} del otro compuesto en la combinación (Tallarida, 2000). Z_{ad} representa la dosis aditiva total de los fármacos que teóricamente provocan una relajación del 50% en el músculo liso de la tráquea de cobayo.

Las proporciones que se estudiaron fueron 1:3, 1:1 y 3:1, correspondiendo a los de f y $(1-f)$ de 0.25: 0.75, 0.5: 0.5, 0.75: 0.25 respectivamente. Las proporciones para cada fármaco y las dosis en $\mu\text{g/mL}$ probadas en cada proporción, se muestran en el Cuadro 7.

La Z_{exp} es la dosis total determinada experimentalmente de una mezcla de dos componentes, que se administró combinada en las proporciones fijas, es una cantidad suficiente para relajar el músculo liso de la tráquea de cobayo en un 50%. El valor Z_{exp} (con sus intervalos de confianza al 95%) se determinó de la curva dosis-respuesta respectiva de los fármacos combinados, por un análisis de regresión lineal de la curva logaritmo de la dosis contra la respuesta (Tallarida, 2000). Los intervalos de confianza al 95% se transformaron en el EEM.

6.8.1. Análisis estadístico

Se realizó la comparación del valor Z_{exp} con el valor de Z_{ad} mediante un análisis estadístico basado en la prueba t de Student con algunas modificaciones para aplicarse al análisis isoblográfico (Tallarida et al., 1997a; Tallarida, 2000). Para este análisis se utiliza el valor del EEM de cada valor de la CE_{50} , motivo por el cual fue necesario transformar el valor del intervalo de confianza al 95% en el EEM. Los valores de Z_{exp} que fueron menores al valor de Z_{ad} , con un valor de $p < 0.05$ para la diferencia en ambas direcciones X y Y, se interpretaron como la existencia de una interacción *superaditiva* significativa. Para valores de Z_{exp} mayores a Z_{ad} con un valor de $p < 0.05$ para la diferencia en ambas direcciones X y Y, se interpretaron como la existencia de una interacción *subaditiva* significativa. Cuando no hubo diferencia estadística significativa entre los valores de Z_{exp} y Z_{ad} , se interpretó como la ausencia de interacción, declarándose que existe una relación *aditiva* en la combinación (Tallarida, 2000).

Para obtener un valor que describa la magnitud de la interacción, se realizó un análisis fraccional para cada combinación, utilizando los valores de la CE_{50} del salbutamol, del ipratropio, del extracto o de la berberina y de la combinación, de acuerdo a la relación: $a/A + b/B$, donde A y B son los valores de las CE_{50} cuando cada fármaco (salbutamol o el otro tratamiento) actúa solo y a y b son las cantidades cuando cada fármaco o extracto actúa en la combinación. Este valor de la fracción total mide la divergencia entre el valor de la dosis experimental (Z_{exp}) de la combinación y el valor de la dosis teórica (Z_{ad}) equiefectiva (Tallarida, 2000). La demostración de diferencia estadística ($p < 0.05$) de 1 para la relación $a/A + b/B$ se interpretó como una interacción superaditiva si $a/A + b/B$ fue < 1.0 y como una interacción subaditiva si $a/A + b/B$ fue > 1.0 ; la ausencia de una diferencia estadística ($p > 0.05$) se interpretó como un efecto aditivo (Tallarida, 2000).

Cuadro 7. Concentraciones utilizadas para evaluar el efecto relajante de fármacos y productos naturales en la combinación.

Fármaco o producto natural	Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)		Proporción (1:3)
	Fármaco o producto Natural	Fármaco o producto en combinación ($\mu\text{g/ml}$)	
		Salbutamol	Concentración total ($\mu\text{g/mL}$)
Ipratropio	2.01×10^{-4}	2.41×10^{-3}	2.60×10^{-3}
	4.02×10^{-4}	4.83×10^{-3}	5.20×10^{-2}
	8.04×10^{-4}	9.66×10^{-3}	1.04×10^{-2}
	1.60×10^{-3}	1.93×10^{-2}	2.08×10^{-2}
Bugambilia	12.33	1.80×10^{-3}	12.33
	24.67	3.60×10^{-3}	24.67
	49.35	7.20×10^{-3}	49.35
	98.70	1.14×10^{-2}	98.71
Berberina	5.50	3.6×10^{-3}	5.51
	11.01	7.2×10^{-3}	11.02
	22.02	14.4×10^{-3}	22.04
	44.05	28.8×10^{-3}	44.08
Proporción (1:1)			
Ipratropio	2.01×10^{-4}	2.4×10^{-3}	2.60×10^{-3}
	4.02×10^{-4}	4.8×10^{-3}	5.20×10^{-3}
	8.04×10^{-4}	9.6×10^{-3}	1.04×10^{-2}
	1.6×10^{-3}	1.9×10^{-2}	2.08×10^{-2}
Bugambilia	12.33	6.0×10^{-4}	12.33
	24.67	1.2×10^{-3}	24.67
	49.35	2.4×10^{-4}	49.35
	98.70	4.8×10^{-3}	98.70
	197.40	9.6×10^{-3}	197.40
	394.81	1.92×10^{-2}	394.81
Berberina	1.37	3×10^{-4}	1.37
	2.75	6×10^{-4}	2.75
	5.50	1.2×10^{-3}	5.50
	11.01	2.4×10^{-3}	11.01
	22.02	4.8×10^{-3}	22.03
	44.05	9.6×10^{-3}	44.06
	88.11	19.2×10^{-3}	88.13

Cuadro 7. (Continuación). Concentraciones utilizadas para evaluar el efecto relajante de fármacos y productos naturales en la combinación.

Fármaco o producto natural	Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)		Proporción (3:1)
	Fármaco o producto Natural	Fármaco o producto en combinación ($\mu\text{g/ml}$)	
		Salbutamol	Concentración total ($\mu\text{g/mL}$)
Ipratropio	6.0×10^{-4}	1.5×10^{-4}	7.50×10^{-4}
	1.2×10^{-3}	3.01×10^{-4}	1.50×10^{-3}
	2.4×10^{-3}	6.03×10^{-4}	3.00×10^{-3}
	4.8×10^{-3}	1.20×10^{-3}	6.00×10^{-3}
Bugambilia	9.25	1.5×10^{-4}	9.25
	18.50	3.0×10^{-4}	18.50
	37.01	6.0×10^{-4}	37.01
	74.02	1.2×10^{-3}	74.02
	148.05	2.4×10^{-3}	148.05
	296.10	4.8×10^{-3}	296.10
Berberina	2.06	1.5×10^{-4}	2.06
	4.13	3.0×10^{-4}	4.13
	8.26	6.0×10^{-4}	8.26
	16.52	1.2×10^{-3}	16.52
	33.04	2.4×10^{-3}	33.04
	66.08	4.8×10^{-3}	66.09
	132.17	9.6×10^{-3}	132.18

6.8.2. Representación gráfica de la interacción

La representación gráfica de las interacciones en forma de isobolas (curvas isoeffectivas o isobologramas), que es una forma simple de visualizar las interacciones, facilitaron la interpretación de las interacciones entre el salbutamol y el bromuro de ipratropio, la berberina o el extracto de *Bougainvillea sp.* El isobograma fue construido conectando el valor de la CE_{50} del fármaco menos activo en el eje de las abscisas con el valor de la CE_{50} del fármaco más activo en el eje de las ordenadas para obtener la línea de aditividad (Tallarida, 2000). La cantidad de cada componente en la combinación [dosis experimental (Z_{exp}) y la dosis efectiva teórica (Z_{ad})] se representaron en la misma gráfica. Los valores de las dosis aditivas teóricas caen sobre la línea que conecta los valores de las CE_{50} de los fármacos individuales. Los valores de las concentraciones experimentales

que cayeron abajo y a la izquierda de la línea de *aditividad* y fuera de la zona de aditividad se consideraron para indicar un efecto sinergista o *superaditivo*, en tanto que los valores de las concentraciones experimentales que cayeron arriba y a la derecha de la línea de aditividad, y de igual forma fuera de la zona de aditividad indicaron una interacción atenuante o *subaditiva*.

VI. RESULTADOS

En la Figura 6, se muestran las curvas concentración-respuesta del efecto relajante de los extractos de hexano, de diclorometano, de metanol y acuoso de la *Bougainvillea sp* en anillos de tráquea de cobayo. El extracto de diclorometano/metanol (1:1) y el acuoso fueron los extractos más activos. Los otros extractos presentaron una relajación menor al 40%.

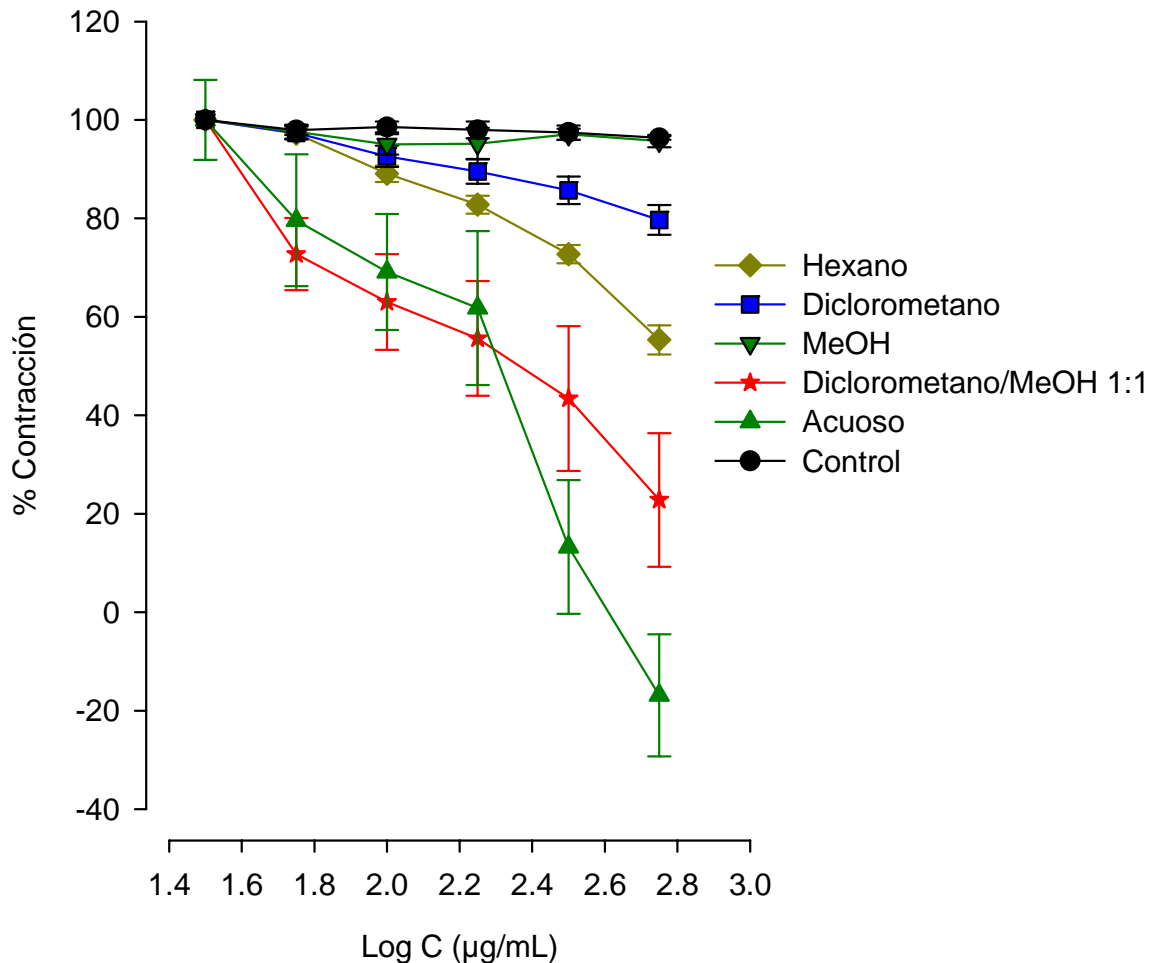


Figura 6. Efecto relajante de los extractos de *Bougainvillea sp* en tráquea aislada de cobayo. Cada punto corresponde a la media \pm EEM de al menos 6 repeticiones provenientes de al menos 3 animales.

Aún cuando el extracto hexánico presentó un efecto moderado se decidió fraccionarlo por cromatografía en columna. En la Figura 7, se muestra la actividad relajante de las fracciones obtenidas en la separación por cromatografía en columna para el extracto hexánico. Se puede observar que la fracción hexano/acetato de etilo 7:3 es la más activa ($CE_{50} = 225 \pm 23.5 \mu\text{g/mL}$) y con la que se alcanzó una relajación del 100%. Al igual que en el fraccionamiento primario, las otras fracciones presentaron una relajación menor al 50%.

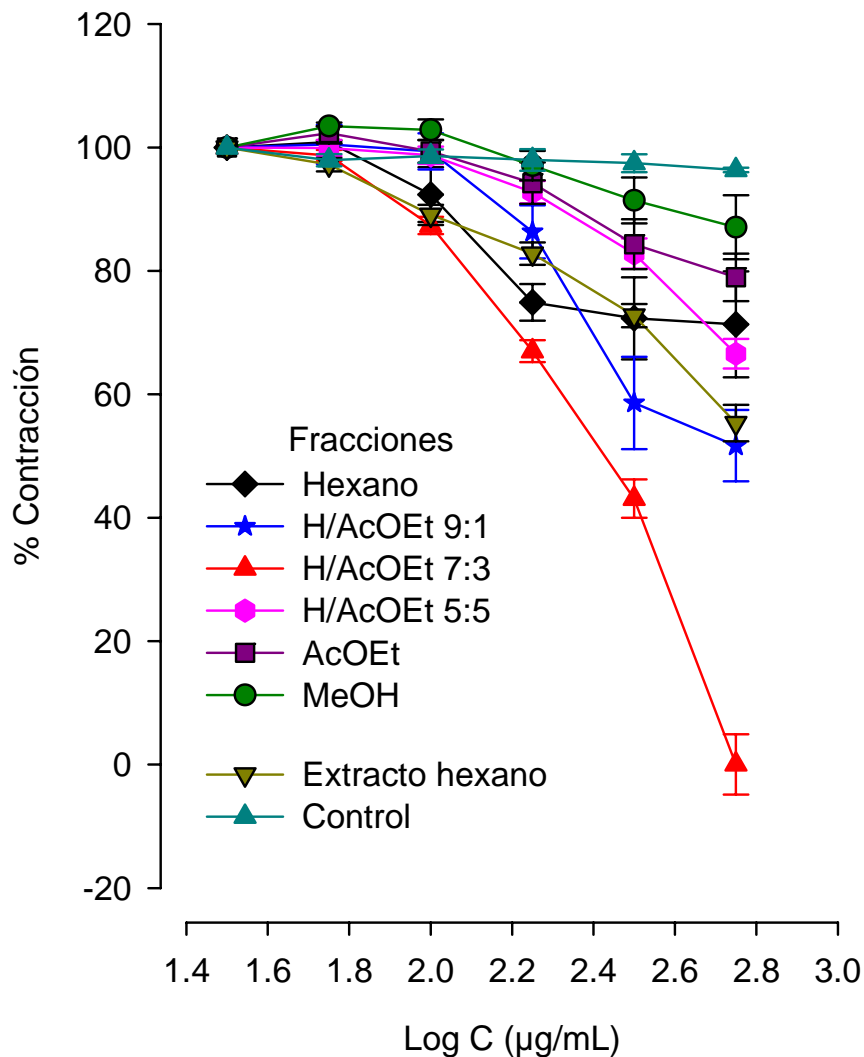


Figura 7. Efecto relajante de las fracciones del extracto hexánico de *Bougainvillea sp* en tráquea aislada de cobayo. Cada punto corresponde a la media \pm EEM de al menos 6 repeticiones provenientes de al menos 3 animales.

En la Figura 8 se presentan las curvas concentración-respuesta del efecto relajante de los extractos de diclorometano/metanol (1:1) de poleo, toronjil morado y saúco. En donde se puede observar que el saúco ($CE_{50} = 52.18 \pm 6.04 \mu\text{g/mL}$) es el de mayor potencia seguida del toronjil morado ($CE_{50} = 89.66 \pm 8.62 \mu\text{g/mL}$) y por último el poleo ($CE_{50} = 100.98 \pm 8.23 \mu\text{g/mL}$) (Cuadro 8). Aunque el saúco presenta menor eficacia.

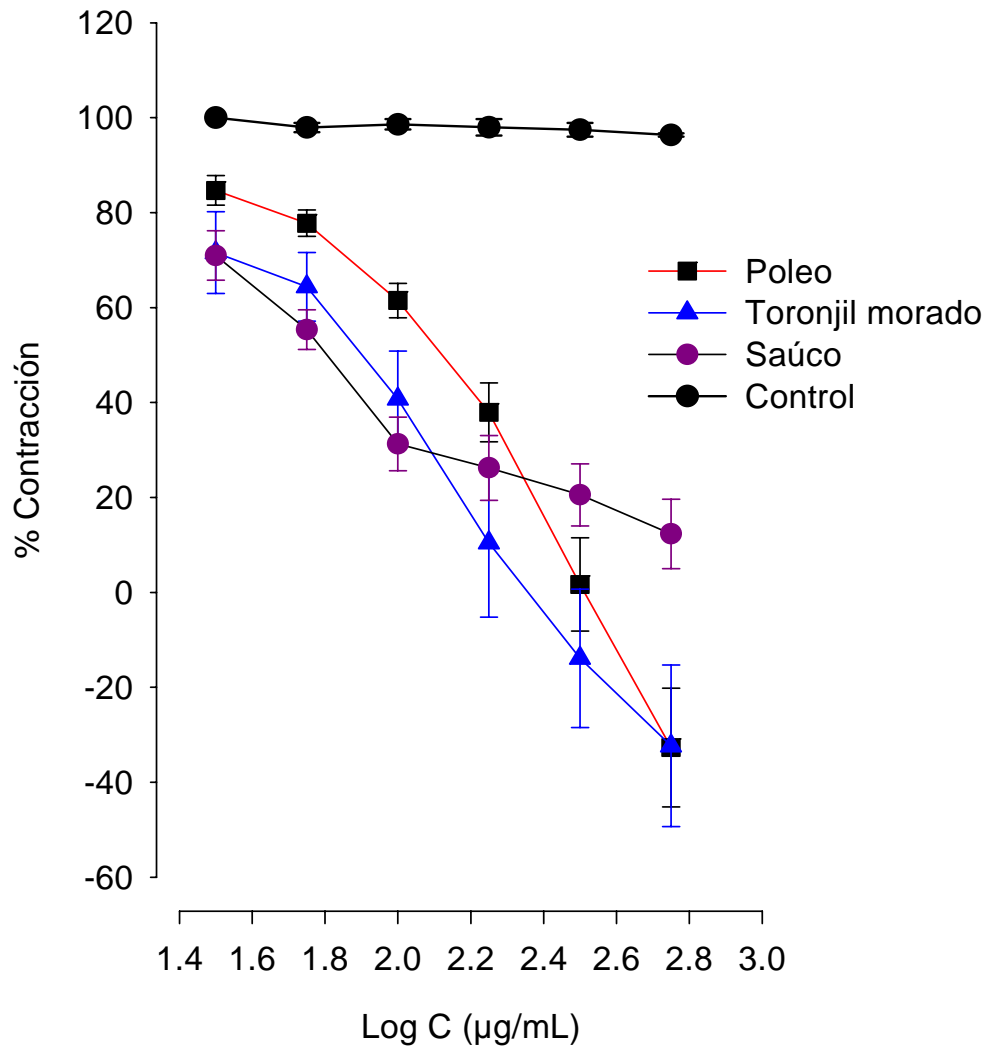


Figura 8. Efecto relajante de los extractos diclorometano/metanol (1:1) de poleo, toronjil morado y saúco en tráquea aislada de cobayo. Cada punto corresponde a la media \pm EEM de al menos 6 repeticiones provenientes de al menos 3 animales.

En la Figura 9 se muestran las curvas concentración-respuesta del efecto relajante de los aceites esenciales en el músculo liso de la tráquea de cobayo. El aceite con mayor potencia fue el de axihuitl (CE_{50} $69.12 \pm 7.63 \mu\text{g/mL}$), seguido de axocopaque ($80.58 \pm 7.48 \mu\text{g/mL}$), toronjil morado ($88.94 \pm 7.88 \mu\text{g/mL}$) último axocopaque bidestilado ($95.40 \pm 8.80 \mu\text{g/mL}$)(Cuadro 8).

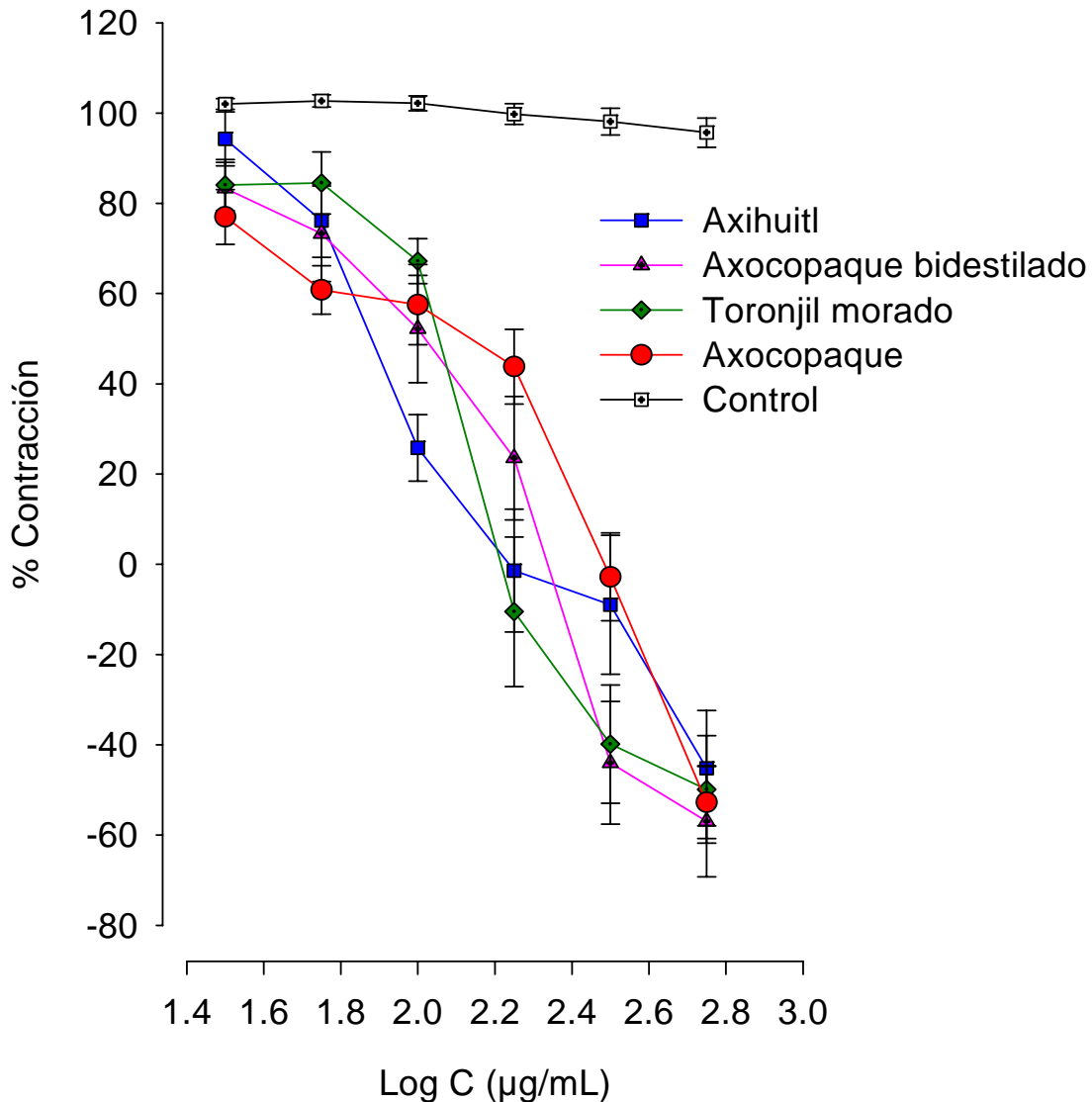


Figura 9. Efecto relajante de los aceites esenciales en tráquea aislada de cobayo. Cada punto corresponde a la media \pm EEM de al menos 6 repeticiones provenientes de al menos 3 animales.

Cuadro 8. Valores de las CE_{50} de las sustancias evaluadas

Fármacos	$CE_{50} \pm EEM$ ($\mu\text{g/mL}$)
Bromuro de Ipratropio	$8.05 \times 10^{-4} \pm 7.17 \times 10^{-5}$
Salbutamol	$9.6 \times 10^{-3} \pm 3.0 \times 10^{-3}$
Berberina	44.05 ± 1.45
<hr/>	
Extractos y fracciones de <i>Bougainvillea sp</i>	$CE_{50} \pm EEM$ ($\mu\text{g/mL}$)
Diclorometano/MeOH 1:1	197 ± 41.2
Hex/AcOet 7:3	225 ± 23.5
Acuoso	229 ± 7.1
<hr/>	
Extractos CH_2Cl_2 / MeOH (1:1) de plantas	$CE_{50} \pm EEM$ ($\mu\text{g/mL}$)
Saúco (<i>Sambucus nigra</i>)	52.18 ± 6.04
Toronjil morado (<i>Agastache mexicana</i>)	89.66 ± 8.62
Poleo (<i>Mentha pulegium</i>)	100.98 ± 8.23
<hr/>	
Aceites esenciales	$CE_{50} \pm EEM$ ($\mu\text{g/mL}$)
Axihuitl (<i>Eupatorium aschenbornianum</i>)	69.12 ± 7.63
Axocopaque (<i>Gaultheria procumbens</i>)	80.58 ± 7.48
Toronjil Morado (<i>Agastache mexicana</i>)	88.94 ± 7.88
Axocopaque (<i>G. procumbens</i>) bidestilado	95.40 ± 8.80

Los aceites esenciales de axocopaque (*Gaultheria procumbens*), toronjil morado (*Agastache mexicana*) y axihuitl (*Eupatorium aschenbornianum*), se analizaron por cromatografía de gases / acoplados a espectrometría de masas.

En la Figura 10 el cromatograma del aceite de axocopaque (*Gaultheria procumbens*) muestra la presencia de un solo compuesto que por su espectro de masas se identificó como salicilato de metilo por la comparación con la Biblioteca NIST versión 2.0 que se observan en las Figuras 11 y 12 respectivamente, aunado al olor característico de esta sustancia.

El cromatograma del aceite del toronjil morado (*Agastache mexicana*) (Figura 13) muestra dos compuestos mayoritarios; uno a un tiempo de retención de 5.98 min que se identificó como limoneno (Figura 14) y otro, a 7.3 min identificado como anisol (Figura 16), por comparación con la Biblioteca NIST versión 2.0 (Figuras 15 y 17).

Para el aceite esencial de axihuitl (*Eupatorium aschenbornianum*) en el cromatograma (Figura 18) se muestran varios compuestos que no fueron identificados.

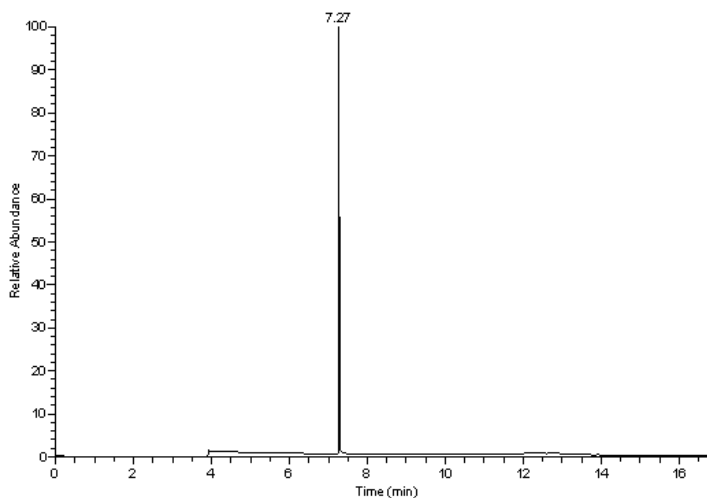


Figura 10. Cromatograma de gases del aceite esencial de Axocopaque (*Gaultheria procumbens*).

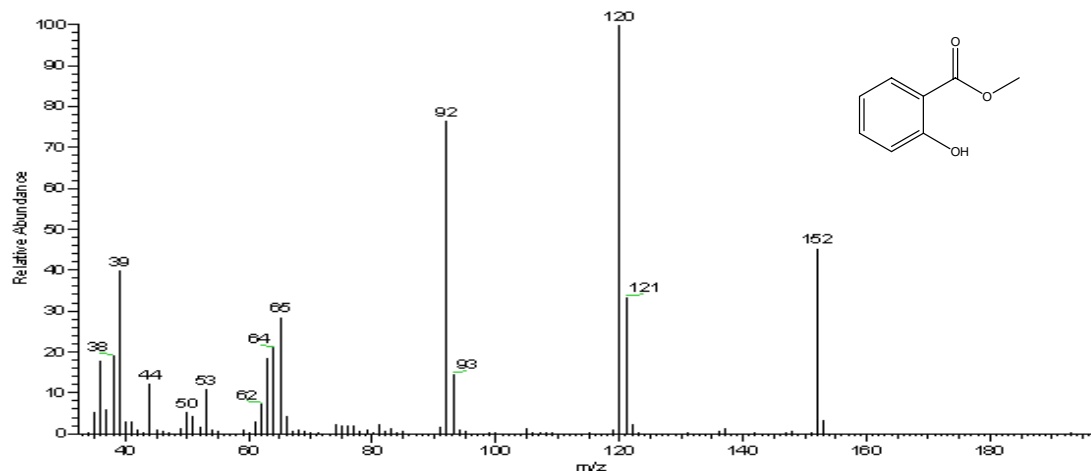


Figura 11. Espectro de masas del salicilato de metilo del aceite de axocopaque.

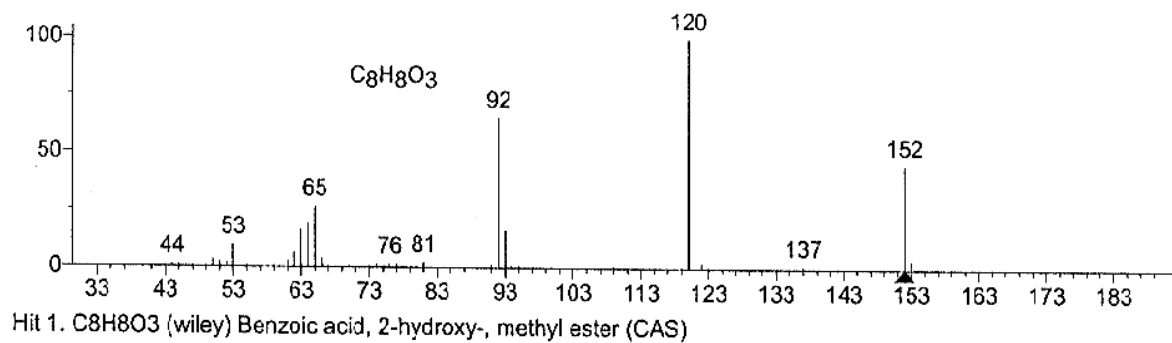


Figura 12. Espectro de masas del salicilato de metilo de la Biblioteca NIST versión 2.0.

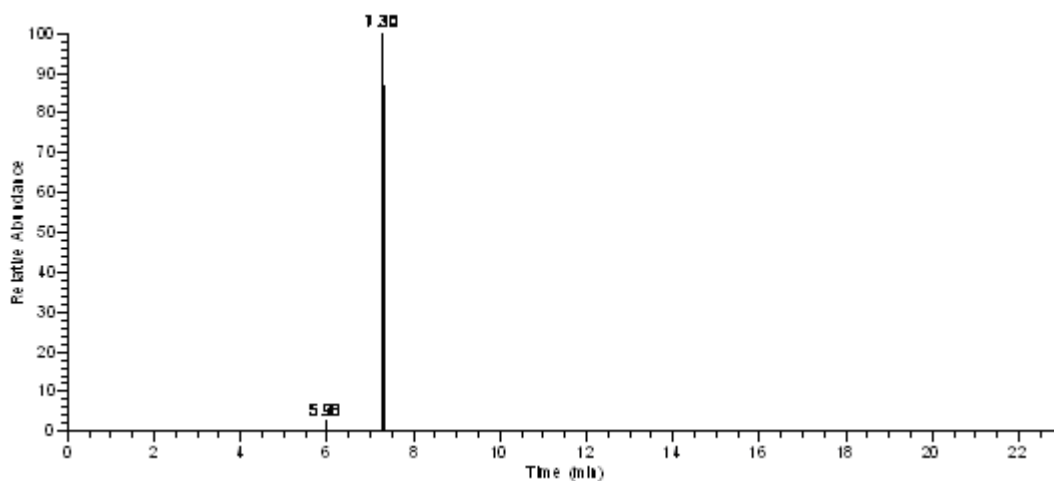


Figura 13. Cromatograma de gases del aceite esencial de toronjil morado (*Agastache mexicana*).

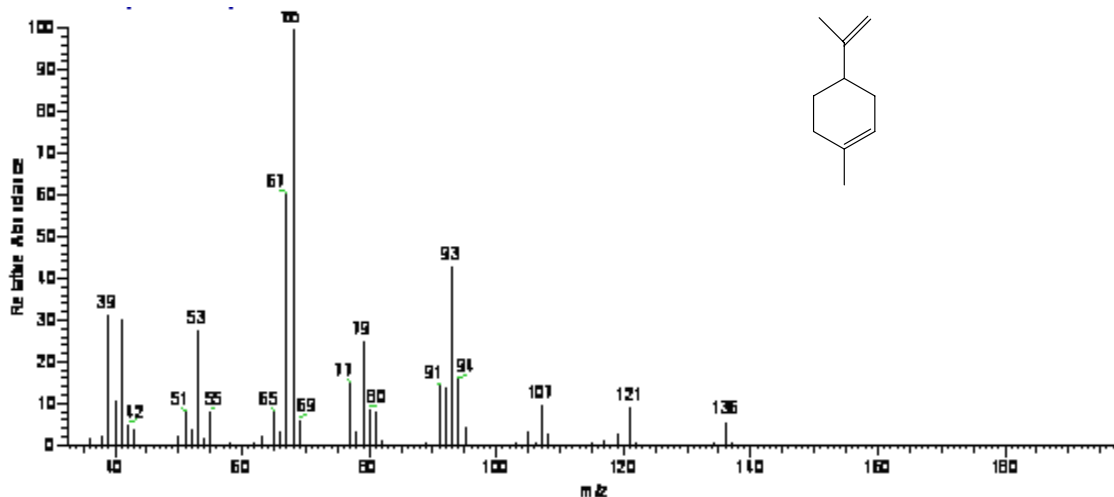


Figura 14. Espectros de masas de limoneno del aceite de toronjil morado.

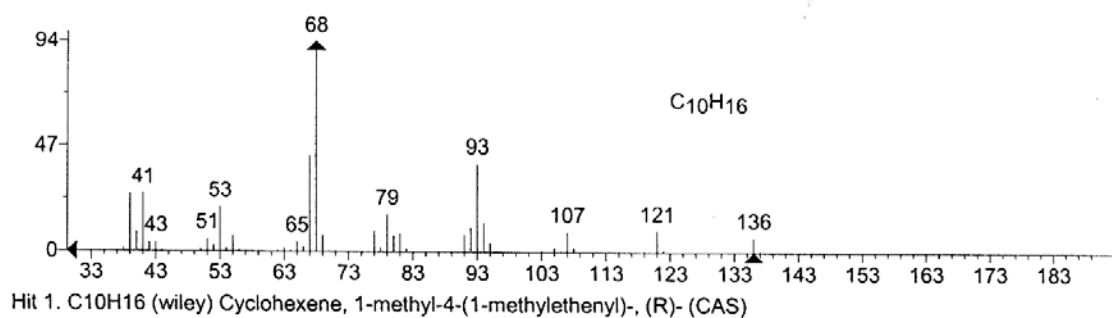


Figura 15. Espectro de masas de limoneno de la Biblioteca NIST versión 2.0.

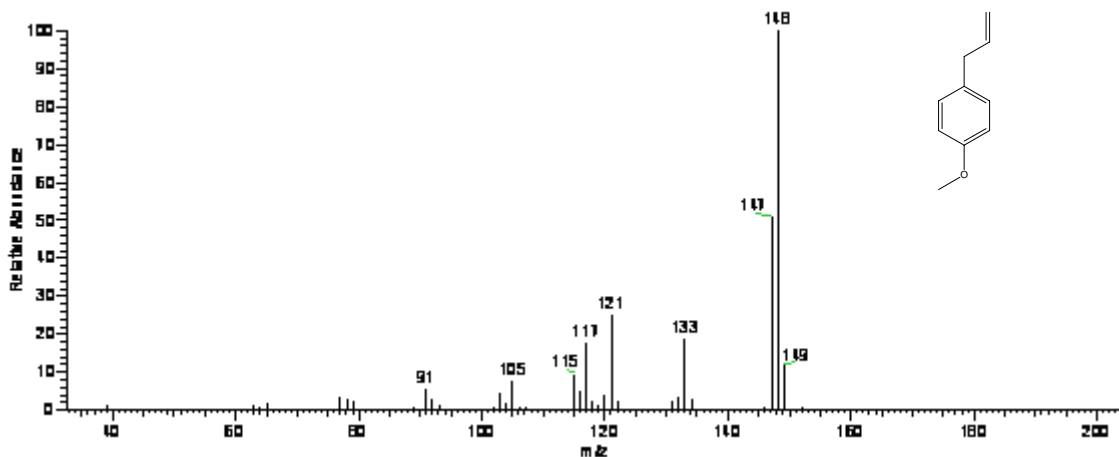
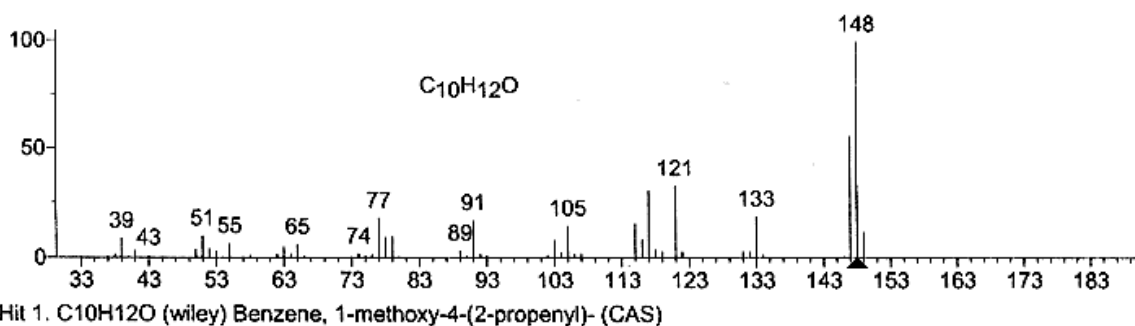


Figura 16. Espectro de masa de anisol del aceite de toronjil morado.



Hit 1. $C_{10}H_{12}O$ (wiley) Benzene, 1-methoxy-4-(2-propenyl)- (CAS)

Figura 17. Espectro de masas de anisol de la Biblioteca NIST versión 2.0.

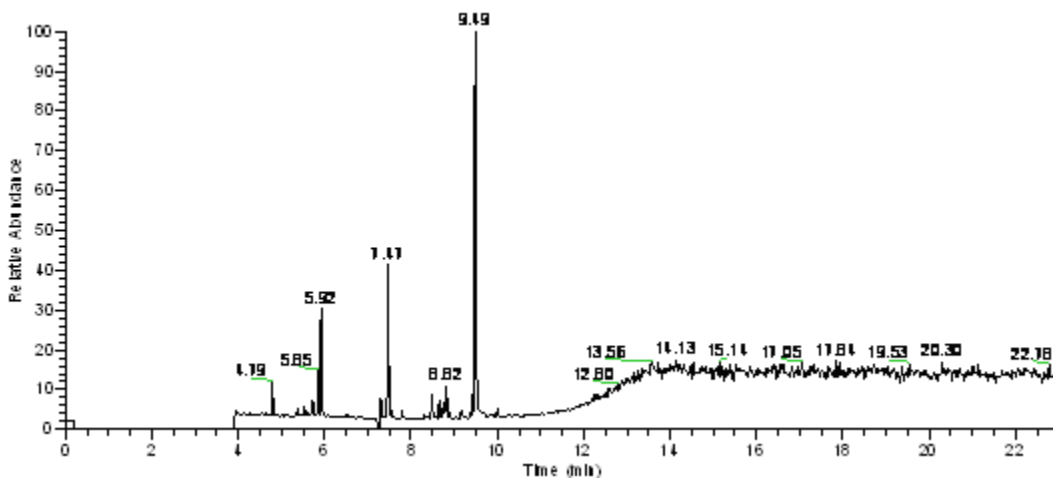


Figura 18. Cromatograma de gases del aceite esencial de Axihitl (*Eupatorium aschenbornianum*)

En la Figura 19 se muestran las curvas concentración-respuesta del efecto relajante de salbutamol, bromuro de ipratropio y berberina y en el Cuadro 8 se resumen los valores de la CE_{50} para estos compuestos.

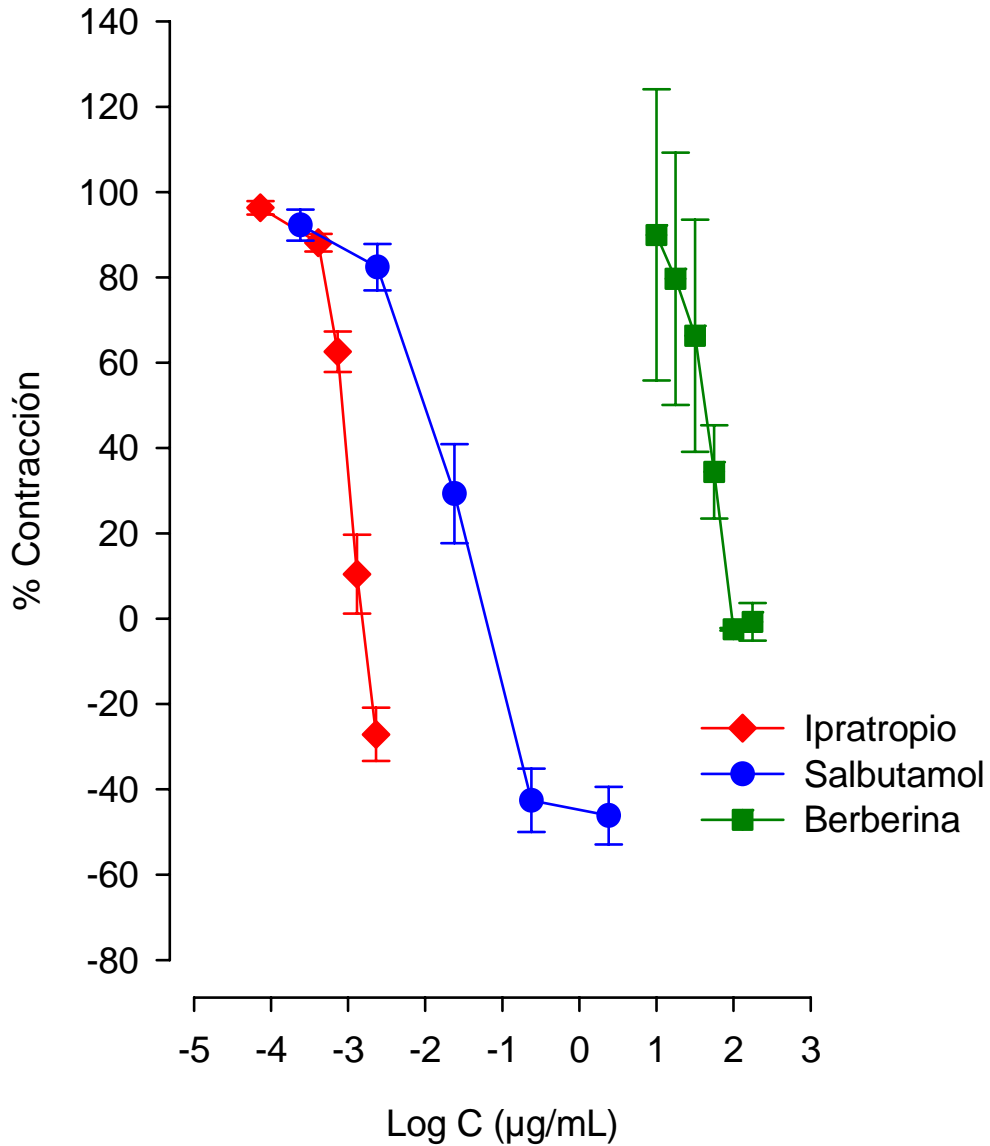


Figura 19. Efecto relajante de bromuro de ipratropio, salbutamol y berberina. Cada punto corresponde a la media \pm EEM de al menos 6 repeticiones provenientes de al menos 3 animales.

Con los valores de la CE_{50} se calcularon las concentraciones aditivas teóricas (Z_{ad}). Con la finalidad de ejemplificar el cálculo de Z_{ad} , por la relación $Z_{ad} = fA + (1-f)B$, se presenta el cálculo de Z_{ad} para la combinación salbutamol: extracto de diclorometano/metanol (1:1) de bugambilia: Para el caso en el que se estableció una relación fija 1:3 el valor de $f = 0.25$; $A = CE_{50}$ para salbutamol = $9.6 \times 10^{-3} \pm 3.0 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$; $1-f = (1-0.25) = 0.75$; $B = CE_{50}$ para el extracto de bugambilia = $197.4 \pm 41.2 \mu\text{g/mL}$, por lo que $Z_{ad} = 0.25*(9.6 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}) + 0.75*(197.4\mu\text{g/mL})$; entonces $Z_{ad} = 0.0024 \mu\text{g/mL} + 148.05 \mu\text{g/mL}$, de donde finalmente $Z_{ad} = 148.0524 \mu\text{g/mL}$. Con base en este valor se calcularon las dosis a utilizar de cada fármaco en la combinación para construir las curvas concentración-respuesta, con 5 niveles de concentración: el valor de la Z_{ad} , dos niveles superiores y dos niveles inferiores al valor de Z_{ad} calculado. Las CE_{50} de cada fármaco en la combinación y las concentraciones totales utilizadas para aplicar a los tejidos se muestran en el Cuadro 7. Los valores de teóricos (Z_{ad}) y experimentales (Z_{exp}) para cada combinación ensayada se presentan en el Cuadro 9.

En la Figura 20 se presentan las curvas concentración-respuesta de la interacción entre salbutamol y el extracto de diclorometano/metanol (1:1) de *Bougainvillea sp* para las combinaciones 1:3, 1:1, 3:1. Igualmente en las Figura 21 y 22 se presentan las curvas concentración respuesta de la interacción entre salbutamol y berberina y entre salbutamol e ipratropio respectivamente.

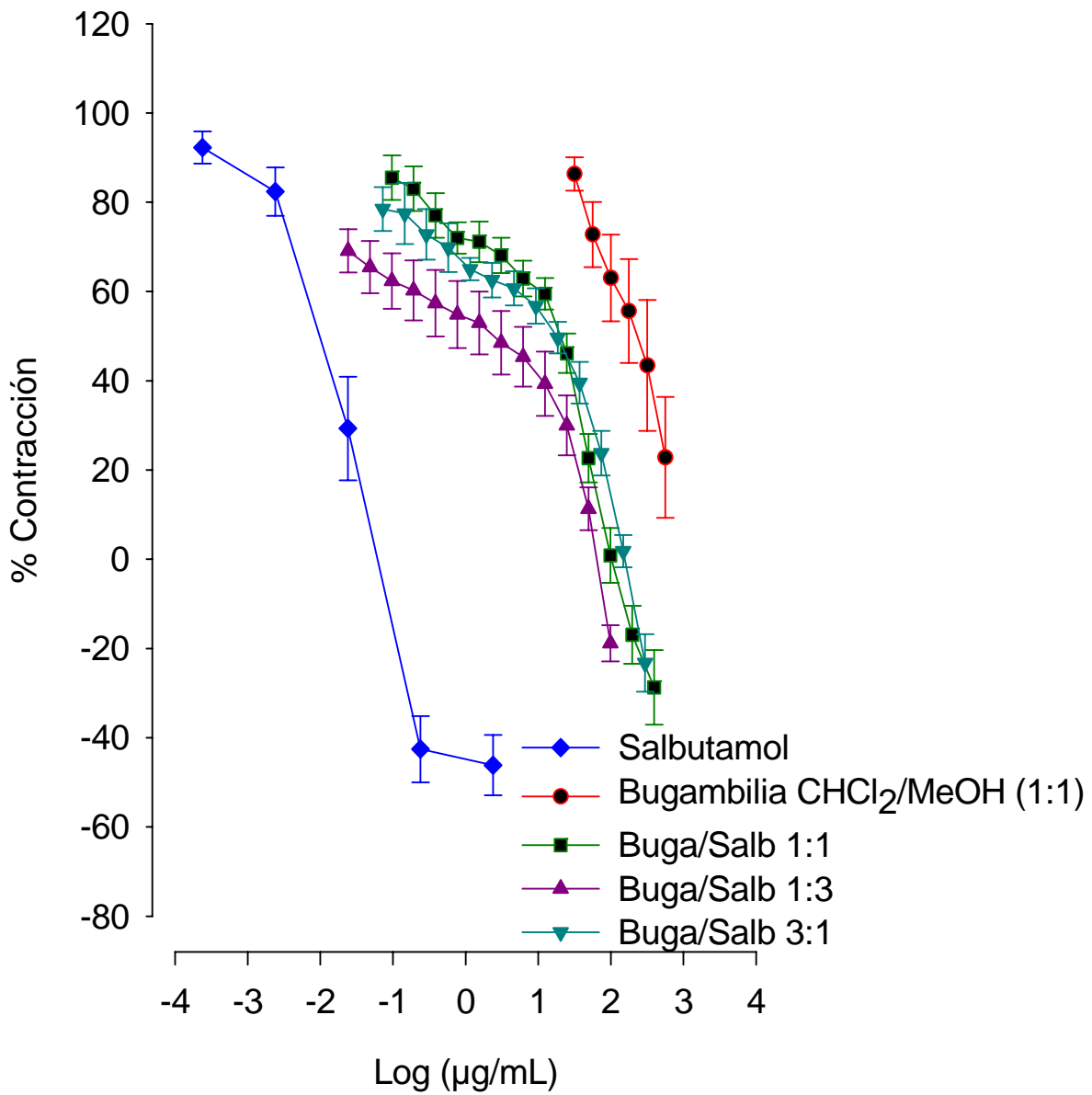


Figura 20. Efecto relajante de fármacos y extracto diclorometano/metanol de *Bougainvillea sp* en forma individual y en combinación 3:1, 1:1, 1:3. Cada punto corresponde a la media \pm EEM de al menos 6 repeticiones provenientes de al menos 3 animales.

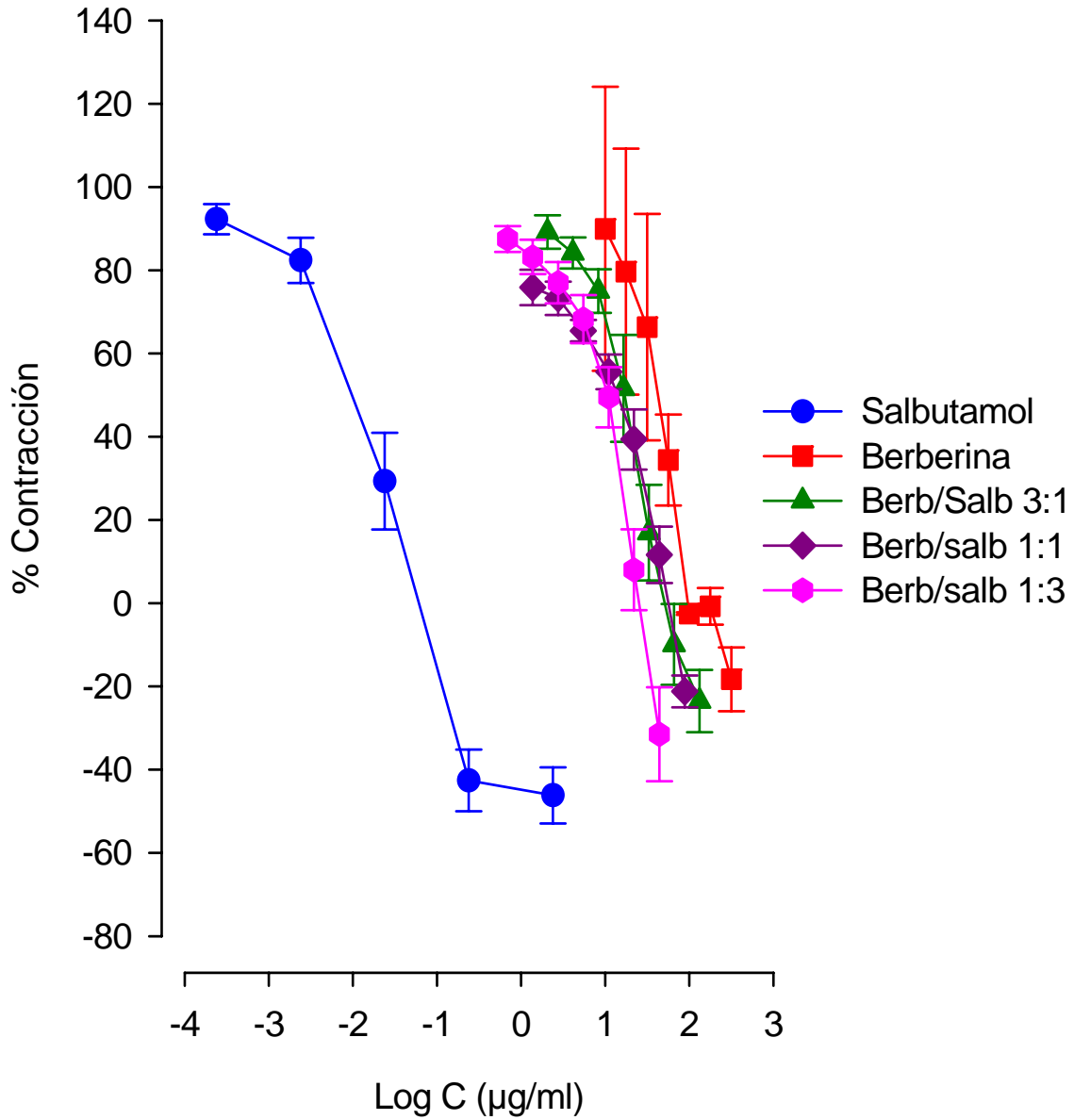


Figura 21. Efecto relajante del salbutamol y berberina en forma individual y en combinación 3:1, 1:1 y 1:3. Cada punto corresponde a la media \pm EEM de al menos 6 repeticiones provenientes de al menos 3 animales.

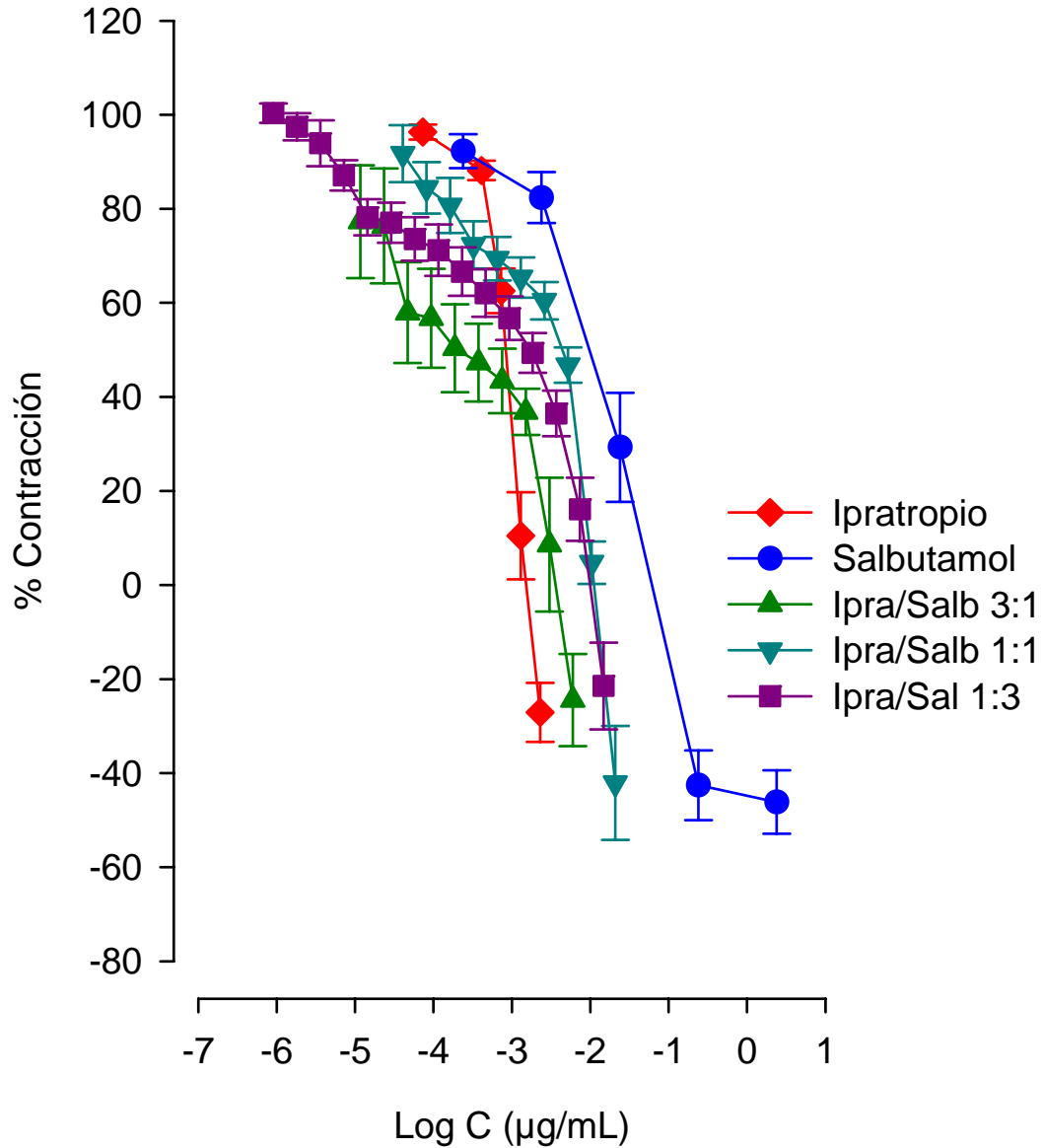


Figura 22. Efecto relajante del salbutamol y bromuro de ipratropio en forma individual y en combinación 3:1, 1:1 y 1:3. Cada punto corresponde a la media \pm EEM de al menos 6 repeticiones provenientes de al menos 3 animales.

El isoblograma para la interacción entre salbutamol y el extracto de diclorometano/metanol (1:1) (Figura 23) para las combinaciones fijas 3:1, 1:1 y 1:3 resultaron en una interacción sinergista o superaditiva, encontrándose diferencias significativas entre los valores de Z_{ad} y Z_{exp} para cada una de las combinaciones evaluadas.

En el isoblograma los círculos representan los puntos teóricos (Z_{ad}) y los triángulos representan los puntos experimentales (Z_{exp}). Los cuadros corresponden a la CE_{50} de las sustancias individuales. En el isoblograma para la interacción salbutamol + berberina (Figura 24), se observa una interacción de tipo sinergista en las combinaciones 1:1 y 1:3 con una diferencia estadística de $p < 0.05$ y la combinación 3:1 se interpretó como una interacción de tipo aditivo debido a que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre Z_{ad} y Z_{exp} .

El estudio de la interacción de salbutamol con bromuro de ipratropio, utilizados como fármacos de referencia se muestra en la Figura 25 en donde se observa una interacción de tipo sinergista en las combinaciones 3:1 y 1:3, con una diferencia estadística de $p < 0.05$, en tanto que con la combinación 1:1 se encontró una interacción de tipo aditivo al no existir una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los valores para Z_{ad} y Z_{exp} . Los valores para Z_{ad} y Z_{exp} se muestran en el Cuadro 9, así como la magnitud de la interacción.

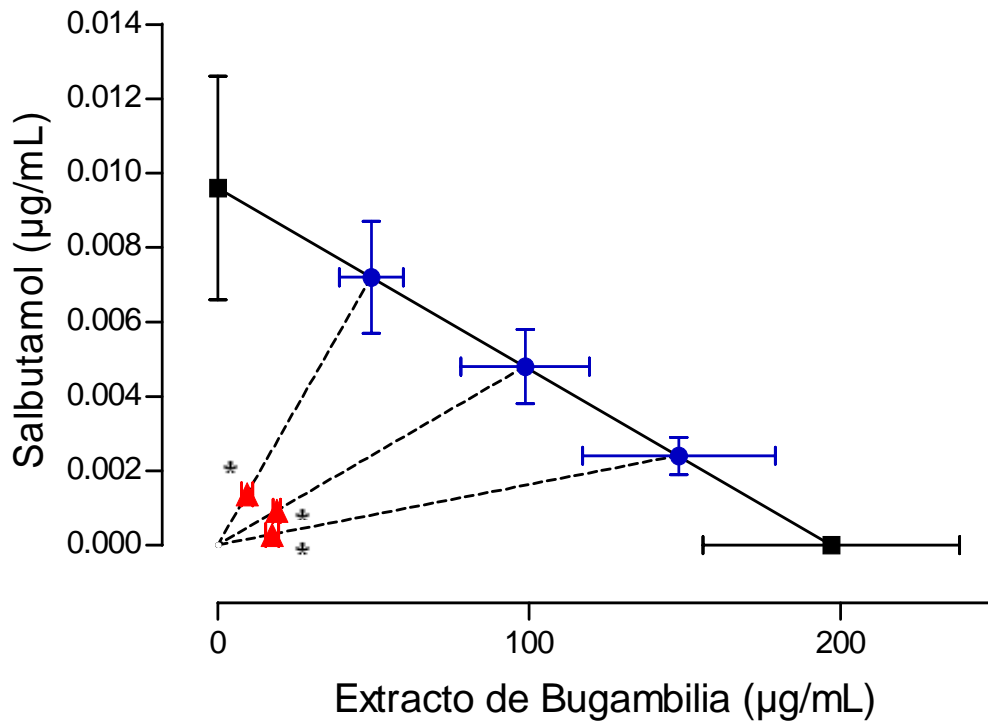


Figura 23. Isoblograma de la interacción del salbutamol y el extracto diclorometano/methanol (1:1) de *Bougainvillea sp* en proporciones 3:1, 1:1 y 1:3. Cada punto corresponde a la media \pm EEM de al menos 6 repeticiones provenientes de al menos 3 animales.*diferencia significativa ($p < 0.05$) entre Zad y Zexp

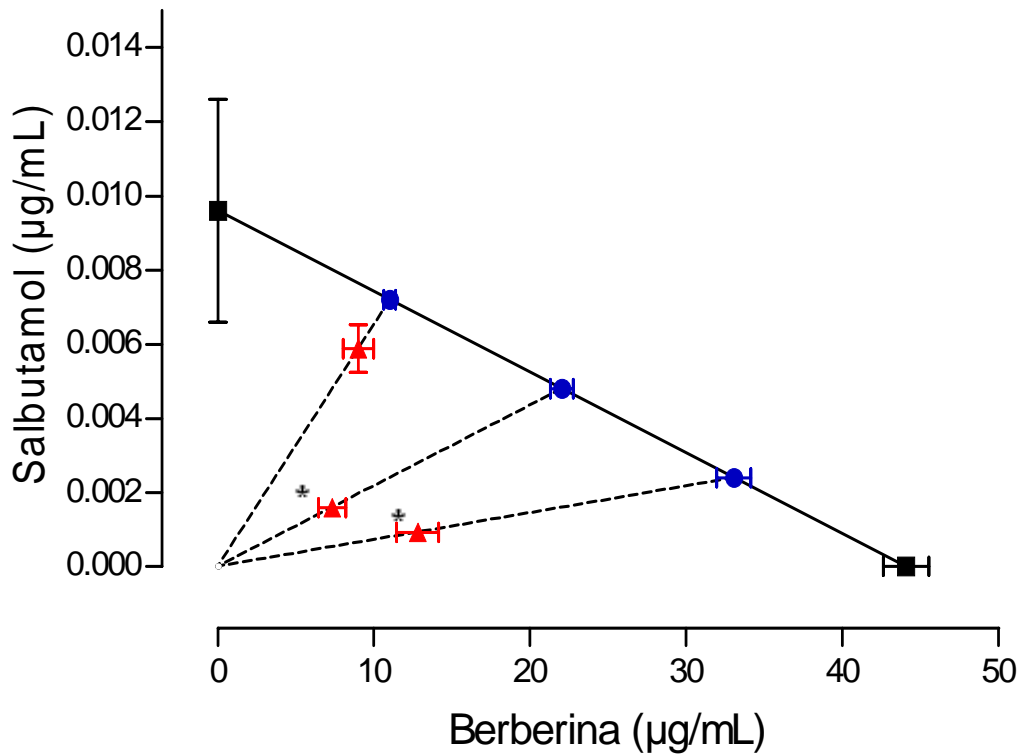


Figura 24. Isoblograma de la interacción de salbutamol y berberina en proporciones 3:1, 1:1 y 1:3. Cada punto corresponde a la media \pm EEM de al menos 6 repeticiones provenientes de al menos 3 animales.*diferencia significativa ($p < 0.05$) entre Zad y Zexp

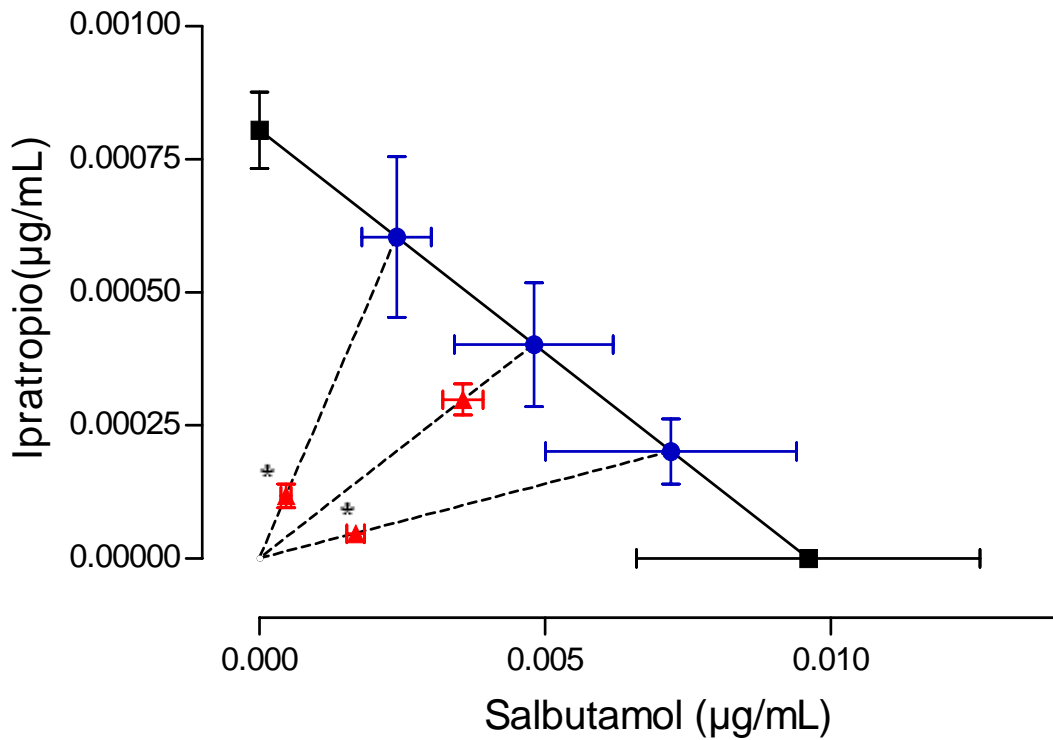


Figura 25. Isoblograma de la interacción de salbutamol con bromuro de ipratropio en combinaciones 3:1, 1:1 y 1:3. Cada punto corresponde a la media \pm EEM de al menos 6 repeticiones provenientes de al menos 3 animales. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre Zad y Zexp

Cuadro 9. Valores de Z_{ad} y $Z_{exp} \pm EEM$ para la administración conjunta de salbutamol con fármacos y extractos relajantes del músculo liso traqueal en diferentes proporciones.

Combinación	Proporción	$Z_{ad} \pm EEM$ ($\mu\text{g/mL}$)	$Z_{ex} \pm EEM$ ($\mu\text{g/mL}$)	Magnitud de la interacción ^a
Salbutamol: Ipratropio	3:1	0.0074 \pm 0.0022	0.00173 \pm 0.00015	0.23*
	1:1	0.0052 \pm 0.0015	0.0038 \pm 0.00038	0.74
	1:3	0.003 \pm 0.00075	0.00058 \pm 0.00011	0.19*
Salbutamol: Bugambilia	3:1	49.35 \pm 10.30	9.41 \pm 1.77	0.19*
	1:1	98.70 \pm 20.60	19.00 \pm 1.15	0.19*
	1:3	148.05 \pm 30.90	17.47 \pm 2.1	0.11*
Salbutamol: Berberina	3:1	11.0 \pm 0.36	8.99 \pm 0.36	0.81
	1:1	22.03 \pm 0.72	7.33 \pm 0.87	0.33*
	1:3	33.0 \pm 1.08	12.78 \pm 1.35	0.38*

^a De acuerdo a la relación: $a/A + b/B$, ver la sección de resultados para el ejemplo del cálculo de estos valores. * diferencia significativa ($p < 0.05$) entre Z_{ad} y Z_{exp} .

VIII. DISCUSIÓN

A lo largo de mucho tiempo las plantas medicinales se han utilizado para múltiples padecimientos. Entre los usos más comunes se encuentra el uso en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias. Las plantas aquí evaluadas son algunas plantas comúnmente utilizadas para estos fines en la medicina tradicional Mexicana, sin embargo no se habían sometido a pruebas farmacológicas que permitieran validar su uso tradicional. En mayor o menor medida todas las plantas evaluadas presentaron efecto relajante sobre el músculo liso traqueal. El saúco presentó la mayor potencia en el efecto relajante seguido en orden de potencia por toronjil morado, poleo y bugambilia (Cuadro 8), cuando se prepararon los extractos diclorometano/metanol (1:1). Con respecto a los aceites esenciales, el axihuitl presentó mayor potencia en el efecto relajante, seguido por los aceites de axocopaque, toronjil morado y un bidestilado de axocopaque (Cuadro 8).

Se realizó el análisis cromatográfico de gases a los aceites esenciales y comparándolo con espectros de masas de la Biblioteca NIST versión 2.0, encontrándose que el aceite de axocopaque y el bidestilado de este tienen un solo compuesto que corresponde al salicilato de metilo, lo que sugiere que la sustancia responsable de la actividad relajante del músculo liso es el salicilato de metilo. En la literatura no se encontró información sobre la actividad relajante en músculo liso para este compuesto, por lo que este sería el primer informe sobre esta actividad para este compuesto. En el aceite de toronjil morado se identificaron dos compuestos que corresponden al limoneno y al anisol. En este caso se puede asumir que la actividad es debida al anisol, ya que se encuentra en más del 95% en el aceite esencial, sin embargo es importante evaluar estos dos compuestos por separado. No obstante, la actividad relajante para ambos compuestos no ha sido descrita anteriormente. Para anisol se ha descrito actividad antifúngica (Shin y Pyun, 2004), termiticida (Yatagai *et al.*, 2002), nematocida (Fujita y Kubo., 2004) y para limoneno actividad antimicrobiana (Aligiannis *et al.*, 2004), antiprotozoaria (Kamatou *et al.*, 2007), antimicrobial, anti-inflamatoria (Viljoen *et al.*, 2006),

insecticida (Zhang *et al* 2003), es utilizado en quimioterapia para el tratamiento del cáncer (Chow *et al.*, 2002) y actividad citotóxica (Setzer *et al.*, 1999). Por último el aceite de axihuitl el cual contiene varios compuestos según el cromatograma de gases, sin embargo no se pudieron identificar, ya que los espectros de masas no coincidían con algún compuesto de la Biblioteca NIST versión 2.0, aún así la actividad relajante para este aceite quedó bien demostrada en este estudio.

La bugambilia es una de las plantas con mayor reputación en el tratamiento del asma, motivo por la cual se decidió realizar el estudio de otros extractos y fracciones derivados de la misma. El extracto acuoso ($CE_{50} = 197 \pm 41.2 \mu\text{g/mL}$), el extracto de diclorometano/metanol (1:1) ($CE_{50} = 229 \pm 7.1 \mu\text{g/mL}$) y la fracción derivada del extracto hexánico, eluida con Hexano/acetato de etilo (7:3 v/v) ($CE_{50} = 225 \pm 23.5 \mu\text{g/mL}$) presentan efecto relajante muy parecido. Lo anterior se puede deber a que todos estos extractos tienen la misma coloración y dada la diversidad de betacianinas es probable que se distribuyan en los diferentes extractos y que se deba a ello que el efecto sea muy parecido. Sin embargo se requiere de estudios adicionales para poder confirmar lo anterior.

Considerando igualmente que la bugambilia es de las plantas más utilizadas para el tratamiento del asma, fue de interés saber si el uso concomitante del extracto de la planta con uno de los fármacos más utilizados en la clínica, presentaba interacción. Para probar lo anterior se realizó el estudio de la interacción entre el extracto de diclorometano/metanol (1:1) de bugambilia y el fármaco salbutamol. Mediante un análisis isoblográfico fue posible determinar que el efecto relajante de salbutamol se potenció de manera importante cuando se combinó con el extracto de esta planta. Esto puede representar una ventaja ya que como en el caso de la combinación de ipratropio, un antagonista Muscarínico y salbutamol, su combinación resulta benéfica para el tratamiento del asma crónico y de la enfermedad pulmonar crónica obstructiva (EPCO) (Jacoby y Fryer, 2001).

A pesar de que esta es una combinación muy común en la práctica clínica, no hay una explicación a nivel funcional del tipo de interacción que se presenta de esta combinación. Por lo anterior y considerando que se había observado un efecto sinergista entre el extracto de bugambilia y salbutamol, se decidió realizar el análisis isoblográfico de la combinación ipratropio y salbutamol en las mismas proporciones que en la combinación del extracto de buigambilia y salbutamol. A diferencia de la combinación con bugambilia, en la proporción fija 1:1 para ipratropio+salbutamol se encontró una relación aditiva y en las otras dos proporciones evaluadas el efecto relajante de salbutamol se potenció de manera importante (Gráfica 11). Esto puede explicar al menos en parte que la combinación ipratropio:salbutamol dependiendo de la proporción en la que se use se puede potenciar el efecto relajante.

Tomando en cuenta lo anterior es que se consideró a un producto natural, el alcaloide berberina, que recientemente se encontró como el principio activo relajante del músculo traqueal en *Argemone ochroleuca* (Chicalote) y como mecanismo de acción se ha propuesto su efecto anticolinérgico (Sánchez-Mendoza et al., 2007a). La combinación Salbutamol:berberina en la proporción 3:1 presentó una relación aditiva, en cambio en las proporciones 1:1 y 1:3 se presentó un efecto sinergista. Es importante resaltar que las plantas medicinales a pesar de su aparente baja actividad, cuando se combinan con fármacos pueden provocar efectos sinergistas por mecanismos aún no conocidos, como son los casos antes descritos. Por otro lado también es importante mencionar que son pocos los estudios que se han realizado con plantas medicinales con actividad sobre las vías respiratorias y menos aún son los estudios de interacción entre plantas, productos naturales y fármacos de uso clínico para tratar el asma y otras enfermedades obstructivas de las vías respiratorias.

Por otro lado, este trabajo es la primera evidencia de que los aceites de axocopaque (*Gaultheria procumbens*), axihuitl (*Eupatorium aschenbornianum*) y toronjil morado (*Agastache mexicana*) tiene efecto relajante sobre el músculo liso traqueal, así como los extractos de las plantas saúco (*Sambucus mexicana*), poleo (*Mentha pulegium*), toronjil morado (*Agastache mexicana*) y bugambilia (*Bougainvillea sp*).

IX. CONCLUSIONES

En este trabajo se realizó la evaluación de extractos y productos naturales con actividad relajante en el músculo liso traqueal para enfermedades de las vías aéreas y sus interacciones por medio de un análisis isoblográfico, lo que permitió llegar las siguientes conclusiones:

Los extractos de saúco (*Sambucus mexicana*), poleo (*Mentha pulegium*), toronjil morado (*Agastache mexicana*) y bugambilia (*Bougainvillea sp*) y los aceites esenciales de axocopaque (*Gaultheria procumbens*), axihuitl (*Eupatorium aschenbornianum*) y toronjil morado (*Agastache mexicana*) presentaron efecto relajante sobre el músculo liso de la tráquea de cobayo. Lo que proporciona un sustento científico relacionado con su uso tradicional.

Mediante el análisis isoblográfico se determinó que el extracto de diclorometano/metanol (1:1) de *Bougainvillea sp*, el alcaloide berberina y el bromuro de ipratropio presentan una interacción sinérgica del efecto relajante del agonista β_2 -adrenérgico salbutamol en la mayoría de las proporciones evaluadas.

Del aceite esencial de axocopaque se identificó como componente único al salicilato de metilo, del aceite esencial de toronjil morado se identificaron como componentes mayoritarios al limoneno y al anisol. Al mismo tiempo en este trabajo se describe la actividad relajante en el músculo liso traqueal para salicilato de metilo, limoneno y anisol.

X. PERSPECTIVAS

Aún cuando en el presente trabajo se demostró que los aceites esenciales y extractos de algunas plantas medicinales como bugambilia (*Bougainvillea sp*), saúco (*Sambucus mexicana*), poleo (*Mentha pulegium*), toronjil morado (*Agastache mexicana*) y los aceites esenciales de axocopaque (*Gaultheria procumbens*), axihuitl (*Eupatorium aschenbornianum*) y toronjil morado (*Agastache mexicana*), tienen efecto relajante sobre el músculo liso de la tráquea de cobayo, se deben realizar más experimentos que lleven a obtener el o los principio activo responsables de dicha actividad, de igual forma elucidar el mecanismo de acción por el cual actúan estos productos naturales.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Aghel N., Yamini Y., Hadjiakhoondi A., Pourmortazavi S.M. (2004). Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Talanta*. **62**, 407-411.
- Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Kyriakopoulou I., Mitaku S., Chinou I.B. (2004). Essential oils of *Phlomis* species growing in Greece: Chemical composition and antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*. **19**(4), 320-324.
- Arenas L., Hernández I., Josso R., Sotres A. (1999). Promoción de la salud e infecciones respiratorias agudas en México. *Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México*. **12**, 129-132.
- Braido F., Brandi S., Cauglia S., Canonica G. (2005). Overview of novel therapeutic targets of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Review of Clinical Immunology*. **1**, 263-275.
- Brokl M., Flores G., Blanch G.P., Ruiz del Castillo M.L. (2006). Changes in the enantiomeric distribution of selected volatile constituents of *Mentha pulegium* L. Powders caused by hot water treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**, 8836-8841.
- Cáceres A. (1999). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Universitaria. Guatemala. 101-102.
- Calhoun W. J. (2001). Anti-leukotrienes for asthma. *Current Opinion in Pharmacology*. **1**, 230-234.

- Chow H.H. S., Salazar D., Hakim I. A. (2002). Pharmacokinetics of perillid acid in humans after a single dose administration of a citrus preparation rich in d- limonene content. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. **11**(11), 1472-1476.
- DellaGreca M., Florentino A., Monaco P., Previtera L., Simonet A. M. (2002). Degraded cyanogenic glucosides from *Sambucus nigra*. *Tetrahedron Letters*. **41**, 6507-6510.
- Estrada-Reyes R., Aguirre E. A., García-Argáez A., Soto M., Linares E., Bye R., Heinze G., Martínez-Vázquez M. (2004). Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*. *Biochemical Systematics and Ecology*. **32**, 685-694.
- FHEUM (2001). Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. 1ª Edición. México, 19-20.
- Flórez J., Armijo J. A., Mediavilla Á. (1997). *Farmacología Humana*. 3ª Edición., Masson S.A. México: 705-719.
- Fukushima H., Hirano T., Oka K. (2007). *Staphylococcus aureus*-superantigen decreases FKBP51 mRNA expression and cell-response to suppressive efficacy of a glucocorticoid in human peripheral blood mononuclear cells: Possible implication of mitogen-activated protein kinase pathways. *European Journal of Pharmacology*. (Artículo en prensa).
- Fujita K y Kubo, I. (2004). Potentiation of fungicidal activities of trans-anethole against *Saccharomyces cerevisiae* under hypoxic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **98**(6), 490-492.

- Gross N. (2006). Anticholinergic agents in asthma and COPD. *European Journal of Pharmacology*. **533**, 36-39.
- Hall L., Tattersfield A. (1998). *Asthma: basic mechanisms and clinical management*. Academic Press Limited. 651-678.
- Hardman J., Limbird L., and Goodman A. (2001). *Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics*. 10th Edition. Mc Graw Hill. EUA. 707-728.
- Heuer S., Richter S., Metzger J. W., Wray V., Nimtz M., Strack D. (1994) Betacyanins from bracts of *Bougainvilleae glabra*. *Pytochemistry*. **3**, 761-767.
- Jacoby D. B., Fryer A. D. (2001). Anticholinergic therapy for airway diseases. *Life Sciences*. **68**, 2565 -2572.
- Júnior A.L., Medeiros C.A.M, Torres A.L., Chagas N.R. Efeito de extratos acuosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: plutellidae) em couve. *Arqueology Institute Biology*. **72**, 45-50.
- Kalant H. (1998). *Principios de la Farmacología Médica*. 6^a Edición. Oxford University Press. EUA. 503-510.
- Kamatou, G. P. P., Viljoen A. M., Figueiredo A. C., Tilney P. M., Van Zyl R. L., Barroso J. G., Pedro L. G., Van Vuuren S. F. (2007). Trichomes, essential oil composition and biological activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica* Codd, two species from the Cape region of South Africa. *South African Journal of Botany*. **73**(1), 102-108.

- Koike K., Yamashita Y., Horinouchi T., Yamaki F., Tanaka Y. (2004). cAMP-independent mechanism is significantly involved in β 2-adrenoceptor-mediated tracheal relaxation. *European Journal of Pharmacology*. **492**, 65-70.
- Martínez M. *Las plantas medicinales de México*. (1996). Ediciones Botas. México. 84-543.
- Martinez-Vázquez M., Lastra A., Ramírez T., Calderón J., Bye R. (1997). Constituents and anti-inflammatory activity of *Sambucus mexicana*. *Revista Latinoamericana de Química*. **25**:3, 126-127.
- Martínez V. M.A., (2004). Asma y estado asmático CIE-10^a. *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica*. **29**, 1-3.
- Mc Van B. (1995). *Referencias farmacéuticas*. Manual Moderno, México. 954-955.
- Mirza M., Najafpour M.N., Dini M. (2006). Volatile constituents of essential oils isolated from flowers and leaves of *Eupatorium cannabinum* L. from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. **2**, 149-152.
- Montuschi P., Sala A., Dahlén S.E., Folco G. (2007). Pharmacological modulation of the leukotriene pathway in allergic airway disease. *Drug Discovery Today*. **12**, 404-412.
- Mycek M., Harvey R., Champe P. (2007). *Farmacología*. Interamericana. Mc Graw-Hill. México. 78- 262.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. (México Junio 2001).

- Phillipson J.D. (2001). Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*. **56**, 237-243.
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. (2000). *Farmacología*. 4ª Edición. Harcourt. Barcelona. España. 810-815.
- Rios M.Y. Aguilar-Guadarrama A. B.; Navarro V. (2003). Two new benzofuranes from *Eupatorium aschenbornianum* and their antimicrobial activity. *Planta medica*. **69**(10), 967-970.
- Rojas G., Lévaro J., Torteriello J., Navarro V. (2000). Antimicrobial evaluation of certain plants used in mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. **74**, 97-101.
- Sadowska A.M., Klebe B., Germonpré P., De Backera W.A. (2006). Glucocorticosteroids as antioxidants in treatment of asthma and COPD new application for an old medication?. *Steroid*. **72**, 1-6.
- Sánchez-Mendoza M.E., Castillo C., Navarrete A. (2007a). Relaxant action mechanism of berberine identified as the active principle of *Argemone ochroleuca* Sweet in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. (En revisión).
- Sánchez-Mendoza M.E., Torres G., Arrieta J., Aguilar A., Castillo-Henkel C., Navarrete A. (2007b). Mechanisms of relaxant action of a crude hexane extract of *Gnaphalium liebmannii* in guinea pig tracheal smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology*. **111**, 142-147.

- Santing R.E., De Boer J., Rohof A., Van der Zee N.M., Zaagsma J. (2001). Bronchodilatory and anti-inflammatory properties of inhaled selective phosphodiesterase inhibitors in a guinea pig model of allergic asthma. *European Journal of Pharmacology*. **429**, 335-344.
- Setzer W. N., Setzer M. C., Moriarity D. M., Bates R. B., Haber W. A. (1999). Biological activity of the essential oil of *Myrcianthes* sp. nov. "black fruit" from Monteverde, Costa Rica. *Planta Medica*. **65**(5), 468-469.
- Shin S. y Pyun, Mi-Sun. (2004). Anti-Candida effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. *Phytotherapy Research*. **18**(10), 827-830.
- Simon A., Tóth G., Duddeck H., Hesham S., Soliman, Mahmoud I., Samir H. (2006). Glicosides from *Bougainvillea glabra*. *Natural Product Research*. **20**, 63-67.
- Smit J.J., Lukacs N.W. (2005). A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *European Journal of Pharmacology*. **533**, 277-288.
- Taddei-Bringas G., Santillana-Macedo M., Romero-Cancio J., Romero-Téllez M. (1999). Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar. *Salud Pública en México*. **41**, 216-220.
- Tallarida R. (2000). *Drug synergism and dose effect data análisis*. Chapman & Hall/CRC, USA.
- Tallarida R, Kimmel H., Holtzman S. (1997a). Theory and statistic of detecting synergism between two active drugs: cocaine and buprenorphine. *Psycopharmacology*. **133**, 378-382.

Tallarida R. Stone D., Raffa R. (1997b). Efficient designs for studying synergistic drug combinations. *Life Sciences*. **61**,PL 417-425.

Towers G.H.N., Tse A., Maass W.S.G. (1996). Phenolic acids and phenolic glycosides of *Gaultheria* species. *Phytochemistry*, **5**, 677 - 681.

Unicini R.E., Zaccaro L., Tomei P.E. (2005). Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria difusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. *Journal of Ethnopharmacology*. **98**, 323-327.

Velásquez. (1993). *Farmacología*. 16ª Edición. Interamericana. Mc Graw-Hill. México. 743-751.

Viljoen A. M., Moolla A., van Vuuren S. F., van Zyl R. L., Baser K. H. C., Demirci B., Ozek T., Trinder-Smith T. H. (2006). The biological activity and essential oil composition of 17 *Agathosma* (Rutaceae) species. *Journal of Essential Oil Research*. **18**, 2-16.

Villagómez M.A. (2007). Análisis isobolográfico de la interacción entre fármacos depresores del sistema nervioso central y el flavonoide hesperidina. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Vogel H.G. (2002). *Drug discovery and evaluation. Pharmacological Assays*. 2nd Edition. Springer. EU. 353-354.

Wang H., Robinson H and Ke H. (2007). The molecular basis for different recognition of substrates by phosphodiesterase families 4 and 10. *Journal of Molecular Biology*. **371**, 302-307.

Yatagai M., Nishimoto M., Hori K., Ohira T., Shibata A. (2002), Termiticidal activity of wood vinegar, its components and their homologues. *Journal of Wood Science*. **48**(4), 338-342.

Zhang M., Ling B., Kong C., Pang X., Liang G. (2003). Chemical components of volatile oil from *Mikania micrantha* and its biological activity on insects. *Yingyong Shengtai Xuebao*. **14**(1), 93-96.