



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad
anticonvulsiva de los extractos orgánicos de *Casimiroa
calderoniae***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Martha Beatriz Enríquez Espejel



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 asignado

Presidente	Prof. Rafael Ri3n Arriola
Vocal	Prof. Francisco Hern3ndez Luis
Secretario	Prof. Hortensia Parra Delgado
1er sup.	Prof. Irma Susana Rojas Tom3
2do sup.	Prof. Ruth Bustamante Garc3a

Sitios en donde se desarroll3 el tema

El presente estudio se realiz3 en el Laboratorio 1-4 del Instituto de Qu3mica de la Universidad Nacional Aut3noma de M3xico, como parte del proyecto multidisciplinario "Estudio qu3mico y evaluaci3n de las actividades ansiol3ticas, anticonvulsivantes y antidepresivas de las especies *Casimiroa calderoniae* y *Casimiroa pubescens*", el cual es coordinado por el Dr. Mariano Mart3nez V3zquez.

Asesor del Tema

Dra. Hortensia Parra Delgado

Sustentante

Srita. Martha Beatriz Enr3quez Espejel

AGRADECIMIENTOS

Es tan difícil mirar en retrospectiva y darse cuenta que en realidad ninguno de los logros acumulados en una vida son absolutamente propios. El camino andado es la suma de todos los que han ayudado a construirlo.

Agradezco profundamente a mis padres Martha Espejel y Raúl Enríquez por darme vida, por su amor, comprensión y por guiarme en el camino de la verdad.

A mis hermanos, Álvaro y Raúl que a pesar de las circunstancias, siempre están a mi lado.

A mis abuelitos, tías y primos que han estado conmigo, compartido consejos, enseñanzas y pedazos de vida.

A Aline por escucharme siempre y evitar que me volviera un poco más loca.

A mi amada Universidad Nacional Autónoma de México y
A mi querida Facultad de Química

A mis profesores, por enseñarme no sólo ideas y conceptos, sino también el amor al conocimiento.

A la Dra. Hortensia Parra, por el tiempo, las enseñanzas y sobretodo la paciencia que me brindó durante todo este tiempo.

Al Dr. Mariano Martínez, por los conocimientos, la paciencia y el apoyo recibidos.

A los profesores Rafael Rión Arriola, Francisco Hernández Luis, Irma Susana Rojas Tomé y Ruth Bustamante García, por el apoyo y los consejos recibidos.

Por que me han brindado mucho más que solo enseñanzas y experiencias.

A mis amigos, por todos los momentos compartidos y porque han estado a mi lado en las buenas y en las peores.

A todas aquellas personas que poco o mucho compartieron conmigo un lapso de existencia.

DEDICATORIAS

A mi padre,.....mi cabeza
A mis hermanos,.....mis brazos y mis piernas
A mi madre,.....mi corazón

Porque son ellos los que me impulsan a seguir adelante cada día.

A mi familia por que están a mi lado apoyándome siempre. A mis abuelitos, Geno y Francisco, por sus palabras sabias. A mis tías Esperanza, Pilar, Caty, Teresa Espejel, Lourdes, Mercedes y Teresa Enríquez, por todo su apoyo y comprensión. A mi prima Aline, por ser como una hermana para mí. A mis primos Alexei, Paco, Carmen, Pilar, Mariana. Brenda y el pequeño Lalito.

Un amigo es alguien que lo sabe todo de ti y a pesar de ello te quiere.
Elbert Hubbard (1856-1915).

A mis amigos de la preparatoria Marysol, Araceli, Arturo Uriel, Citlalli, Guadalupe Jean y Evelina que aunque ya no los vea, los recuerdo con mucho cariño.

A mis queridos amigos de toda una vida en la facultad de Química.
A Eloy Lio y Marco Polo, que aunque estén lejos siempre los tengo presentes.
A mis amigos Nelly Velasco, Tania, Gris, Maria Elena, Mirza, Liliana, Lorena, Diana, Paulette, Talia, Irene, Javier, Rocío, Iliria, Nelly Rodríguez, Janet, Andrea, César, Jesús Olmos, Roberto, Alejandro Gallegos, Alejandro (lexman), Osiris, y Ethel por todos los momentos que estuvieron junto a mi.
En especial a Cecy, Hirai y Paulo por estar ahí cuando todo lo demás parecía derrumbarse.
Por todos esos momentos buenos y malos que compartimos y espero que sigamos compartiendo.

A mis amigos del Instituto de Química, Rodrigo, Hortensia Rosas, Gaby, Karina, Moisés, José Armas, Diana Carolina, Alma y Flor, porque a su lado el trabajo en el laboratorio fue mas divertido.

A mis amigos y compañeros del museo Universum, que aunque ha sido poco el tiempo que nos conocemos, en verdad he llegado a apreciarlos. Ariana, Ezequiel, Adriana, Ixchel, Mónica, Janet, Lucía, Melissa, Marisela, Anacaren, Cirene, Alicia, Arianna, Isis, Jorge, Edgar y José.

Y cualesquiera que sean los destinos y experiencias que tengas aún por delante, serán un caminar y un escalar cumbres; tienes que subir por encima de ti mismo, hasta que incluso tus estrellas queden por debajo de ti.

Federico Nietzsche

...Limitábame a mirar en silencio. Sufría entonces frecuentes y violentos ataques, y el efecto de cada ataque, como toda recrudescencia de mi enfermedad, era sumirme en una idiotez completa. Perdía la memoria, la mente seguía trabajando pero, por decir así, el desarrollo lógico del pensamiento quedaba interrumpido, sin que me fuera posible coordinar las ideas. Cuando pasaban los accesos recobraba con la salud la lucidez. Recuerdo que experimentaba una angustia indecible; sentía imperiosa necesidad de llorar y estaba siempre aturdido e inquieto, y esto me hacía sufrir cruelmente.....

Príncipe Muichkine en El príncipe idiota
Fiódor Dostoievski

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	
2.1 Plantas medicinales utilizadas en enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC).....	2
2.2 Metabolismo primario y secundario.....	3
2.3 Epilepsia.....	3
2.3.1 Historia.....	3
2.3.2 Definición.....	5
2.3.3 Crisis epiléptica.....	5
2.3.4 Elementos de la crisis.....	6
2.3.5 Tipos de epilepsia.....	6
2.3.5.1 Idiopática.....	6
2.3.5.2 Sintomáticas.....	6
2.3.5.3 Criptogenética.....	7
2.3.6 Clasificación de las convulsiones epilépticas.....	7
2.3.7 Epileptogénesis.....	9
2.3.7.1 Mecanismos de la epileptogénesis.....	9
2.3.7.2 Receptor GABA _A	11
2.3.8 Modelos experimentales utilizados en el estudio de la epilepsia.....	12
2.3.8.1 Modelos de crisis generalizadas Tónico-clónicas.....	12
2.3.8.2 Modelos agudos de epilepsia parcial simple.....	13
2.3.9 Tratamiento.....	13
2.3.10 Epidemiología.....	15
2.4 <i>Casimiroa calderoniae</i>	17
2.4.1 Ubicación taxonómica.....	17
2.4.2 Familia <i>Rutaceae</i>	17
2.4.3 Género <i>Casimiroa</i>	18
2.4.7 Especie <i>Casimiroa calderoniae</i>	19

2.4.4	Antecedentes etnomédicos del género <i>Casimiroa</i>	21
2.4.6	Antecedentes farmacológicos del género <i>Casimiroa</i>	22
2.4.7	Antecedentes químicos del género <i>Casimiroa</i>	23
3.	Hipótesis	30
4.	Objetivos	30
5.	Material y Métodos	32
5.1	Estrategia general de trabajo.....	32
5.2	Material vegetal.....	33
5.3	Extracción.....	33
5.4	Evaluación de la actividad biológica.....	33
5.4.1	Efectos tóxicos.....	33
5.4.2	Efectos anticonvulsivos.....	33
5.4.3	Análisis estadístico.....	34
5.5	Análisis Cromatográfico.....	34
5.5.1	Fraccionamiento primario del Extracto hexánico.....	35
5.5.2	Fraccionamiento primario Extracto de acetato de etilo.....	35
5.5.3	Fraccionamiento primario Extracto etanólico al 70%.....	36
5.6	Análisis Espectroscópico.....	38
6.	Resultados y discusión	39
6.1	Obtención de los extractos.....	39
6.2	Actividad farmacológica.....	39
6.2.1	Toxicidad.....	39
6.2.1.1	Extracto hexánico.....	39
6.2.1.2	Extracto de acetato de etilo.....	40
6.2.1.3	Extracto etanólico al 70%.....	40
6.2.2	Actividad anticonvulsiva.....	40
6.2.2.1	Extracto hexánico.....	40
6.2.2.2	Extracto de acetato de etilo.....	41
6.2.2.3	Extracto etanólico al 70%.....	44
6.2.3	Actividad hipnótica.....	48
6.2.3.1	Extracto de acetato de etilo.....	48

6.3 Estudio Químico.....	50
7. Conclusiones.....	66
8. Anexo.....	67
9. Bibliografía.....	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Clasificación de las convulsiones epilépticas.....	8
2	Fármacos antiepilépticos, mecanismo de acción y algunos de sus efectos adversos.....	14
3	Ubicación taxonómica de la especie <i>Casimiroa calderoniae</i>	17
4	Compuestos hallados y/o detectados en especies del género <i>Casimiroa</i>	25
5	Diseño experimental para la evaluación de los efectos anticonvulsivos de la especie <i>Casimiroa calderoniae</i>	33
6	Fracciones obtenidas en la CC del extracto hexánico.....	34
7	Fracciones obtenidas en la CC del extracto de acetato de etilo.....	34
8	Fracciones separadas a partir del extracto etanólico al 70%.....	35
9	Productos aislados en la separación por cromatografía en columna de los extractos hexánico, acetato de etilo y etanólico al 70%.....	36
10	Extractos obtenidos de las hojas de <i>Casimiroa calderoniae</i>	38
11	Desplazamiento (ppm) de las señales de RMN ¹ H y RMN ¹³ C del acetato de tricoclina (sólido 3).....	55
12	Desplazamiento de las señales de RMN ¹ H y RMN ¹³ C para la 5,6,2',3' tetrametoxiflavona (J,ppm).....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Ilustraciones del receptor GABA _A , en donde se muestran los diferentes sitios de reconocimiento a diferentes ligandos.....	11
2	Arbusto de <i>C. calderoniae</i>	19
3	Localización geográfica de <i>Casimiroa calderoniae</i>	20
4	Estructuras de alcaloides, triterpenos y esteroides aisladas de algunas especies del género <i>Casimiroa</i>	27
5	Estructuras de flavonoides aisladas de algunas especies del género <i>Casimiroa</i>	28
6	Estructura de cumarinas y amidas aisladas de algunas especies del género <i>Casimiroa</i>	29
7	Estrategia general de trabajo.....	31
8	Porcentaje de animales que presentaron mioclonías (porcentaje de respuesta). Cuando se indujeron convulsiones con una dosis de PTZ 70 mg/kg.....	40
9	Latencias de las crisis mioclónicas (inducidas por PTZ) mostradas por los grupos tratamiento a las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de acetato de etilo.....	41
10	Porcentaje de animales a los cuales se les administraron las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de acetato de etilo y que manifestaron crisis tónicas cuando se administró el agente convulsivante PTZ.....	42
11	Latencia de las crisis tónicas presentadas por los grupos a los cuales se administró las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de acetato de etilo, una vez que se indujeron las crisis con el agente convulsivante PTZ.....	42
12	Porcentaje de muerte presentada por los animales a los cuales se administró las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de acetato de etilo, una vez que se administró el agente	

	convulsivante PTZ.	43
13	Porcentaje de animales que presentaron crisis tónicas (inducidas por PTZ 70 mg/kg) cuando se evaluaron las dosis de 1, 10, 1000 mg/kg del extracto etanólico al 70%.....	44
14	Porcentaje de muerte presentada cuando se indujeron crisis convulsivas con PTZ 70 mg/kg. Las dosis evaluadas del extracto etanolico fueron 1, 10 y 1000 mg/kg.....	44
15	Porcentaje de animales que presentaron crisis mioclónicas inducidas por PTZ 90 mg/kg en los diferentes grupos de tratamiento, control y testigo, al evaluar las dosis de 1, 5, 10, 50 mg/kg del extracto etanólico al 70%.....	45
16	Porcentaje de muerte presentado al administrar el agente convulsivante PTZ a una dosis de 90 mg/kg. Las dosis administradas del extracto etanólico fueron 1, 5, 10 y 50 mg/kg..	46
17	Latencia de hipnosis al administrar las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de acetato de etilo.....	47
18	Tiempo de hipnosis mostrado por los animales cuando se administraron las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de acetato de etilo.....	48
19	Espectro de IR de la imperatorina (sólido 1).....	50
20	Espectro de masas de la imperatorina (sólido 1).....	51
21	Espectro de RMN ¹ H de la imperatorina (sólido 1).....	51
22	Estructura de la imperatorina (sólido 1).....	52
23	Espectro de IR correspondiente al acetato de tricoclina (sólido 3).....	53
24	Espectro de masas al acetato de tricoclina (sólido 3).....	53
25	Espectro de RMN ¹ H al acetato de tricoclina (sólido 3).....	54
26	Espectro de RMN ¹³ C al acetato de tricoclina (sólido 3).....	54
27	Estructura del acetato de tricoclina (sólido 3).....	55
28	Espectro de IR de la 5,6,2',3'–tetrametoxiflavona (sólido 4).....	57
29	Espectro de masas de la 5,6,2',3'–tetrametoxiflavona (sólido 4)..	57

30	Espectro de RMN ¹ H de la 5,6,2',3'-tetrametoxiflavona (sólido 4).....	58
31	Espectro de RMN ¹³ C de la 5,6,2',3'-tetrametoxiflavona (sólido 4).....	58
32	Espectro DEPT de la 5,6,2',3'-tetrametoxiflavona (sólido 4).....	59
33	Estructura de la 2',3',5,6 tetrametoxiflavona (sólido 4).....	61
34	Espectro de IR de la tangeritina (sólido 5).....	62
35	Espectro de masas de la tangeritina (sólido 5).....	63
36	Espectro de RMN ¹ H de la tangeritina (sólido 5).....	63
37	Estructura de la tangeritina (sólido 5).....	64
38	Estructura General de flavonoides.....	66
39	Ruta biogénica de los flavonoides.....	67
40	Estructura general de las cumarinas.....	69
41	Ruta biogénica de las cumarinas.....	70

ABREVIATURAS

a	Señal ancha
AcOEt	Acetato de etilo
BZ	Benzodiazepinas
c	cuarteto
°C	Grados centígrados
CC	Cromatografía en Columna
CCA	Extracto de AcOEt de <i>Casimiroa calderoniae</i>
CCE	Extracto Etanólico de <i>Casimiroa calderoniae</i>
CCF	Cromatografía en capa fina
CCP	Cromatografía en capa preparativa
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
Cols.	Colaboradores
d	Doblete
dd	Doble de dobles
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DL ₅₀	Dosis Letal 50
Dz	Diazepam
EM	Espectrometría de Masas
ERK ½	Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2
GABA	Ácido γ aminobutírico
GABA _A	Receptor GABA _A
GABA-T	Enzima γ -transaminasa
GAD	Enzima ácido-glutámico-descarboxilasa
Hex	Hexano
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
Hz	Hertz
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional Estadística Geografía e Informática

IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de Potasio
m	señal múltiple - multiplete
MeO	Metoxilo
MHz	Mega Hertz
NO	Óxido nítrico
NP	No presentó
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
PTZ	Pentilentetrazol
qar	Carbono cuaternario aromático
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de H
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ C
s	Singulete
SSI	Solución Salina Isotónica
SNC	Sistema Nervioso Central
t	Triplete
ta	Triplete ancho
TMS	Tetrametilsilano
Uma	Unidad de masa atómica
%	Porcentaje

1. Introducción

La epilepsia es una alteración neurológica, caracterizada por la recurrencia de crisis que pueden manifestarse como pérdida del conocimiento, movimientos involuntarios, alteraciones autonómicas y de las funciones mentales. Este trastorno es causado por numerosos factores de origen genético, metabólico o bien factores asociados a un trauma, ya sea secundario debido a daño perinatal o asociado a un traumatismo craneoencefálico (Brailowsky, 1999).

La epilepsia es un trastorno que afecta del 1 al 2 por ciento de la población mundial y representa la segunda causa más importante de consulta neurológica, después de las cefaleas. Sus consecuencias van más allá de las alteraciones que se producen durante las crisis convulsivas, ya que también se asocia con una estigmatización social y a una problemática psicológica, familiar y económica muy importante.

El tratamiento farmacológico de la epilepsia se inició con la utilización de los bromuros, como el bromuro de potasio. Desde entonces se han desarrollado diversos fármacos que son actualmente de uso común, además de otros que se encuentran actualmente en investigación. Sin embargo, los fármacos antiepilépticos tienen efectos colaterales que en ocasiones son severos y pueden obligar a discontinuar el tratamiento. Razón por la cual la búsqueda de medicamentos antiepilépticos es constante (Rocha, 2005).

Estudios efectuados por Garzón de la Mora y colaboradores (1999) y Navarro y colaboradores (1994), demostraron que los extractos acuosos y etanólicos de hojas y semillas de *Casimiroa edulis* (zapote blanco) poseen propiedades anticonvulsivantes.

Por otro lado, en un estudio comparativo por CLAR, de diversas especies del género *Casimiroa*, nuestro grupo de investigación, determinó que la especie *Casimiroa calderoniae* poseía metabolitos comunes a *Casimiroa edulis* (García-Argáez *et al.*, 2003). Tomando en consideración lo anterior, se llevó a cabo la evaluación de las propiedades anticonvulsivas de tres extractos de hojas de *Casimiroa calderoniae*, así como el estudio químico de dichos extractos.

2. Antecedentes

2.1 Plantas medicinales utilizadas en enfermedades del sistema nervioso central (SNC)

En la herbolaria indígena mexicana se describen varias plantas medicinales que se utilizaban para el tratamiento de la epilepsia, entre las que se encontraban el acaxochitl (*Lobelia laxiflora*), el metl (*Atrovirens amary*), ecapatli (*Cassia occidentales*), tepopotic (*Bacharis conferta*), iczotl (*Yuca australis*), tepecuitlazotl (*Chenopodium ambrosoides*) y el tlatlancuaye (*Iresine calez*), entre otros (Rocha, 2005).

Hoy en día, diferentes plantas medicinales son cultivadas y comercializadas para su utilización en el tratamiento de trastornos de ansiedad y otros padecimientos relacionados con el Sistema Nervioso Central. Dentro de las plantas medicinales con actividad en SNC se puede mencionar a la hierba de san Juan (*Hypericum perforatum*), utilizada en el tratamiento de los trastornos depresivos leves y moderados y cuyas propiedades farmacológicas pueden ser atribuidas a un compuesto llamado hipericina y a los distintos flavonoides que la componen (Barnes *et al.*, 2001). De la misma manera, *Matricaria chamomilla*, se ha utilizado en la medicina tradicional por sus propiedades sedantes, y de la cual, se aisló un flavonoide llamado apigenina (Avallone *et al.*, 1999). Dicho compuesto parece ejercer su acción por medio de una interacción con el receptor GABA_A. Asimismo, dentro de este grupo de plantas medicinales se encuentran la *Valeriana officinalis*, utilizada comúnmente en el tratamiento de problemas de sueño, ansiedad y angustia (Douglas, 2001), y el *Ginkgo biloba*, el cual es usado para el tratamiento de Alzheimer y la demencia vascular (Sierpina *et al.*, 2003).

2.2 Metabolismo primario y secundario

El metabolismo primario comprende una serie de procesos, mediante los cuales, los organismos vivos sintetizan y degradan una serie de sustancias orgánicas que les son indispensables para vivir. Estos procesos son similares en casi todos los organismos vivos y a los productos sintetizados se les denomina metabolitos primarios. Los metabolitos primarios se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Ejemplo de ellos pueden ser los aminoácidos, carbohidratos, proteínas, etc. (Mata y Rivero, 2000).

El metabolismo secundario comprende igualmente una serie de procesos, mediante los cuales, los seres vivos sintetizan un gran número de compuestos orgánicos que aparentemente no les son indispensables para vivir. Estos compuestos se forman a partir de los metabolitos primarios y los procesos que conllevan a su formación pueden diferir en los distintos organismos. En las plantas, los metabolitos secundarios se pueden producir en respuesta a factores ambientales o a agentes patógenos, como mecanismos de defensa y supervivencia de la especie que los produce (Davies, 2003). Estos compuestos presentan una distribución taxonómica restringida, en ocasiones característica de un género o especie. Entre los metabolitos secundarios más importantes se encuentran las cumarinas, los alcaloides, los flavonoides y terpenoides, entre otros.

2.3. Epilepsia

2.3.1 Historia

Los esfuerzos para comprender y curar esta enfermedad, envuelta siempre dentro de visiones mágicas y religiosas, han sido largos. Tratamientos basados en falsas creencias, métodos curativos alojados en pensamientos ancestrales muy arraigados, y una continua búsqueda, han sido el camino para tratar de acercarse un poco más al entendimiento y mejora del mal que significa la epilepsia.

La palabra epilepsia deriva del griego que significa crisis, y que a su vez proviene del término *epilambaneim*, que significa convulsionar. El primer registro que trata a

la epilepsia es el llamado *Sakiku*, tratado médico de Babilonia que data del 1067 al 1046 antes de nuestra era. En este tratado, la epilepsia aparece como “la enfermedad del caer” y se describen varios procedimientos para su diagnóstico y tratamiento (Rocha, 2005). Posteriormente Atreya (900 A.C.), padre de la medicina en India, definió a la epilepsia como “la pérdida paroxística de la conciencia debido a una alteración de la memoria y del entendimiento de la mente que es atacada por una crisis convulsiva”. De la misma manera, en la literatura Ayurvédica, el Charaka Samhita (400 A. C.), describe a la epilepsia como *apasmara* que significa pérdida de la conciencia. Este registro contiene referencias de sintomatología, etiología, diagnóstico y tratamiento (Eadie y Bladin, 2001). En China, en el Huang Di Nei, tratado médico que data del 770-221 antes de nuestra era, se describe la sintomatología de una crisis tónico-clónica. Asimismo, en los escritos hipocráticos (400 A.C.), se sugiere que en su origen, la epilepsia es una alteración física que resulta de un desequilibrio entre los humores. En México, Martín de la Cruz médico azteca del siglo XVI, hace algunas referencias específicas en el código Badiano respecto al tratamiento de la epilepsia. Y no fue sino hasta finales del siglo XVIII, cuando los epilépticos empezaron a ser considerados como enfermos (Rocha, 2005).

El estudio moderno de este fenómeno se inicia con Hughlings en 1870. El consideró que las crisis eran la manifestación paroxística de una descarga que iniciaba y se difundía a partir de un foco. Asimismo, William Gowers adoptó el término focal para hacer la primera clasificación correlativa de las crisis epilépticas (Feria-Velasco y Orozco-Suárez, 2005).

El tratamiento médico de la epilepsia inicia de manera experimental a mediados del siglo XIX con el uso de sales de bromo, como el bromuro de potasio, primeras sustancias químicas que demostraron "eficacia" en cuanto al control de crisis. Sin embargo, su uso se limitaba por la alta toxicidad que mostraban. A principios del siglo XX, se introdujo el fenobarbital, con el que se logró una buena respuesta clínica. Este descubrimiento abrió realmente el horizonte de los tratamientos farmacológicos antiepilépticos (Feria-Velasco y Orozco-Suárez 2005).

2.3.2 Definición

La epilepsia se define como la presentación crónica y recurrente de fenómenos paroxísticos (crisis o ataques) ocasionados por descargas neuronales desordenadas y excesivas que se originan en el cerebro, teniendo causas diversas y manifestaciones clínicas variadas. Es un término genérico que engloba un grupo de enfermedades que se manifiestan por crisis (epilépticas). Las manifestaciones de las epilepsias no son motoras solamente, existen también epilepsias que se manifiestan por percepciones sensoriales o cognoscitivas, dependiendo del sitio en el que se localice el grupo de neuronas que se exciten en forma simultánea (Brailowsky, 1998).

2.3.3 Crisis Epiléptica

La crisis epiléptica se debe a descargas hipersincrónicas, y puede tener manifestaciones motoras, sensitivas, sensoriales, autonómicas, y/o psíquicas. Puede presentarse dentro de un síndrome epiléptico, como manifestación en un desorden, como secuela o como evento aislado (Medina, 1998).

Las manifestaciones de la epilepsia son múltiples y dependen del área cerebral afectada; motivo por el cual se han propuesto diferentes clasificaciones que dependen del compromiso focal (frontal, temporal, parietal, occipital) o generalizado. En el caso de la epilepsia focal, se debe tener en cuenta si está comprometida o no la conciencia y su posible generalización, así como el tiempo de la crisis y su recuperación (postictal).

Las crisis epilépticas tienen características comunes que nos permiten identificarlas y diferenciarlas de otras. Dichas características son:

1. Duración generalmente limitada, con un inicio y final identificables.
2. La descarga epiléptica tiene una manifestación clínica predecible de inicio a final, de acuerdo al área cerebral implicada.
3. Las crisis son estereotipadas en su mayoría para el mismo individuo.
4. Son espontáneas, en el sentido de no ser provocadas por un problema causal agudo (Rodríguez, 1999).

2.3.4 Elementos de la crisis

1. Pródromos: Cansancio, temor, ansiedad, son algunas de las manifestaciones que preceden a una crisis epiléptica.
2. Aura: Manifestación clínica de la crisis en donde el paciente conserva su estado de conciencia, evocándole esta manifestación a una crisis previa.
3. Ictus (crisis, convulsión): Manifestación clínica focal o generalizada de la descarga anormal cerebral (crisis parcial, generalizada o de inicio parcial secundariamente generalizada).
4. Estado postictal: Recuperación progresiva de la conciencia o del estado previo a la descarga epiléptica. Se manifiesta por somnolencia, confusión, cefalea, irritabilidad o déficit motor y/o sensitivo de una extremidad.
5. Interictal: Estado intercrítico en donde el paciente funciona normalmente, aunque puede tener descargas anormales que son subclínicas y que al identificarse electroencefalográficamente pueden apoyar el diagnóstico de la epilepsia (Rodríguez, 1999).

2.3.5 Tipos de Epilepsia

2.3.5.1 Idiopática

La epilepsia idiopática tiene características definidas. Se presenta en individuos con una inteligencia normal, en quienes no se encuentra una lesión estructural que explique las crisis, tiene una causa no identificada. Posiblemente lleguen a definirse dentro del grupo de genéticas.

2.3.5.2 Sintomática

En la epilepsia sintomática se evidencia una anomalía cerebral, cisticercosis, malformación arteriovenosa, tumor, enfermedad cerebro vascular, tumor cerebral

traumatismo craneoencefálico, infecciones del sistema nervioso central, traumatismos y anoxia perinatal. Existen dos subtipos:

- a) Lesionantes, que no corresponden a epilepsia per se, sino a enfermedades neurológicas.
- b) No lesionantes, son aquellas en las que hay una cicatriz como secuela de las entidades anteriores o encefalopatías perinatales.

2.3.5.3 Criptogenética

Es el tipo de epilepsia cuya etiología no corresponde a las idiopáticas y no se puede comprobar su carácter sintomático al no encontrar una lesión evidente. Las epilepsias criptogenéticas pueden pasar en un futuro a sintomáticas no lesionantes. Los pacientes poseen retraso en el desarrollo psicomotor, además de tener un problema estructural cuya etiología no es identificada (Rocha, 2005).

2.3.6 Clasificación de las convulsiones epilépticas

En el Cuadro 1 se presentan los tipos de convulsiones y sus características fisiológicas de acuerdo a la Comisión de clasificación y terminología de la Liga internacional contra la epilepsia (Commission, 1989).

Cuadro 1. Clasificación de las convulsiones epilépticas

	Tipo de convulsión	Características
Convulsiones parciales	Parciales simples	El paciente recuerda todo el evento clínico y lo puede relatar con lujo de detalles. Las manifestaciones dependen de la región de la corteza activada por la crisis convulsiva. Duran aproximadamente 20 a 60 segundos.
	Parciales complejas	El paciente presenta pérdida del conocimiento que dura de 30 segundos a 2 minutos, manifestaciones "extrañas" que él no recuerda, y puede caer en crisis generalizada.
	Parciales con convulsiones tónico-clónicas generalizadas de manera secundaria	La convulsión simple o parcial compleja evoluciona hasta convulsión tónico-clónica, con pérdida del conocimiento y contracciones sostenidas (tónicas) de los músculos de todo el cuerpo, a lo que siguen periodos de contracción muscular alternada con periodos de relajación (convulsiones clónicas), que en su forma característica duran uno a dos minutos.
Convulsiones generalizadas	Crisis de ausencia	Se caracteriza por la pérdida súbita de conciencia de corta duración (menos de 30 s), aunado a mirada fija e interrupción de las actividades que se estaban efectuando.
	Convulsión mioclónica	Manifestación de sobresalto, susto o brinco, no rítmico en donde el paciente recuerda el evento por su corta duración (de un segundo). Pueden presentarse desde fenómenos fisiológicos hasta cuadros neurológicos involutivos.
	Convulsión tónica	Se caracteriza por una contracción generalizada y sostenida con hiperextensión, en la cual el paciente entra en una apnea severa, de duración variable dependiendo de la etiología. Corresponde a un fenómeno excitatorio que compromete la vía piramidal.
	Convulsión clónica	Corresponde a un fenómeno inhibitorio, manifestado como contracción rítmica alternante que contrarresta el mecanismo de la crisis tónica, hasta que desaparece la descarga excitatoria.

2.3.7 Epileptogénesis

2.3.7.1 Mecanismos de la epileptogénesis

Los mecanismos responsables de la actividad epiléptica son múltiples. Las características de la descarga epiléptica pueden variar de acuerdo con factores etiológicos y el área cerebral donde se origina.

Las crisis epilépticas se inician cuando grupos de neuronas en el Sistema Nervioso Central descargan potenciales de acción anormales, secundarios a una despolarización repetitiva, que interfiere con la función normal del cerebro. Muchos parámetros fisiológicos se interfieren durante una crisis epiléptica, especialmente el equilibrio metabólico, el flujo cerebral, la función sináptica y el microambiente iónico-osmótico.

La epileptogénesis puede originarse en neuronas capaces de producir descargas intrínsecas en las regiones CA2-CA3 del hipocampo, o en las neuronas de las capas IV y V de la neocorteza; asimismo, la descarga epiléptica puede ser secundaria a una falla de los mecanismos inhibitorios, particularmente del ácido Gamma aminobutírico (GABA), o bien a un exceso de estímulos excitatorios (glutamato, aspartato) (Quiñónez, 1999).

En el hipocampo existen células piramidales en las regiones CA2-CA3, que sirven como marcapasos para eventos epileptiformes espontáneos. La suposición que las descargas epilépticas focales pueden ser iniciadas por neuronas con capacidad para generar paroxismos ("células marcapasos"), es sostenida por la demostración de que la activación de una sola célula piramidal en la región CA3 del hipocampo puede liderar una descarga en una población de neuronas adyacentes (Pellegrino, 2000).

Todas estas alteraciones se presentan de manera prácticamente simultánea, por lo que ha sido difícil establecer cual de todos estos factores inició la epileptogénesis.

Existen diversos factores que facilitan la despolarización neuronal anormal, los cuales traen como consecuencia alteraciones a nivel de membrana neuronal (canales de Ca^{2+} , Na^+ , K^+), de las dendritas o de las sinapsis inhibitorias (GABA) o excitatorias (glutamato-aspartato) (Quiñónez, 1999).

La causa principal de la epilepsia humana es la alteración de la función sináptica del principal neurotransmisor inhibitorio, el ácido gama aminobutírico (GABA). El GABA se sintetiza a partir del ácido glutámico, mediante la intervención específica de la enzima ácido-glutámico-descarboxilasa (GAD), dependiente del fosfato de piridoxal y presente sólo en el sistema nervioso. La degradación enzimática de GABA se produce mediante la intervención de la enzima GABA-transaminasa (GABA-T), la cual transporta el grupo amino al ácido α -cetoglutámico y finalmente GABA se oxida al ácido succínico como producto final (Hobbs *et al.*, 1996).

El sistema inhibitorio normal gabaérgico mantiene un sistema de comunicación interneuronal controlado. Este sistema impide que las neuronas respondan a potenciales, por el simple hecho de recibir un estímulo excitatorio postsináptico aislado. Sin embargo, esto no sucede cuando el sistema inhibitorio falla, de tal manera que un simple potencial de acción resulta con una despolarización paroxística. La desinhibición del sistema GABAérgico puede deberse a:

- Disminución de los niveles del neurotransmisor, de su síntesis o su liberación
- Al aumento de su recaptura o su degradación
- Modificación de sus receptores GABA_A o GABA_B

El mecanismo GABAérgico es crucial para la prevención de la actividad epileptiforme; en consecuencia, el aumento de la inhibición debería ser un medio efectivo para disminuir la excitabilidad anormal característica de los procesos epilépticos (Hobbs *et al.*, 1996). Para lograr dicho incremento se puede:

1. Facilitar la síntesis del GABA y su liberación a la sinapsis.
2. Disminuir su recaptura por bloqueo de los receptores GABA_B .
3. Inhibir su catabolismo.
4. Activar los receptores GABA_A .

2.3.7.2 Receptor GABA_A

Pertenece a la superfamilia de receptores asociados a canales iónicos (ionotrópico) y que son codificados por un mismo gen. Dicho receptor es una proteína heterooligomérica compuesta por varios tipos de polipéptidos (α , β , γ , δ , ϵ). Es un canal de cloruro integral de la membrana, que media la mayor parte de la neurotransmisión inhibitoria rápida en el sistema nervioso central (Hobbs *et al.*, 1996).

Siendo un multireceptor, esta constituido por:

- Un sitio de unión para GABA.
- Un sitio regulatorio en donde se unen las Benzodiazepinas (BZ).
- Un sitio de reconocimiento de barbitúricos.
- Un sitio de reconocimiento a la picrotoxina y varios convulsionantes.
- Un sitio de reconocimiento de etanol.

En la Figura 1 se observan dos modelos del receptor GABA_A, donde se muestran los diferentes sitios de reconocimiento de las distintas sustancias que interactúan con dicho receptor.

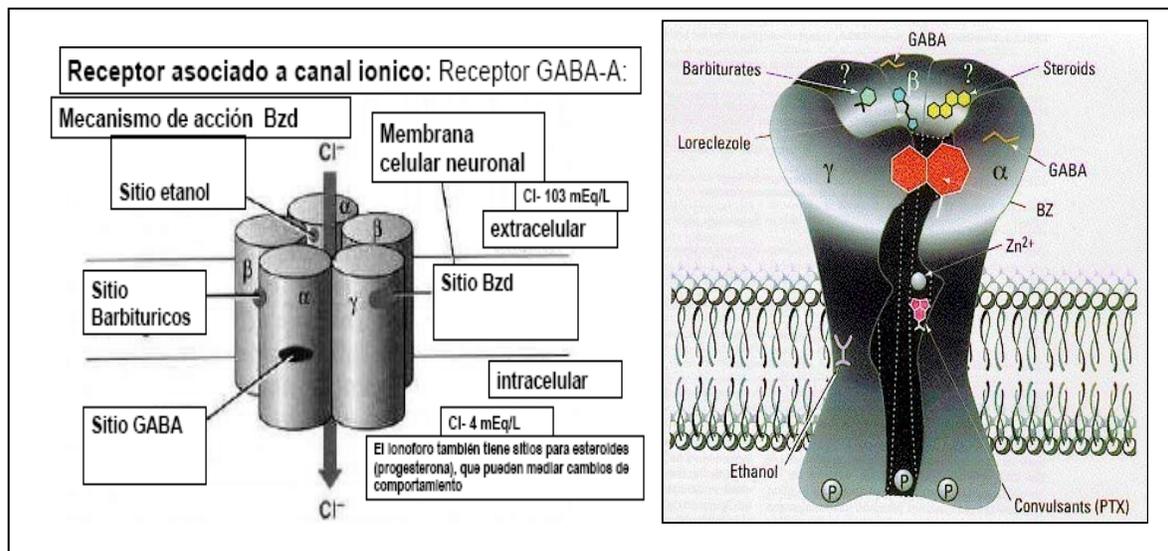


Figura 1. Ilustraciones del receptor GABA_A, en donde se muestran los diferentes sitios de reconocimiento a diferentes ligandos (Janos, 2005).

2.3.8 Modelos experimentales utilizados en el estudio de la epilepsia

En el laboratorio, la epilepsia puede reproducirse de acuerdo con los procedimientos de inducción, ya sea por agentes físicos o bien por agentes químicos en animales. Los modelos experimentales de epilepsia han permitido comprender un poco más los mecanismos cerebrales de dicha enfermedad, ya sean celulares o sistémicos. Sin embargo, las respuestas experimentales derivadas de dichos modelos no pueden ser equiparadas en su totalidad con la epilepsia humana. Debido principalmente a las diferencias evidentes entre especies (Granillo, 2002).

2.3.8.1 Modelos de crisis generalizadas Tónico-clónicas

Muchos compuestos químicos pueden producir crisis generalizadas si se aplican de forma sistémica, tales como: Penicilina, Pentilentetrazol (PTZ), Estricnina, Homocisteína, etc. El PTZ es el principal agente empleado para este fin. En el animal produce sacudidas mioclónicas y crisis generalizadas tónico-clónicas. La inyección intravenosa de una solución de PTZ al 1% y con 50 mg/kg, produce ataques clónicos; mientras que con 90 mg/kg produce crisis tónico-clónicas. Parecería que estructuras como los cuerpos mamilares, los tractos mamilotalámicos y anterior talámico participan en las crisis generadas por el PTZ. El compuesto gamma-vinil GABA bloquea los ataques producidos por PTZ, dentro de la formación reticular y el hipotálamo. Para algunos autores, el PTZ bloquea la inhibición mediada por el GABA. El PTZ fue adoptado también como prueba para la evaluación de algunos fármacos anticonvulsivos al igual que el electroshock máximo.

Asimismo, se pueden producir crisis epilépticas tónico-clónicas en diferentes cepas de animales, los cuales genéticamente presentan crisis convulsivas, debido a un incremento en la variedad, intensidad o frecuencia de los estímulos presentes en el medio (Feria-Velasco y Orozco-Suárez, 2005; Granillo, 2002).

2.3.8.2 Modelos agudos de epilepsia parcial simple

En estos modelos, las alteraciones se realizan en un solo evento condicionante y corresponden a los daños cerebrales agudos. Los daños cerebrales agudos producen descargas electroencefalográficas y convulsiones, como ocurre en casos de abscesos cerebrales traumatismos craneoencefálicos y hematomas cerebrales.

Para la realización de este modelo, se emplean distintos fármacos, tales como Penicilina, Bicuculina, Picrotoxina, Estricnina, sustancias colinérgicas o anticolinérgicas. El método más común ha sido la aplicación tópica de penicilina en la corteza motora de gatos o ratas y es útil en el análisis de la difusión de la actividad anticonvulsiva.

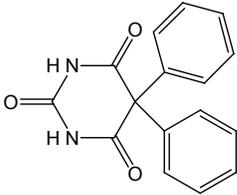
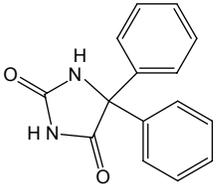
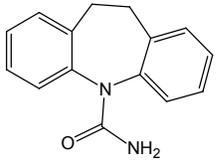
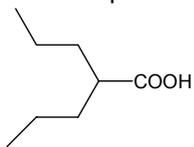
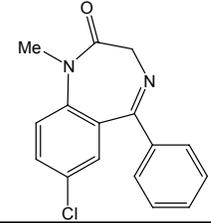
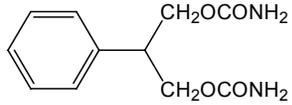
Asimismo, la aplicación de estímulos eléctricos repetitivos sobre el tejido cerebral, puede producir descargas rítmicas que persisten por segundos o minutos después de haber cesado la estimulación (electroshock máximo). En estos modelos, las descargas solo se originan en el sitio de estimulación eléctrica (Feria-Velasco y Orozco-Suárez, 2005; Granillo, 2002).

2.3.9 Tratamiento

El fármaco antiepiléptico ideal no existe hasta el momento. Desgraciadamente muchos de los fármacos antiepilépticos en investigación, han demostrado ser muy eficaces, pero con efectos tóxicos importantes; o bien, sin manifestaciones secundarias, pero con pobre eficacia para el control de las crisis (Núñez, 2005).

A continuación, en el Cuadro 2 se presentan algunos de los llamados fármacos tradicionales, los cuales tienen en uso varias décadas y cuyos efectos, tanto terapéuticos como colaterales y tóxicos son ya muy bien conocidos (Brailowsky, 1998; Mc Namara, 1996; Núñez, 2005).

Cuadro 2. Fármacos antiepilépticos, mecanismo de acción y algunos de sus efectos adversos.

Fármaco	Indicaciones	Mecanismo de acción.	Efectos colaterales
<p>Fenobarbital</p> 	Crisis tónico-clónicas generalizadas y crisis parciales.	Potenciación de la inhibición sináptica por acción en el receptor GABA _A .	Somnolencia, trastornos de conducta, rash, sedación, ataxia, mareo, insomnio, agresividad, impotencia, reducción de la libido.
<p>Fenitoína</p> 	Crisis parciales y crisis generalizadas tónico-clónicas.	Limita la activación repetitiva de los potenciales de acción provocados por la despolarización sostenida de las neuronas.	Hipertrofia de encías, hirsutismo, acné, ataxia, diplopía, nistagmus, neuropatía periférica, disminución de inmunoglobulina A.
<p>Carbamazepina</p> 	Crisis parciales y crisis generalizadas tónico-clónicas.	Limita la activación repetitiva de los potenciales de acción provocados por la despolarización sostenida de las neuronas.	Ataxia, diplopía, rash, somnolencia.
<p>Ácido valproico</p> 	Crisis parciales y todo tipo de crisis generalizadas	Inhibe la activación repetitiva sostenida, inducida por la despolarización de las neuronas corticales o de medula espinal en ratón .	Náusea, dolor epigástrico, alopecia, ganancia de peso, temblor, hiperamonemia.
<p>Diazepam</p> 	Crisis epilépticas prolongadas, <i>status epilepticus</i>	Ejerce su acción facilitando la trasmisión gabaérgica a nivel de la medula espinal. Esto provoca una disminución de la actividad eléctrica, ya sea espontánea o provocada.	Sedación, ataxia, lentificación de las funciones psicomotoras, sequedad de boca, cefalea y molestias gástricas.
<p>Felbamato</p> 	Crisis tónico-clónicas generalizadas, crisis parciales, ausencias, mioclonias y crisis atónicas.	Inhibe los canales de sodio. Antagoniza la acción del glutamato, fijándose en el sitio de la glicina del receptor NMDA	Nauseas, vómitos, diplopía, visión borrosa, ataxia, insomnio, anemia aplásica.

2.3.10 Epidemiología

La epilepsia es un problema de salud por la naturaleza misma del padecimiento. Esta enfermedad necesita de una atención médica adecuada, además de cuidados especiales a los pacientes debido a las serias repercusiones emocionales y sociales que produce, no solo en quienes la padecen, sino también en sus familiares y amigos.

La epilepsia afecta al 1-2% de la población mundial y en México se estima que de 1 a 2 millones de personas la padecen.

Las personas con epilepsia tienen un riesgo de muerte tres veces más alto que las que no padecen crisis.

Esta enfermedad afecta a personas de todas las edades, pero se inicia antes de los 20 años en las tres cuartas partes de los casos. Su inadecuado control puede conducir a daño cerebral permanente y trastornos del aprendizaje.

La epilepsia puede controlarse en muchas personas con los medicamentos tradicionales actualmente disponibles, sin embargo, del 20 al 25% de las personas que reciben tratamiento continúan presentando las crisis. Cuando no se controla puede conducir a graves consecuencias sociales, psicológicas y económicas.

Muchas personas con epilepsia y sus médicos, piensan erróneamente que las crisis no pueden controlarse completamente y que deben aprender a "vivir con ellas". Sin embargo, un mejor tratamiento para la epilepsia podría lograr un control total de la enfermedad y permitir a más gente desarrollar dignamente sus potenciales, con los consecuentes beneficios para ellos mismos y para la comunidad (Núñez, 2005).

La incidencia, prevalencia, así como la mortalidad por la epilepsia, son los indicadores que expresan la distribución y frecuencia del problema de salud.

La incidencia de la epilepsia representa el número de casos nuevos diagnosticados, entre la población de riesgo, en un área y durante un tiempo determinado. Su utilidad más común es la posibilidad de identificar su causa.

La prevalencia de la epilepsia representa el número total de casos presentes en una población de riesgo, para un lugar y tiempo determinado. Las tasas de prevalencia de epilepsia son útiles para determinar las necesidades de atención

médica de las crisis, para la planeación de programas de salud y programas de apoyo al paciente.

En el servicio de Neurología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), la epilepsia representa la causa más frecuente de consulta externa, con una frecuencia de consulta de 1,556 casos en 1995, que representa el 15.6% del total de 9,950 consultas otorgada en ese lapso de tiempo (aproximadamente 1 paciente de cada 10, acude por epilepsia).

De ese grupo atendido, el mayor número de pacientes son jóvenes entre 20 y 40 años de edad, con predominio del sexo femenino.

De las etiologías predominan en un 57% las causas no determinadas (criptogénicas), en un 20% la neurocisticercosis, un 9% corresponde a enfermedad cerebrovascular, 6% a los tumores del sistema Nervioso Central, 4% a las causa postraumáticas y el resto a causas raras (García-Pedrosa, 1999).

La epilepsia se encuentra entre las veinte primeras causas de mortalidad infantil, también esta considerada dentro de las diez primeras causas de mortalidad de niños en edad escolar (6 a 14 años). Asimismo es la causa diecisiete de mortalidad en edad productiva, (de 15 a 64 años), según datos aportados por el INEGI en el año 2002 (INEGI, 2002).

La epilepsia es considerada como un problema de salud pública principalmente debido al deterioro de la calidad de vida del paciente y el rechazo evidente por parte del grupo social al que pertenece; esto, aunado a la alta tasa de prevalencia o a la elevada tasa de mortalidad.

Como se vio anteriormente, los fármacos antiepilépticos tienen efectos colaterales que en ocasiones son severos y pueden obligar a discontinuar el tratamiento. Razón por la cual la búsqueda de medicamentos antiepilépticos es constante. Debido a que se demostró que los extractos acuosos y etanólicos de hojas y semillas de *Casimiroa edulis* (zapote blanco) poseen propiedades anticonvulsivantes (Garzón de la Mora *et al*, 1999; Navarro *et al*, 1994) y a que la especie *Casimiroa calderoniae* posee metabolitos comunes a *Casimiroa edulis* (García-Argáez *et al.*, 2003) se llevó a cabo el estudio químico y farmacológico de esta especie.

2.4 *Casimiroa calderoniae*

2.4.1 Ubicación taxonómica

En el Cuadro 3 se muestra la ubicación taxonómica de la especie *Casimiroa calderoniae*.

Cuadro 3. Ubicación taxonómica de la especie *Casimiroa calderoniae*

Reino: <i>Plantae</i>
Filo: <i>Magnoliophyta</i>
Clase: <i>Magnoliopsida</i>
Orden: <i>Rutales</i>
Familia: <i>Rutaceae</i>
Género: <i>Casimiroa</i>
Especie: <i>Casimiroa calderoniae</i>

2.4.2 Familia Rutaceae

La familia *Rutaceae* pertenece al orden de los *Rutales*, y está integrada por alrededor de 150 géneros y más de 1500 especies. Esta familia está dividida en siete subfamilias, en donde *Aurantioideae*, *Rutoideae* y *Toddalioideae* son llamadas subfamilias mayores.

Debido a la importancia comercial y terapéutica, así como el uso etnomédico de algunas especies de la familia *Rutaceae*, se han estudiado desde el punto de vista químico. En dichos estudios se han encontrado metabolitos secundarios que poseen propiedades útiles al ser humano.

En las Rutáceas, los aceites esenciales, alcaloides, cumarinas, flavonoides, limonoides, así como ceras se han utilizado como marcadores quimiotaxonómicos (García-Argáez, 2002).

2.4.3 Género *Casimiroa*

El género *Casimiroa* (Rutaceae) fue establecido en México por los botánicos mexicanos Pablo de la Llave y Juan Martínez Lexarza, en 1825. Dicho género, está conformado por las siguientes diez especies:

- C. tetrameria* Millps.
- C. pringlei* (Wats.) Engl.
- C. watsoni* Engler
- C. edulis* Llave et lex.
- C. pubescens* Ramírez
- C. sapota* Oerst f. *typica*
- C. emarginata* St. et Steyerm
- C. microcarpa* Lundell
- C. calderoniae* Chiang & Medrano
- C. greggii* (Watson) Chiang

Los individuos de estas especies son árboles o arbustos originarios de México y Centroamérica y habitan en climas cálidos (Martínez, 1951).

En México, las especies *C. pubescens*, *C. pringlei*, *C. microcarpa*, *C. greggii*, *C. watsonii*, *C. tetrameria*, *C. emarginata* y *C. calderoniae*, se encuentran en forma silvestre (García-Argáez, 2002). Las únicas especies que son objeto de cultivo o semicultivo por sus frutos grandes y comestibles son *C. edulis* y varias formas de *C. sapota*, *C. edulis* (zapote blanco) debido a su valor comercial y a las propiedades medicinales que se le atribuyen, es la especie del género *Casimiroa* más estudiada (García-Argáez, 2002).

2.4.4 Especie *Casimiroa calderoniae*

En 1981, Chiang y González-Medrano encontraron una nueva especie de *Casimiroa* en la región del valle de Tehuacan, Puebla y la zona árida de Oaxaca adyacente (Figura 3), a la que denominaron primeramente *Casimiroa calderonii* y posteriormente *Casimiroa calderoniae*, que es como actualmente se conoce a esta especie (Chiang y González-Medrano, 1981; 1984). El epíteto específico de esta especie es en honor de la botánica Graciela Calderón de Rzedwiski, estudiosa de la flora mexicana.

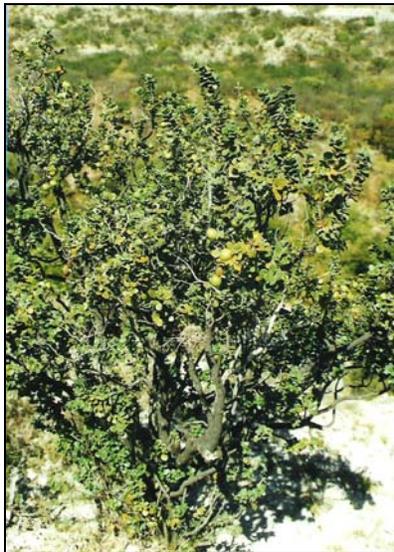


Figura 2. Arbusto de *C. calderoniae*.

C. calderoniae es un arbusto dioico, de hasta 2.5 m de alto, muy ramificado desde la base. Posee ramas jóvenes pubescentes, luego glabras (Figura 2); hojas trifolioladas, a veces con 1 o 2 folíolos; pecíolos y pecíolulos pubescentes de 2 a 5 mm de largo. Tiene folíolos obovados, con la base cuneada y el ápice retuso, con pubescencia aterciopelada, más densa en el envés, de 20 a 30 mm de largo, 13 a 18 mm de ancho y el margen revoluto. Igualmente posee inflorescencia (♂) paniculada, axilar o terminal de 10 a 35 mm de largo. Tiene flores (♂) de 8 mm de diámetro, de color blanco cremoso; cáliz de 2 mm de largo, pubescente, con 5 lóbulos cortos deltoideos; 5 pétalos, pubescentes en el lado axial, oblongo-lanceolados, de 4.5 mm de largo 5 mm de ancho. Flores (♀) solitarias o en grupos de 1 a 3 en fascículos laterales o terminales. Drupa escasamente pubescente,

ovoidea, de 30 mm de largo y 25 mm de ancho, que va encorvándose a medida que crece, por lo que el pedúnculo y los restos del estigma no se encuentran alineados en la misma dirección. Puede tener de 1 a 2 semillas. Tiene un número cromosómico $n = 18$. El fruto maduro es moreno amarillento de 6 cm de largo con sabor dulce. En la Figura 3, se muestra la región donde generalmente se encuentra dicha especie (Chiang y González-Medrano, 1981).

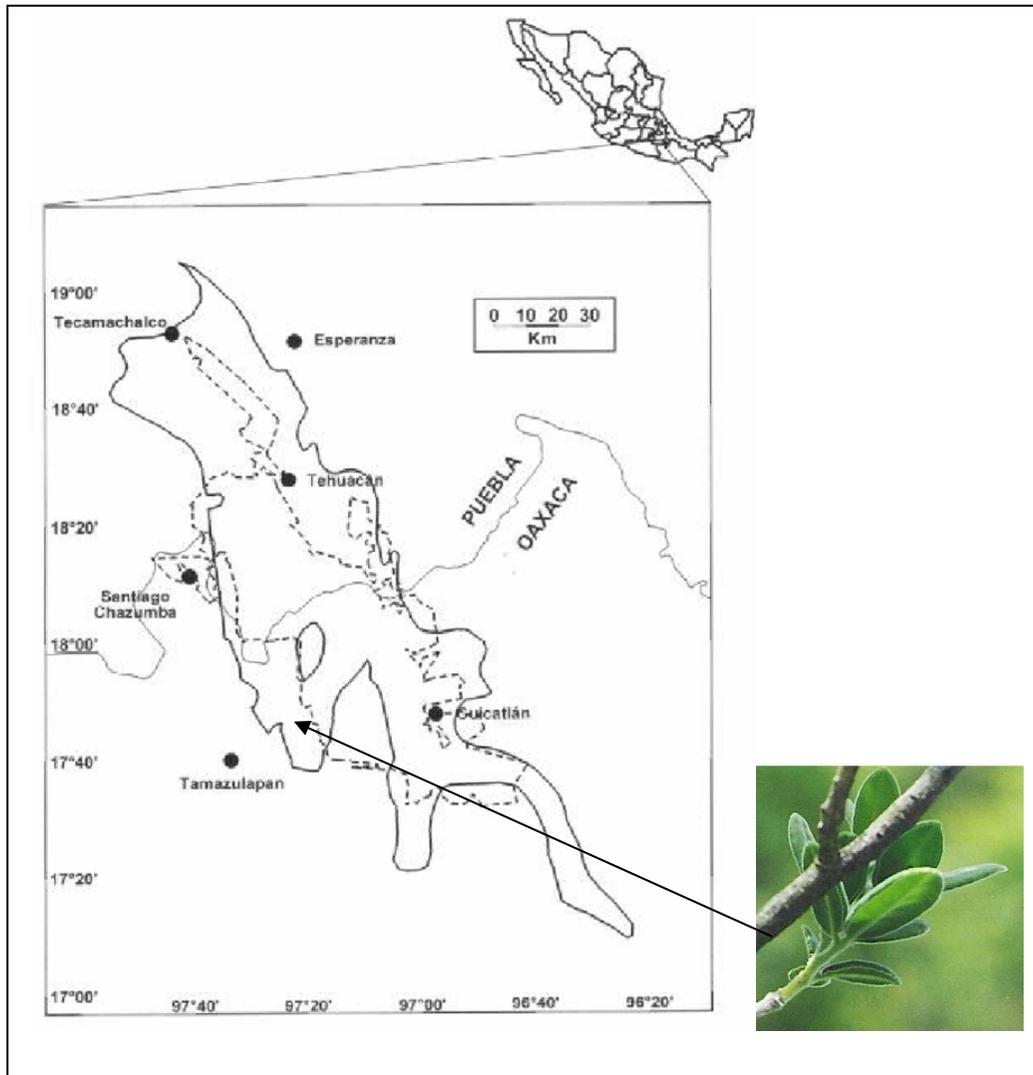


Figura 3. Localización geográfica de *Casimiroa calderoniae*

2.4.5 Antecedentes etnomédicos del género *Casimiroa*

Las plantas curativas en la medicina prehispánica eran clasificadas dentro de una particular interpretación de los fenómenos biológicos. Poco o nada sabemos de los principios fisiológicos del saber médico de aquella época, aunque parte de la herbolaria medicinal prehispánica fue recopilada por los investigadores Francisco Hernández y Bernardino de Sahagún.

Bernardino de Sahagún, en su obra *Historia General de las Cosas de Nueva España*, escrita entre 1540 y 1680, dedica unas líneas a los zapotes (forma como se castellanizó el sonido *tzápotl*) y señala: “Hay un árbol que se llama *tzápotl*: es liso, tiene corteza verde, las hojas redondas, la madera blanca, blanda y liviana. La fruta de estos árboles es como manzanas grandes, de fuera son verdes o amarillas y por dentro blancas y blanda; son muy dulces, tienen tres o cuatro cuescos dentro, blancos y si se comen muchos dan cámaras (diarrea). Hay otros zapotes que se llaman *cochizápotl*.”

El historiador y naturalista Francisco Hernández recoge en su obra *Historia de plantas de Nueva España*, escrita a partir de 1790, una descripción más precisa de un zapote medicinal y sobre todo el uso que se hacía de estas plantas: “Del *cochizápotl* o *tzápotl* somnífero. Es un árbol grande, desaliñado con hojas como de cidro, ralas y en grupos de tres, con tallos llenos de lunares blancos, flores amarillas y medianas y fruto de forma y tamaño de membrillo, al que nuestros españoles llaman zapote blanco, comestible, de sabor agradable pero no del todo saludable como alimento y con huesos de almendra venenosa y mortífera. La corteza del árbol es seca y un poco dulce con cierto amargo; las hojas machacadas y aplicadas a los pezones de las nodrizas, curan las cámaras de los infantes; los huesos quemados y hechos polvo curan las úlceras pútridas, quemando y consumiendo por completo la carne viciada, limpiando la úlcera creando carne nueva y produciendo la cicatrización con rapidez admirable; los frutos comidos concilian el sueño de donde les viene el nombre” (Martínez, 1951).

2.4.6 Antecedentes farmacológicos del género *Casimiroa*

C. edulis (zapote blanco) es, hasta el momento, la única especie del género *Casimiroa* estudiada desde el punto de vista farmacológico. Diversas investigaciones han demostrado que posee efectos cardiovasculares y sobre el sistema nervioso central (SNC).

Ramírez y Rivero (1936) mezclaron el extracto de las semillas de *C. edulis* con dos partes de glicerol y veinte de agua, como era usado comercialmente a modo de hipnótico. En dicho estudio se encontró que *C. edulis* posee un fuerte y persistente efecto hipotensor.

Asimismo, Lozoya y colaboradores (1977) informaron que los extractos alcohólicos y acuosos de hojas o semillas producen efectos hipotensores en perros, gatos y conejos. Más tarde, los estudios sistemáticos efectuados por Magos y colaboradores (1991; 1991b; 1995; 1999) de los extractos alcohólicos y acuosos de semillas de esta especie, permitieron el aislamiento de algunos compuestos bioactivos análogos a la histamina con actividad hipotensora. En dichos estudios se menciona que los efectos hipotensores pueden estar mediados a través de la estimulación de receptores histaminérgicos H_1 y H_2 (Magos *et al.*, 1999).

En otro estudio, Muccillo y colaboradores (2004), informaron la actividad vasorrelajante de un extracto acuoso de semillas de *C. edulis*. Este trabajo se realizó sobre la capa mesentérica arterial de ratas y en él se menciona que es posible que el extracto ocasione la liberación de óxido nítrico (NO), provocando un efecto vasodilatador.

Por otro lado, se han realizado diversas investigaciones para verificar la actividad de *C. edulis* en el SNC. Por ejemplo, Molina-Hernández y colaboradores (2004), realizando estudios en ratas de extractos acuosos de las hojas, confirmaron la actividad ansiolítica de *C. edulis*, así como la presencia de algunos efectos secundarios, tales como la disminución de la actividad locomotriz, así como la neutralización de los efectos antidepresivos de la desipramina.

Otras investigaciones han estado enfocadas a la determinación de la actividad antiepiléptica de *C. edulis*. En una de ellas, Navarro y colaboradores (1995) evaluaron la actividad anticonvulsiva de un extracto acuoso de las hojas, administrando dosis de 100 mg/kg a ratas por vía oral. En este caso se utilizaron los modelos de inducción de epilepsia a través de la aplicación de estímulos eléctricos (electroshock máximo) y con pentilentetrazol (PTZ) administrado vía subcutánea, observándose la disminución de las crisis inducidas, en un 50 y 70%, respectivamente. En otro estudio en el que se emplearon los mismos modelos (Garzón de la Mora *et al.*, 1999), se investigó la actividad anticonvulsiva de los extractos acuoso y etanólico de semillas de *C. edulis*. En este caso, el extracto acuoso se evaluó a dosis de 5, 10 y 100 mg/kg, mientras que el etanólico se administró a dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg. Ambos extractos se aplicaron vía oral y se encontró que ninguno de ellos evitaba la presencia de convulsiones, pero originaban un aumento del tiempo de latencia de las mismas, lo cual permitió concluir que producían un efecto neuroprotector en contra de las crisis epilépticas.

2.4.7 Antecedentes químicos del género *Casimiroa*.

Debido a las propiedades que se le atribuyen, *Casimiroa edulis* es la especie del género más estudiada, tanto desde el punto de vista químico, como farmacológico. Se han realizado estudios de semillas, corteza de tronco y raíces, así como del fruto y hojas. En dichos estudios se han encontrado compuestos, tales como cumarinas, flavonoides, alcaloides, triterpenos, entre otros. (Kincl *et al.*, 1956; Iriarte *et al.* 1959; Sondheimer *et al.*, 1960; Romero *et al.*, 1983; Power *et al.*, 1912).

Por otro lado, además de *C. edulis*, se han realizado estudios a las especies *C. greggii*, *C. pringlei*, *C. pubescens* y *C. tetrámeria*. Los metabolitos aislados y caracterizados de estas especies son, en su mayoría, flavonoides y cumarinas (Domínguez *et al.*, 1972; 1976; Castellanos, 1998; Heneka, *et al.*, 2005), aunque en el caso concreto de *C. pubescens* se han encontrado además alcaloides y

compuestos de estructura novedosa como las pubesamidas A, B y C (González-Lugo, 2003; García-Argáez et al., 2003; García-Argáez et al., 2005).

En el caso específico de *Casimiroa calderoniae*, se han detectado las cumarinas felopterina, isopimpinolina, heraclenol y heraclenina, en semillas y hojas (García-Argáez et al., 2003). Estos compuestos también se encuentran presentes en otras especies del mismo género, particularmente en *C. edulis* y *C. pubescens*, por lo que se puede decir que existe un notable parecido químico entre *C. calderoniae* y dichas especies.

En el Cuadro 4 se presenta una relación de los compuestos aislados y/o detectados, hasta la fecha, en las distintas especies del género *Casimiroa*. Como puede observarse, las flavonas y cumarinas están ampliamente distribuidas en las distintas especies de este género. En las figuras 4, 5 y 6 se muestran algunas de las estructuras de los compuestos característicos del género en estudio.

Cuadro 4. Compuestos aislados y/o detectados en especies del género *Casimiroa*

Especie		<i>C. edulis</i>	<i>C. greggii</i>	<i>C. pringlei</i>	<i>C. tetrameria</i>	<i>C. pubescens</i>	<i>C. calderoniae</i>
		Compuesto					
Triterpenos	Zapoterina						
	Obacunona						
Esteroles	β-Sitosterol						
	β-D-Glucosil-β-sitosterol						
	Triacetil-daucosterol						
Alcaloides quinolínicos	Casimiroína						
	Casimiroedina						
	Edulina						
	Edulitina						
	Edulinina						
	γ-Fagarina,						
	Dictamina						
	Skimmianina						
	Eduleína						
1-metil-2-fenilquinol-4-ona							
Alcaloides Histáminicos	Histamina						
	N,N-Dimetilhistamina						
	N-Metilhistamina						
	N-Benzoiltiramina						
Amidas	Palmitamida						
Flavonoides	Zapotina						
	Zapotinina						
	Rutina						
	Cerrosillina						
	Cerrosillina B						
	5,6-Dimetoxiflavona						
	2',5,6-Trimetoxiflavona						
	5,6,2-Trimetoxiflavona						
	5,6,3'-Trimetoxiflavona						
	5,3',5'-Trimetoxiflavona						
	5,6,3',4'-Tetrametoxiflavona						
	5,6,2',3',6'-Pentametoxiflavona						
	5,6,2',3',4'-Pentametoxiflavona						
	5, 2',3',4',6'-Pentametoxiflavona						
	5,2',3',5',6'-Pentametoxiflavona						
5,6,3',4',5',6'-Hexametoxiflavona							
5,6,2',3',4',6'-Hexametoxiflavona							
5,6,2',3',5',6'-Hexametoxiflavona							
Flavonoides glicosilados	3-O-glucosil quercetina						
	3-O-rutinosil quercetina						
	3-O-glucosil camferol						
	3-O-rutinosil camferol						

Cuadro 4. Compuestos aislados y/o detectados en especies del género *Casimiroa* (continuación)

Especie		<i>Casimiroa edulis</i>	<i>Casimiroa greggii</i>	<i>Casimiroa pringlei</i>	<i>Casimiroa tetrameria</i>	<i>Casimiroa pubescens</i>	<i>Casimiroa calderoniae</i>
Compuesto							
Cumarinas	Felopterina						
	5-Geranioloxipsoraleno						
	8-Geraniol-oxipsoraleno						
	8-Geraniol-5-metoxi-oxipsoraleno						
	9-Hidroxi-4-metoxi-furano-(3,2,6)-benzopiran-7-ona						
	Escopoletina						
	Ester metílico de escopoletina						
	Bergapteno						
	Isopimpinolina						
	8-[(4-Acetoxy-3-metil-butil)oxi]psoraleno						
	Seselina						
	O-Geraniol-ostenol						
	8-[(6,7-Dihidroxi-3,7-dimetil-2-octenil)oxi]-psoraleno						
	(α, α -Dimetil herniarina						
	5-Metoxi-8-(3"-hidroximetil-but-2"-eniloxi)-psoraleno						
	Heraclenol						
	Heraclenina						
	Xanthotol						
Cumarina 7							
Cumarina 8							
Hidrocarburos	Cerotato de carnaubilo						
	Hentriacontano						
Pubesamidas	Pubesamida A						
	Pubesamida B						
	Pubesamida C						



Presencia del compuesto en la especie

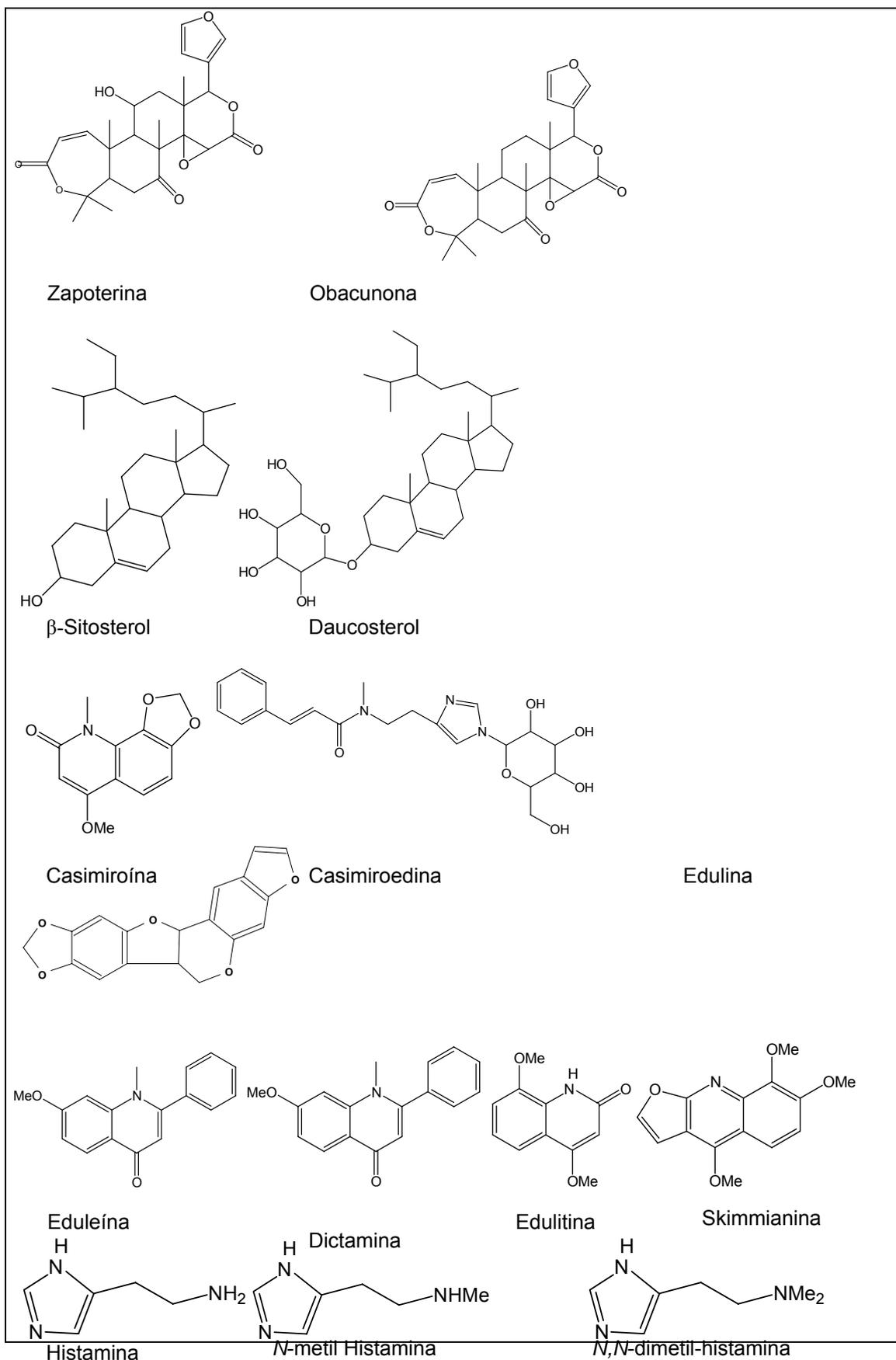
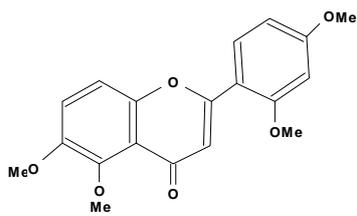
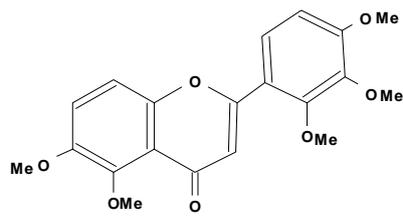


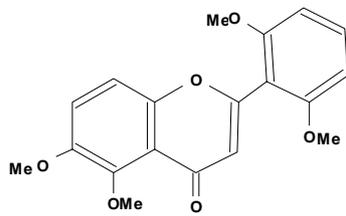
Figura 4. Estructuras de alcaloides, triterpenos y esteroides aislados de algunas especies del género *Casimiroa*.



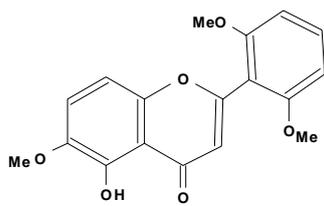
Cerrosillina



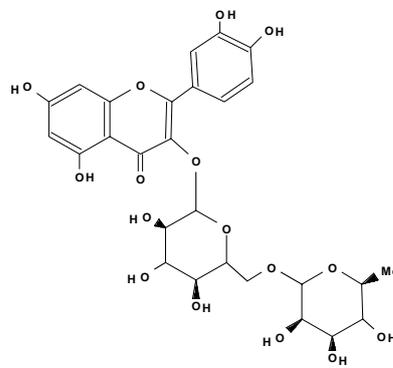
Cerrosillina B



Zapotina



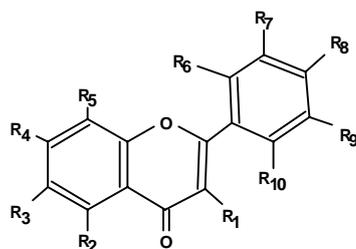
Zapotina



Rutina

Flavonoide	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

Estructura general de flavonoides



5,3', 5'-Trimetoxiflavona	H	MeO	H	H	H	H	MeO	H	MeO	H
5,6,3',4'-Tetrametoxiflavona	H	MeO	MeO	H	H	H	MeO	MeO	H	H
5,6,2',3',6'-Pentametoxiflavona	H	MeO	MeO	H	H	MeO	MeO	H	H	MeO
5,6,2',3',4'-Pentametoxiflavona	H	MeO	MeO	H	H	MeO	MeO	MeO	H	H
5, 2',3',4',6'-Pentametoxiflavona	H	MeO	H	H	H	MeO	MeO	MeO	H	MeO
5,2',3',5',6'-Pentametoxiflavona	H	MeO	H	H	H	MeO	MeO	H	MeO	MeO
5,6,3',4',5',6'-Hexametoxiflavona	H	MeO	MeO	H	H	H	MeO	MeO	MeO	MeO
5,6,2',3',4',6'-Hexametoxiflavona	H	MeO	MeO	H	H	MeO	MeO	MeO	H	MeO
5,6,2',3',5',6'-Hexametoxiflavona	H	MeO	MeO	H	H	MeO	MeO	H	MeO	MeO

Figura 5. Estructuras de flavonoides aislados de algunas especies del género *Casimiroa*.

Figura 6 Estructura de flavonoides hallados en especies del género *Casimiroa*

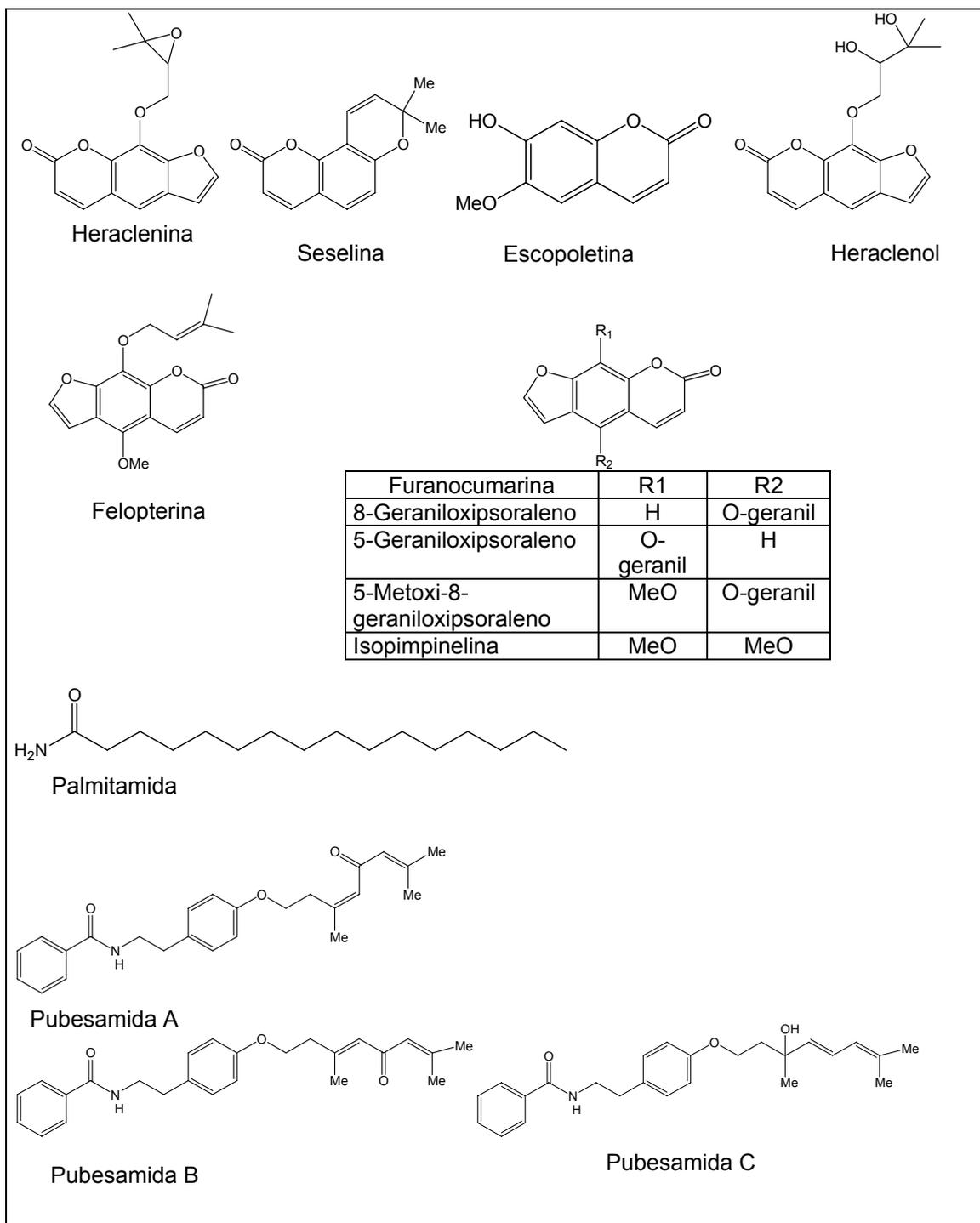


Figura 6. Estructura de cumarinas y amidas aisladas de algunas especies del género *Casimiroa*.

3. HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes químicos y biológicos del género *Casimiroa* y mediante una aproximación quimiotaxonómica, es factible suponer que la especie *Casimiroa calderoniae* posea propiedades anticonvulsivas, y su estudio químico permitirá el aislamiento de cumarinas y flavonoides, metabolitos secundarios bioactivos presentes en el género *Casimiroa*.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial anticonvulsivo de *Casimiroa calderoniae* y aislar los metabolitos secundarios mayoritarios de dicha especie, con el fin de contribuir al conocimiento del género *Casimiroa*, así como al desarrollo de nuevos agentes antiepilépticos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener los extractos orgánicos, a partir de hojas de la especie *Casimiroa calderoniae*. empleando como disolventes hexano, acetato de etilo y etanol al 70%.
- Evaluar la toxicidad aguda de los extractos orgánicos.
- Evaluar la actividad anticonvulsiva de cada extracto, empleando la prueba de epilepsia inducida por Pentilentetrazol (PTZ).
- Aislar, purificar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos de hojas de *Casimiroa calderoniae*.
- Contribuir al conocimiento químico y biológico del género *Casimiroa*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Estrategia general de trabajo

En la Figura 7 se muestra el esquema general de actividades seguido en el presente trabajo.

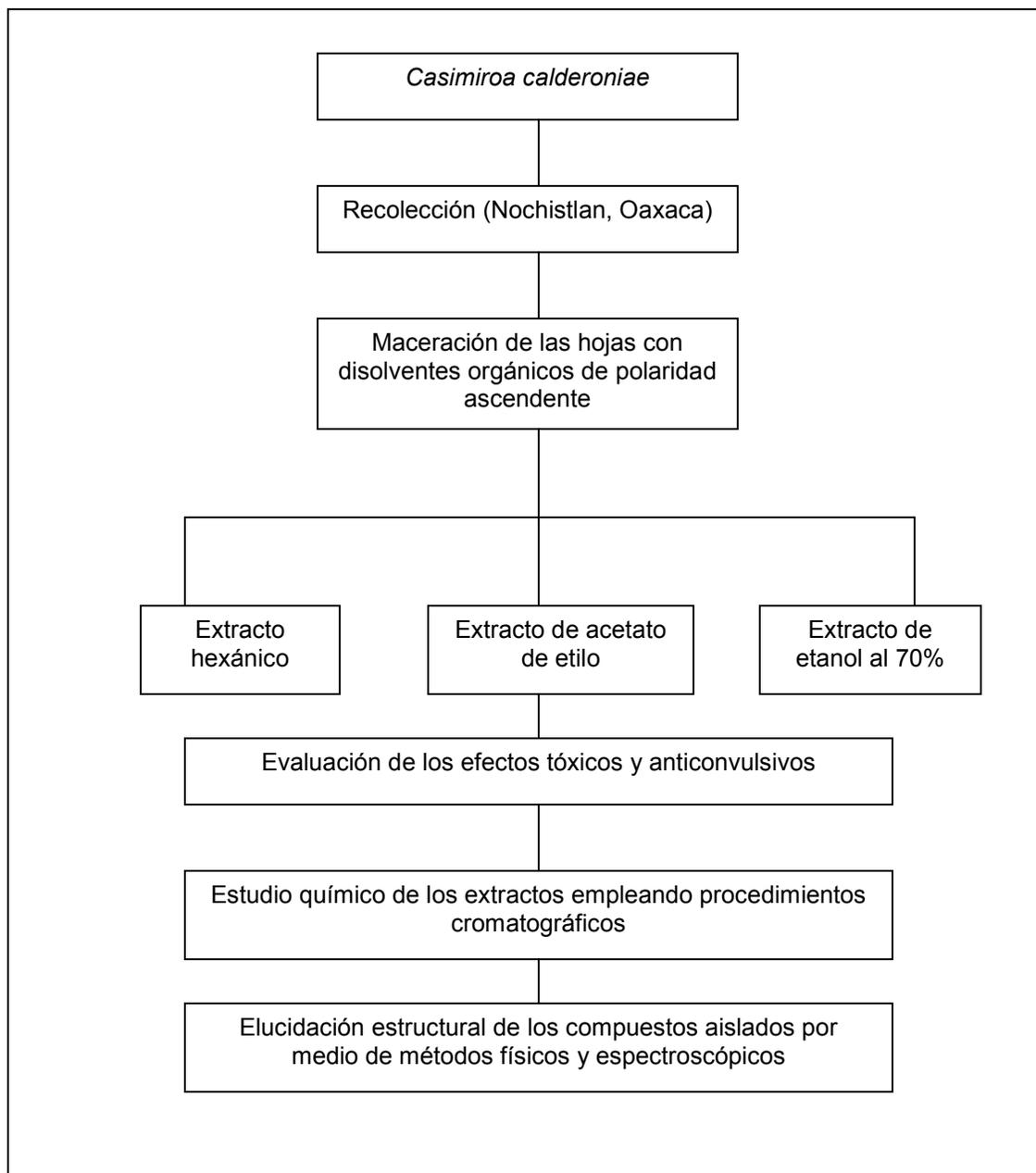


Figura 7. Estrategia general de trabajo.

5.2 Material vegetal

La especie *Casimiroa calderoniae* se recolectó en Nochistlán, Oaxaca, el 15 de diciembre 2003 (clave oax-2003-12-15 3). Posteriormente las hojas se separaron, secaron a temperatura ambiente y se molieron.

5.3 Extracción

Las hojas finamente molidas (3.2 kg) se colocaron en un recipiente de capacidad aproximada de 19 litros, y fueron maceradas con disolventes de polaridad ascendente (hexano, acetato de etilo, etanol al 70%). Lo anterior se llevó cabo a temperatura ambiente y con un intervalo de maceración de una semana con cada disolvente. El material vegetal se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida hasta sequedad.

5.4 Evaluación de la actividad Biológica

5.4.1 Efectos tóxicos

Para determinar los efectos tóxicos de los extractos en estudio, se evaluaron diversas dosis de cada extracto, administradas vía intraperitoneal y se observó si existían signos de toxicidad. Se utilizaron ratones macho adultos jóvenes de la cepa Swiss Webster, habituados a un ciclo invertido de luz-oscuridad y mantenidos *ad libitum*.

5.4.2 Efectos anticonvulsivos

La determinación de la actividad anticonvulsiva se llevó a cabo utilizando el modelo de inducción de crisis epilépticas por PTZ. Para ello se utilizaron ratones cepa Swiss Webster macho adultos jóvenes habituados a un ciclo invertido de luz-oscuridad y mantenidos *ad libitum*.

Para el diseño experimental, la población de ratones utilizada se dividió en tres grupos, testigo, control y tratamiento con $n = 7-10$ cada uno. Como puede verse resumido en el Cuadro 5, primero se administraron por vía intraperitoneal las dosis a evaluar, según el grupo, y posteriormente, se indujeron químicamente crisis

convulsivas con una dosis de 70 mg/kg de pentilentetrazol (PTZ) vía intraperitoneal.

Cuadro 5. Diseño experimental para la evaluación de los efectos anticonvulsivos de la especie *Casimiroa calderoniae*.

Grupo	Administración	Latencia	PTZ mg/kg
Testigo	Diazepam 1 mg/kg	0.5 h	70
Control	Solución salina isotónica	1 h	70
Tratamiento	Diversas dosis de cada extracto orgánico	1 h	70

Las variables que se cuantificaron fueron, el tiempo (latencia) en el cual se manifestaba la primera crisis mioclónica, el tiempo (latencia) en el cual aparecía la primera crisis tónica, el porcentaje de respuesta presentada por los animales de experimentación y el porcentaje de animales muertos.

En el caso de los grupos de tratamiento en los cuales se observó algún efecto protector, se llevaron a cabo experimentos induciendo crisis convulsivas con una dosis de PTZ de 90 mg/kg (Feria-Velasco y Orozco-Suárez, 2005; Granillo, 2002).

5.4.3 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en todos los experimentos fueron analizados estadísticamente. Para determinar si existen diferencias significativas entre el control y los grupos experimentales, se utilizó el análisis de varianza Kruskal-Wallis en rangos, seguido de una prueba de Mann-Whitney (rangos). Valores de $P < 0.05$ se consideraron como significativos (López-Rubalcava *et al.*, 2006).

5.5 Análisis Cromatográfico

Para la separación de compuestos por cromatografía en columna (CC), se utilizó como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil hexano, acetato de etilo y metanol, así como mezclas entre ellos. Asimismo se utilizaron columnas de vidrio de diferentes capacidades.

Para la identificación de compuestos por cromatografía en capa fina (CCF), se utilizaron cromatoplasmas de gel de sílice F₂₅₄ Merck como fase estacionaria y como fase móvil hexano, acetato de etilo y metanol, así como mezclas entre ellos. Para la separación y purificación de compuestos por cromatografía en capa preparativa (CCP), se utilizaron cromatofolios de gel de sílice Merck.

5.5.1 Fraccionamiento primario del extracto hexánico

El fraccionamiento del extracto hexánico se llevó a cabo colocando 24.4422 g de extracto adsorbido en sílice en una columna cromatográfica de vidrio con 6 cm de diámetro y longitud de 20cm. Como fase móvil se empleó hexano y se aumentó la polaridad gradualmente con mezclas de hexano-acetato de etilo. En el Cuadro 6 se muestran las fracciones obtenidas, así como los disolventes utilizados para llevar a cabo el fraccionamiento.

Cuadro 6. Fracciones obtenidas en la CC del extracto hexánico.

Polaridad	Fracciones
Hexano	1-5
8:2, Hex-AcOEt	6-21
7:3, Hex-AcOEt	22-23
1:1, Hex-AcOEt	34-52
3:7, Hex-AcOEt	53-74

5.5.2 Fraccionamiento primario del extracto de acetato de etilo

Se colocaron 37.3215g de dicho extracto impregnado con gel de sílice en una columna cromatográfica. Como fase móvil se comenzó con hexano y se aumentó la polaridad gradualmente con mezclas de hexano-acetato de etilo, acetato de etilo-metanol y por último solo metanol. En el Cuadro 7 se muestra un resumen de las fracciones obtenidas y la polaridad correspondiente según la mezcla de disolventes empleada.

Cuadro 7. Fracciones obtenidas en la CC del extracto de acetato de etilo.

Polaridad	Fracciones
Hexano	1-16
9:1, Hexano-AcOEt	17-102
7:3, Hexano-AcOEt	103-112
3:7, Hexano-AcOEt	113-177
1:9, Hexano-AcOEt	178-181
AcOEt	182-194
9:1, AcOEt-Metanol	195-209
Metanol	210-226

5.5.3 Fraccionamiento primario del extracto etanólico al 70%

Para la separación del extracto etanólico al 70 %, 125.46g de este se sometieron a una extracción por par de disolventes con diclorometano (CH_2Cl_2) y agua. Cada fase se separó y concentró a presión reducida para obtener 114.62g de extracto acuoso y 11g de extracto orgánico (CH_2Cl_2). Este último, se impregnó con gel de sílice y se colocó en una columna de vidrio con sílice, para realizar la separación cromatográfica. En el Cuadro 8 se muestran las fracciones obtenidas y su polaridad correspondiente.

Cuadro 8. Fracciones separadas a partir del extracto etanólico.

Polaridad	Fracciones
Hexano	1
1:1, Hex-AcOEt	2-34
4:6, Hex-AcOEt	35-42
3:7, Hex-AcOEt	43-54
2:8, Hex-AcOEt	55-74
AcOEt	75-104
9:1, AcOEt-Metanol	105-119
8:2, AcOEt-Metanol	120-132
2:1, AcOEt-Metanol	133-146
1:1, AcOEt-Metanol	147-154
4:6, AcOEt-Metanol	155-177
3:7, AcOEt-Metanol	178-191
2:8, AcOEt-Metanol	192-209
Metanol	210-226

En el Cuadro 9 se muestran los productos aislados a partir de la separación por cromatografía en columna de los tres extractos orgánicos, descrita anteriormente.

Cuadro 9. Productos aislados en la separación por cromatografía en columna de los extractos hexánico, acetato de etilo y etanólico.

Sólido	Fracciones			Peso (mg)	Punto de fusión (°C)	Descripción
	Hex	AcOEt	Etanol 70%			
1	24 (60.4mg)	47 (44.37mg)		104.77	95-96	Sólido, polvo fino color amarillo pálido
2	24 (13.2mg)	47 (10.1mg)		23.3	30-33	Sólido amarillo
3		111-115		222	77-78	Sólido, polvo fino color marfil
4		123-125		522.8	83-84	Sólido, polvo fino color amarillo pálido
5		131 (176mg)	35 (22.6mg)	198.6	94-95	Sólido, polvo fino blanco

Los puntos de fusión (p.f.) de los compuestos aislados se determinaron en un aparato Fisher-Johns y los valores se informan en grados Celsius (°C) sin corrección.

5.6 Análisis Espectroscópico

Los espectros en el infrarrojo (IR), se obtuvieron en un espectrofotómetro Nicolet Magna IR Spectofotometer 750, en pastilla de KBr con 1mg de muestra. Las absorciones se informan en cm^{-1} .

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN), se determinaron a 200 y 300 MHz en el caso de RMN- ^1H y 75 MHz para RMN- ^{13}C , en espectrómetros analíticos Varian GEMINI-200, JEOL Eclipse 300 y Varian UNITY 300. Se utilizó como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y se utilizó Tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Se utilizaron secuencias de pulso para experimentos de desacoplamiento y por transferencia de polarización en ^1H y ^{13}C (DEPT).

Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm), las señales se indican de la siguiente manera: s = singulete, d = doblete, dd = doble doblete, t = triplete, c = cuarteto, m = multiplete y a = señal ancha, las constantes de acoplamiento (J) se dan en hertz (Hz).

El análisis espectroscópico por espectrometría de masas (EM), se llevó a cabo en equipos Hewlett-Packard modelo 5945 A y JEOL AX505HA mediante la técnica de impacto electrónico.

6. Resultados y discusión

En esta sección se muestran los resultados obtenidos a lo largo de la presente investigación. Una vez obtenidos los extractos orgánicos, se realizaron los experimentos para verificar su toxicidad. Posteriormente se probó la actividad antiepiléptica de cada extracto. Simultáneamente se realizó el fraccionamiento químico, así como la elucidación de los compuestos derivados de dicho fraccionamiento.

6.1 Obtención de los extractos

El rendimiento de cada extracto se muestra en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Extractos obtenidos de las hojas de *Casimiroa calderoniae*.

Disolvente	Peso de extracto	Rendimiento (%)
Hexano	99.6196g	3.1131
acetato de etilo	67.3215g	2.1037
etanol al 70%	235.57g	7.3615

6.2 Actividad farmacológica

6.2.1 Toxicidad

Los extractos orgánicos mostraron una toxicidad variable al ser evaluados en ratones Swiss Webster macho adultos. Se observó que la toxicidad dependía del extracto administrado. A continuación se describen los resultados obtenidos para los tres extractos.

6.2.1.1 Extracto hexánico

Las dosis administradas del extracto hexánico fueron 50, 100, 250, 500 y 1000 mg/kg. Se observó que, cuando se administraban las dosis de 50 a 250 mg/kg, los ratones no mostraban signos de toxicidad. Sin embargo, se observó que a partir de la dosis de 500 mg/kg, los ratones disminuían su actividad locomotriz (permanecieron inmóviles los primeros minutos), posteriormente se recuperaban. Cuando se administró la dosis de 1000 mg/kg, se observó depresión respiratoria, pérdida del reflejo de enderezamiento, convulsiones (crisis tónicas y cola de Straub.) y muerte en el 75% de los animales. Esto permite inferir que este extracto posee componentes con actividad excitatoria y tóxica.

6.2.1.2 Extracto de acetato de etilo

Las dosis administradas del extracto de acetato de etilo fueron 100, 250, 500 y 1000 mg/kg. Cuando se administró la dosis de 100 mg/kg, no se observaron signos de toxicidad; mientras que, al administrar la dosis de 250 mg/kg, los ratones sólo permanecían inmóviles los primeros minutos y se recuperaban.

Cuando se administraron las dosis de 500 y 1000 mg/kg, los ratones presentaron incoordinación motora en menos de 2 minutos, pérdida del reflejo de enderezamiento, y permanecían inmóviles durante 10 a 15 minutos. En estos casos, hubo muerte en el 9% de los animales.

Estos resultados, parecen evidenciar efectos hipnóticos-sedantes de este extracto. Por otro lado, se observa cierta toxicidad, aunque la $DL_{50} > 1000$ mg/kg.

6.2.1.3 Extracto etanólico al 70%

La administración de las dosis de 100, 250, 1000 y 1500 mg/kg del extracto etanólico al 70%, no produjo signos de toxicidad en ratones. Sin embargo, cuando se administró la dosis de 1500 mg/kg, se observó una disminución de la actividad locomotriz durante aproximadamente una hora y una posterior recuperación pasado ese lapso de tiempo.

En ninguna de las dosis evaluadas, el extracto etanólico produjo muerte ($DL_{50} > 1500$ mg/kg).

6.2.2 Actividad anticonvulsiva

6.2.2.1 Extracto hexánico

Tomando en consideración que a dosis bajas (<250 mg/kg) del extracto hexánico no se produjeron efectos tóxicos significativos, se evaluó la actividad anticonvulsiva de dicho extracto. Se evaluaron las dosis de 50 y 100 mg/kg empleando el modelo de PTZ, con una dosis de 70 mg/kg del agente convulsivante. No se observaron diferencias con respecto al control, aún más, los efectos observados a dosis altas (crisis tónicas) sugieren actividad excitatoria en lugar de inhibitoria.

6.2.2.2 Extracto de acetato de etilo

Para la evaluación de la actividad anticonvulsiva del extracto de acetato de etilo, se administró una dosis de PTZ de 70 mg/kg, como agente inductor de convulsiones. Las variables que se cuantificaron para este experimento fueron el tiempo que tardan los animales en presentar la primera crisis mioclónica y la primera crisis tónica (latencias), así como el porcentaje de respuesta y el porcentaje de muerte.

En la Figura 8 se muestra el porcentaje de respuesta. En este caso se evaluó la presencia de mioclonias cuando se administraron las dosis de acetato de etilo de 500 y 1000 mg/kg. Los porcentajes de respuesta fueron comparados con los obtenidos por el grupo control (SSI) y el grupo testigo (Diazepam, 1mg/kg). Puede verse que tanto el grupo control, como los grupos tratamiento a las dosis empleadas de extracto, presentaron mioclonías, mientras que el grupo testigo presentó un porcentaje de respuesta menor.

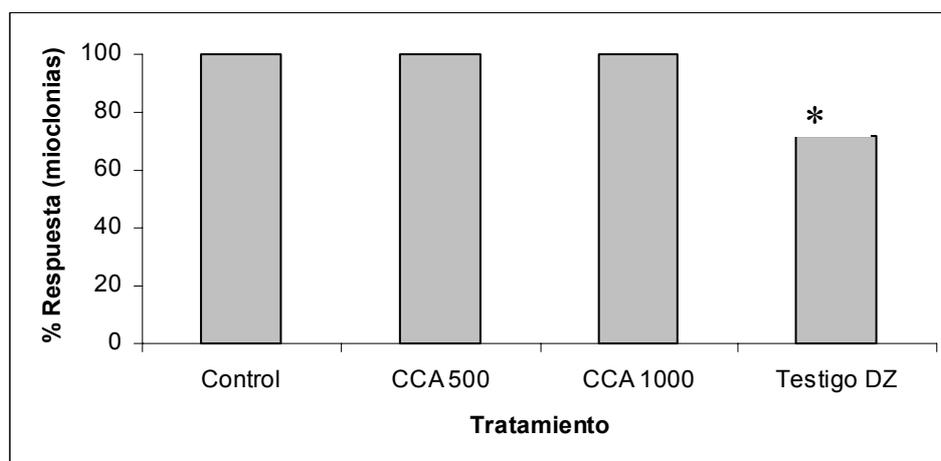


Figura 8. Porcentaje de animales que presentaron mioclonias (porcentaje de respuesta) después del tratamiento con 70 mg/kg de PTZ. Se evaluaron las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de AcOEt. (CCA500 y CCA1000). Kruskal-Wallis, Mann-Whitney * $P < 0.05$

Por otro lado, en el mismo experimento se cuantificó también el tiempo en el cual los animales tardaban en presentar las crisis mioclónicas (latencia) e igualmente se compararon los cuatro grupos, como puede verse en la Figura 9. En este caso, cuando se administraron las dosis de 500 y 1000 mg/kg por vía intraperitoneal del extracto de acetato de etilo, se observó claramente un aumento en el tiempo al cual aparece la primera crisis mioclónica, siendo la

dosis de 1000 mg/kg la que presenta el mayor tiempo registrado antes de presentar la primera crisis mioclónica, comparadas con el grupo control y el testigo.

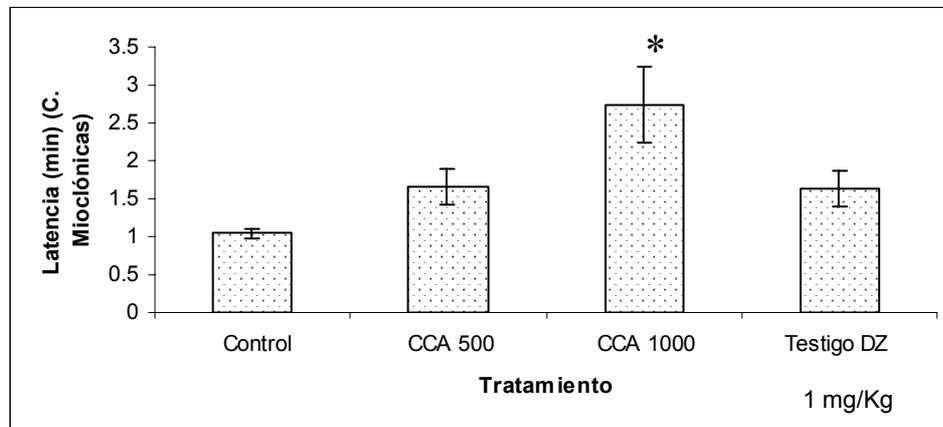


Figura 9. Latencias de las crisis mioclónicas (inducidas por PTZ) mostradas por los grupos tratamiento a las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de acetato de etilo (CCA500 y CCA1000). Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, * $P < 0.05$.

En este caso, se observó un efecto neuroprotector en las dosis de extracto evaluadas cuando se compararon con los controles. En la dosis de 500mg/kg se observó un efecto similar al del grupo testigo diazepam. Mientras que en la dosis de 1000mg/kg se observó un efecto neuroprotector mayor que el grupo testigo.

Por otro lado, dentro del mismo experimento, se evaluó también el porcentaje de animales que presentaron crisis tónicas y la latencia de las mismas. En la Figura 10 se observa el porcentaje de animales que presentaron crisis tónicas al administrar las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de AcOEt, comparadas con los grupos control y testigo. En el grupo control, la incidencia de las crisis tónicas es del 100%, mientras que en las dosis evaluadas de los extractos se observó una notable disminución en el porcentaje de animales que presentaron crisis tónicas. En el grupo testigo no existió la presencia de dichas crisis. Esto significa que los extractos protegieron a los animales de la presencia de crisis tónicas, sin embargo, no las suprimen totalmente.

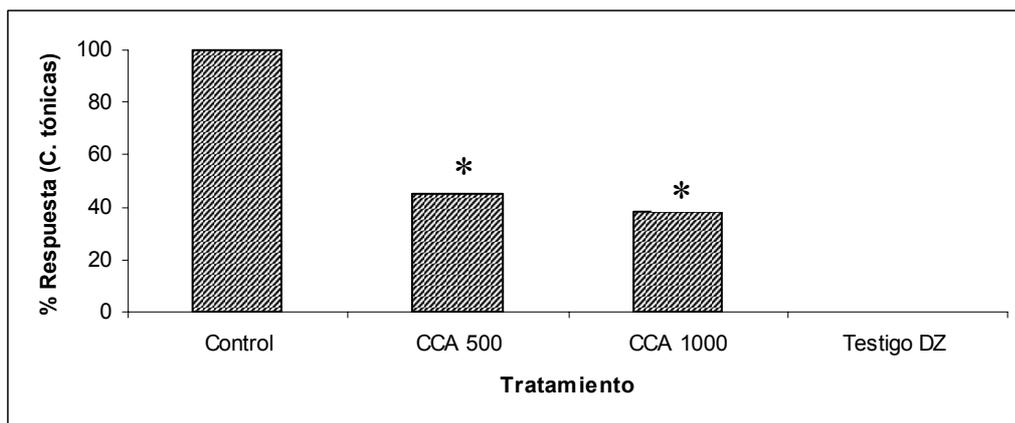


Figura 10. Porcentaje de animales administrados con las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de acetato de etilo y que manifestaron crisis tónicas cuando se administró el agente convulsivante PTZ. Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, * $P < 0.05$

De la misma manera, se midió la latencia en la cual los animales presentaban la primera crisis tónica. Cuando se administró la dosis de 1000 mg/kg del extracto de AcOEt, se observó un incremento en el tiempo al cual se presentó la primera crisis tónica (Figura 11).

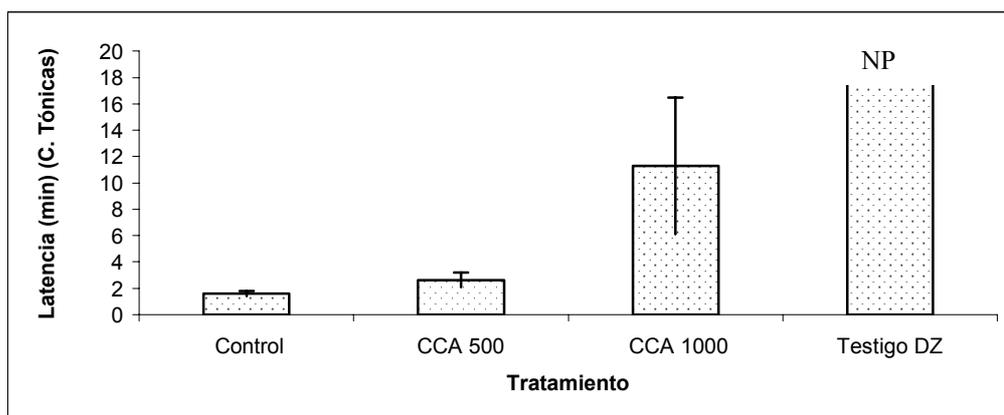


Figura 11. Latencia de las crisis tónicas presentadas por los grupos administrados con las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de acetato de etilo y el agente convulsivante PTZ. Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, * $P < 0.05$. NP: No presentó en un período de observación de 30 minutos

Por otro lado, las dosis administradas del extracto de acetato de etilo no modificaron, con respecto al grupo control, el porcentaje de animales que murieron (Figura 12).

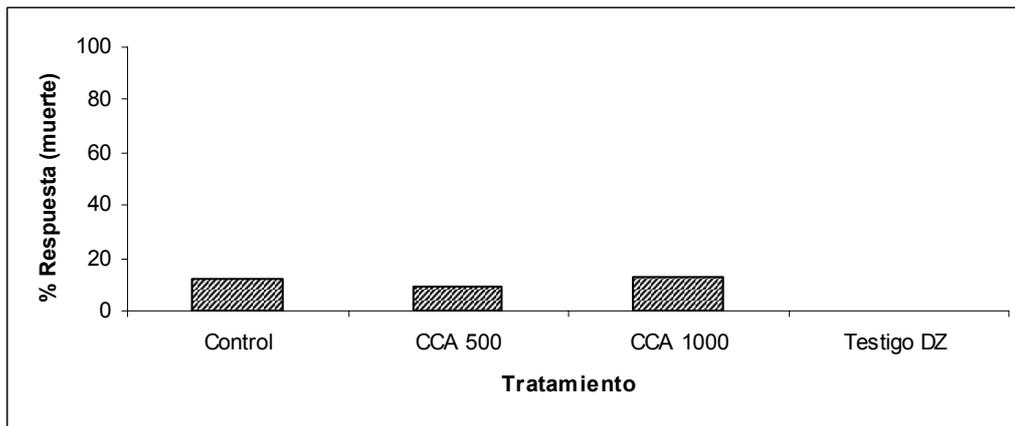


Figura 12. Porcentaje de muerte presentada por los animales tratados con las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de acetato de etilo y el agente convulsivante PTZ.

6.2.2.3 Extracto etanólico al 70%

La actividad anticonvulsiva del extracto etanólico al 70% se evaluó administrando las dosis de 1, 10 y 1000 mg/kg. Las crisis convulsivas se indujeron químicamente con una dosis de PTZ de 70mg/kg como en los casos anteriores. Se compararon igualmente, los grupos tratamiento con los grupos control y testigo.

Los resultados indicaron que este extracto no es capaz de modificar la presencia de mioclonias ni el período de latencia a la que se presentan.

Por otro lado, no se observaron cambios en el período de latencia en el que se presentaban las crisis tónicas; sin embargo, como se puede observar en la Figura 13 a la dosis de 1000 mg/kg se redujo en un 25% el porcentaje de respuesta. Es decir la administración del extracto protegió al 25% de la población de que presentara la crisis tónica.

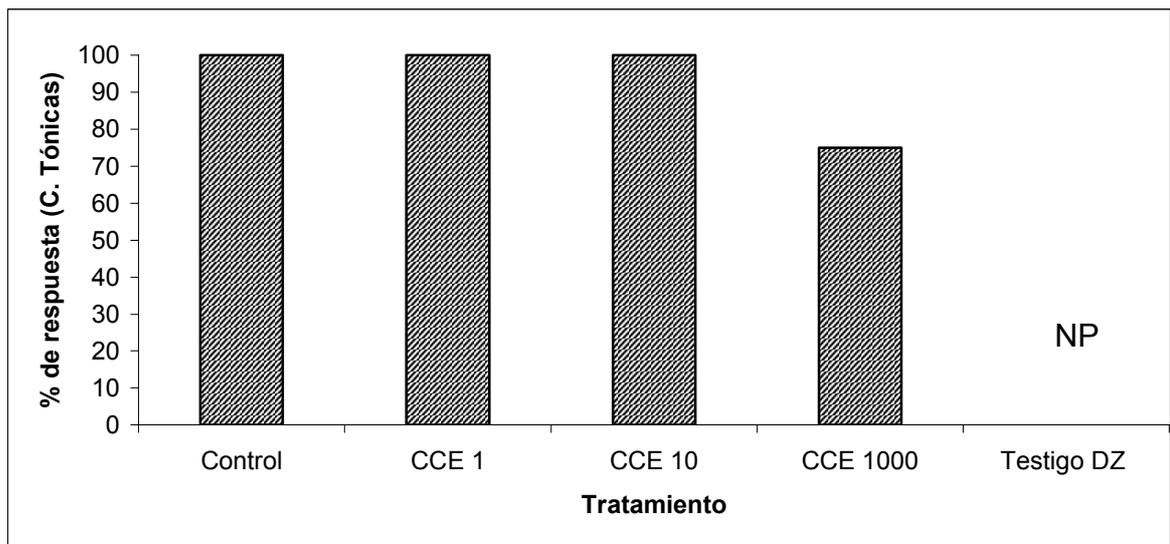


Figura 13. Porcentaje de animales que presentaron crisis tónicas (inducidas por PTZ 70 mg/kg) cuando se administraron con las dosis de 1, 10, 1000 mg/kg del extracto etanólico al 70%. NP: No presentó

Por otro lado, la incidencia de muerte que ocurrió cuando se administraron distintas dosis del extracto etanólico, se observa en la Figura 14. En ella podemos apreciar que los animales no murieron con las dosis administradas de 1 y 10 mg/kg. Sin embargo, en la dosis de 1000 mg/kg el porcentaje de muerte es mayor que el grupo control. Lo cual parece indicar un efecto dual protector/tóxico de este extracto que es dependiente de la dosis.

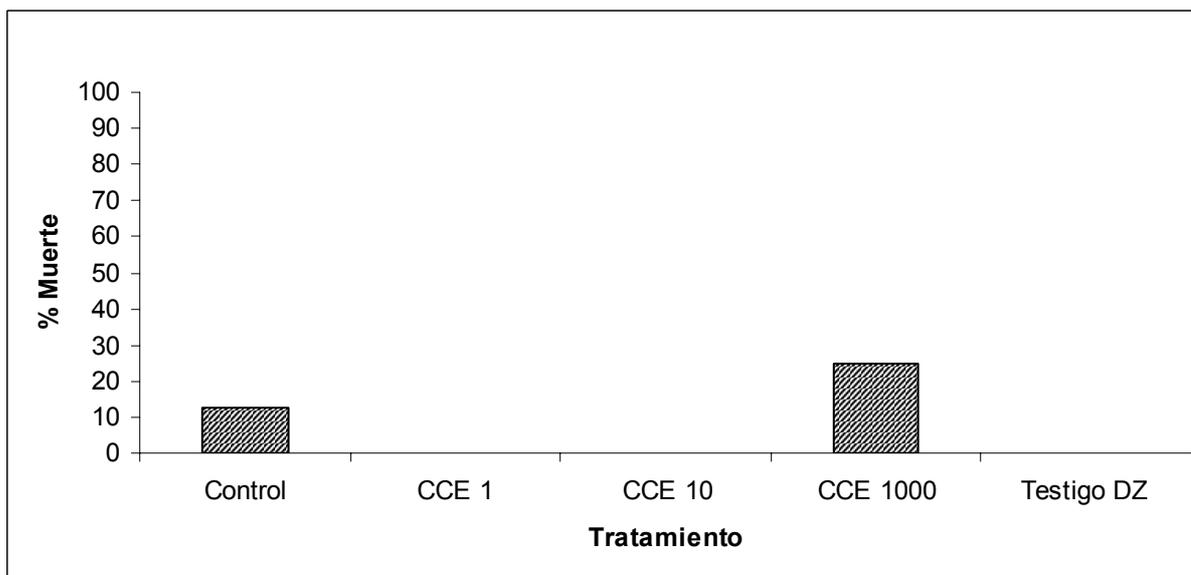


Figura 14. Porcentaje de muerte presentada cuando se indujeron crisis convulsivas con PTZ a la dosis de 70 mg/kg. Las dosis evaluadas del extracto etanólico fueron 1, 10 y 1000 mg/kg.

Con el fin de comprobar el efecto protector que se sugería a dosis bajas, se llevó a cabo un experimento en el que se indujo el fenómeno convulsivo con una dosis de 90 mg/kg de PTZ que se sabe genera el 100% de muerte

Para ello, se amplió la ventana farmacológica para incluir las dosis de 1, 5, 10 y 50 mg/kg de extracto etanólico al 70%.

En la Figura 15 se muestra el porcentaje de animales de cada grupo que presentaron mioclonías, cuando se administraron las dosis de extracto anteriormente mencionadas. Como puede verse, los grupos de tratamiento presentaron un porcentaje de respuesta menor que la manifestada por el grupo control. Sin embargo no se modificó el tiempo de latencia al cual este tipo de crisis se presentó.

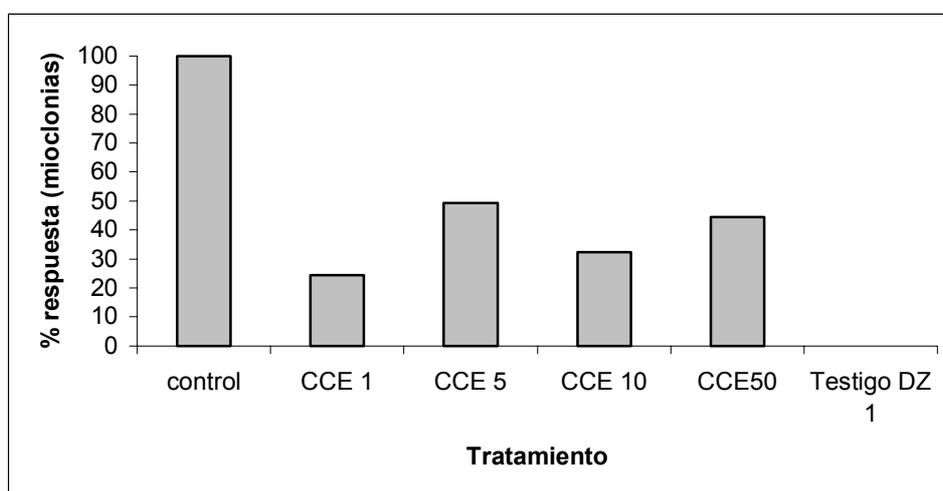


Figura 15. Porcentaje de animales que presentaron crisis mioclónicas inducidas por PTZ (90 mg/kg) en los diferentes grupos de tratamiento, control y testigo, al evaluar las dosis de 1, 5, 10, 50 mg/kg del extracto etanólico al 70%.

Por otro lado, el extracto etanólico no protegió de la presencia de crisis tónicas a los animales de experimentación, ni modificó el tiempo al cual se presentaron.

Como se puede observar en la Figura 16, a las dosis de 1, 5, 10 y 50 mg/kg, el extracto etanólico protegió de la muerte. Este efecto protector no fue dependiente de la concentración, más aún, parece ser dual. A la dosis de 5 mg/kg, se protegió al 80% de la población.

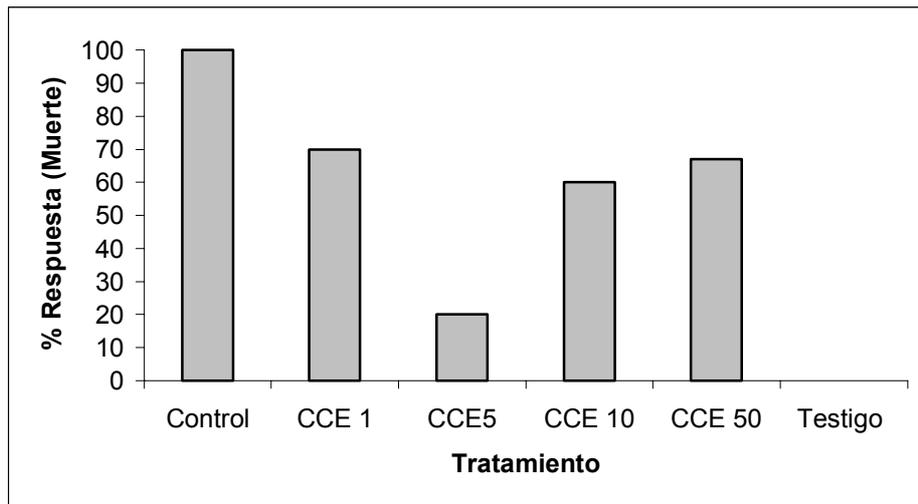


Figura 16. Porcentaje de muerte presentado al administrar el agente convulsivante PTZ a una dosis de 90 mg/kg. Las dosis administradas del extracto etanólico fueron 1, 5, 10 y 50 mg/kg.

6.2.3 Actividad hipnótica

6.2.3.1 Extracto de Acetato de Etilo

Cuando se efectuó la evaluación de los efectos farmacológicos de cada extracto, se observó que los ratones tratados con las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de acetato de etilo perdían el reflejo de enderezamiento. Esto sugiere que dicho extracto posee actividad hipnótica. Como se puede observar en la Figura 17, los ratones tratados con las dosis anteriormente mencionadas, perdieron el reflejo de enderezamiento (latencia de hipnosis) aproximadamente a los 3 minutos de haber administrado el extracto de AcOEt. Los ratones permanecen dormidos por aproximadamente 10 minutos en la dosis de 500 mg/kg y 15 minutos en la dosis de 1000 mg/kg (Figura 18).

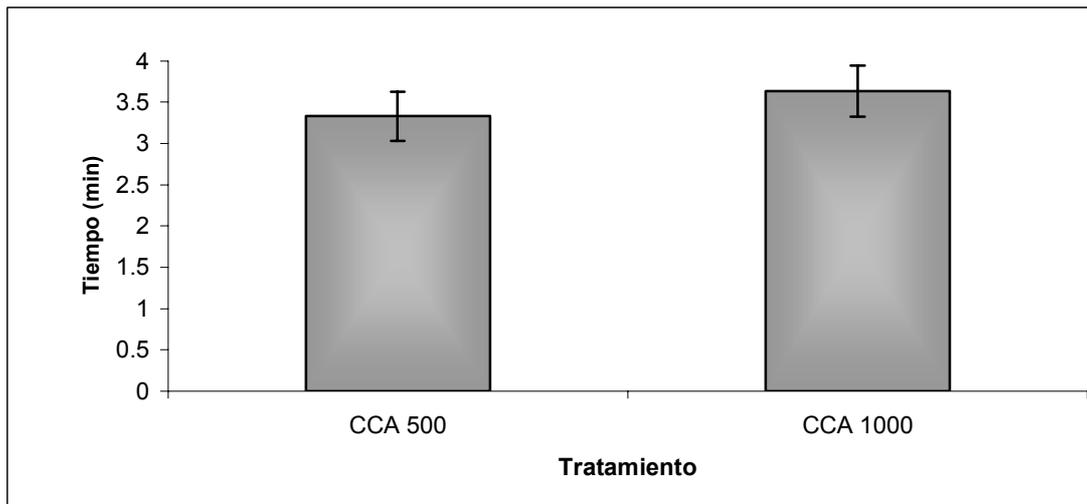


Figura 17. Latencia de hipnosis al administrar las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de acetato de etilo.

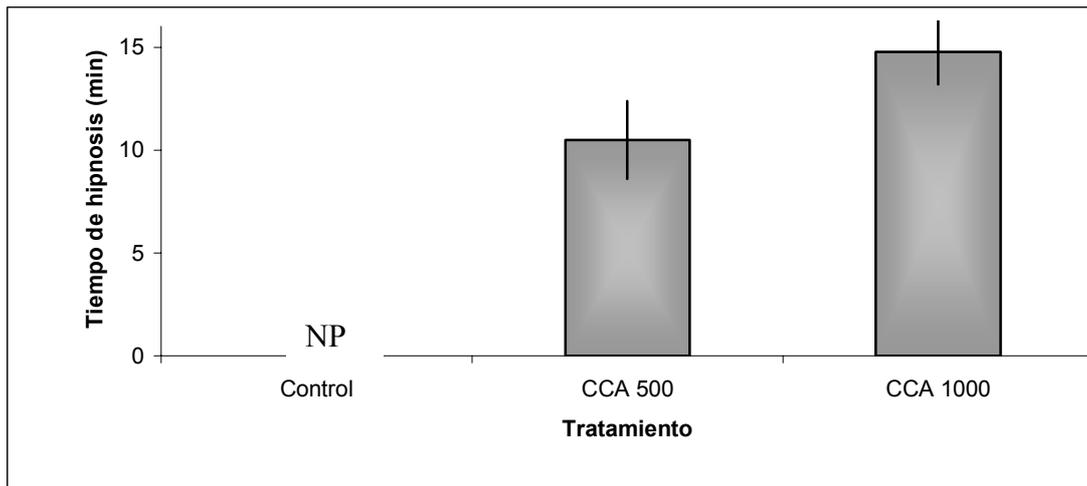


Figura 18. Tiempo de hipnosis mostrado por los animales cuando se administraron las dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto de acetato de etilo; NP: No presentó.

Por último, los resultados demuestran que el extracto de acetato de etilo posee actividad anticonvulsiva e hipnótica que posiblemente se deba a un efecto sedante o depresor del SNC.

Por otro lado, se observó que el extracto etanólico protegió de la muerte cuando se administró a dosis bajas. Sin embargo, para garantizar un efecto anticonvulsivo es necesario discriminar que esta acción se deba a efectos en el metabolismo y biodisponibilidad del agente inductor (PTZ).

6.3 Estudio Químico

Después del estudio farmacológico de los extractos de las hojas de *C. calderoniae*, se realizó el estudio químico de cada uno de ellos con el fin de aislar los componentes mayoritarios, posibles responsables de la actividad farmacológica. Se llevó a cabo la cromatografía en columna de 24.4 g de extracto hexánico. Las fracciones 20-24 (7:3 Hex/AcOEt) se reunieron con base en su perfil cromatográfico (CCF), el cual revelaba la presencia de dos manchas. Posteriormente, dicha mezcla se separó por medio de cromatografía en placa preparativa para dar 60.4 mg de un sólido amarillento de p.f. 95-96°C (sólido 1) y 13.2 mg de un sólido impuro de p.f. 30-33 °C (sólido 2).

El espectro de IR del sólido 1 muestra una banda a 1715.22 cm^{-1} correspondiente a un carbonilo (Figura 19). Asimismo, en el espectro de masas se observa un pico de m/z 270, que corresponde a un compuesto de fórmula $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (Figura 20). En el espectro de RMN ^1H se observó un patrón característico de un núcleo cumarínico (Figura 21). Así, se aprecian dos dobletes ($J = 9.6\text{Hz}$) ubicados a 7.767 y 6.367 ppm que corresponden a los protones vinílicos de la pirona H-4 y H-3, respectivamente. A 7.692 y 6.8165 ppm se aprecian dos dobletes ($J = 2.2\text{ Hz}$) que corresponden a los protones vinílicos α y β de un anillo furano. Además, a 7.361 ppm se observa una señal simple. Tales características concuerdan con un esqueleto de tipo furanocumarínico que presenta sustitución en posición 8. En el mismo espectro también se observa a 5 ppm la presencia de una señal doble ($J = 7.2\text{Hz}$) que integra para dos hidrógenos y que corresponde a un metileno alílico, unido a oxígeno. También se observó la presencia de un triplete ($J = 7.2\text{ Hz}$) a 5.61 ppm, que correspondía a un hidrógeno vinílico. Finalmente, se observaron dos señales dobles ($J = 0.8\text{ Hz}$) a 1.742 y 1.72 ppm que integraban para 6 hidrógenos y que correspondían a dos metilos alílicos. Por lo que se identificó al sólido 1 como imperatorina. Las características físicas y espectroscópicas de este compuesto coincidieron con las informadas previamente en la literatura (Masuda *et al.*, 1998; Razdan *et al.*, 1982; Setzer *et al.*, 2003).

La imperatorina (Figura 22), es una furanocumarina que se aisló previamente de diversas especies pertenecientes a la familia *Rutaceae*; sin embargo, es la

primera vez que se aísla de una especie de *Casimiroa*. Dicho compuesto ha sido estudiado desde el punto de vista farmacológico. Se ha informado en la literatura que posee actividad apoptótica en células de leucemia (Appendino, 2004), así como actividades citotóxicas (Yang *et al.*, 2003), antibacterianas, antifúngicas (Kwon *et al.*, 1997) y fototóxicas (Schimmer *et al.*, 1980). En 2003, Choi y colaboradores demostraron que la imperatorina inhibe la GABA transaminasa, enzima catabólica de GABA. Por lo que es posible que la imperatorina tenga actividades inhibitorias, por medio del incremento de los niveles del neurotransmisor GABA.

Con respecto al sólido 2, la cantidad y pureza no permitieron la identificación de sus componentes.

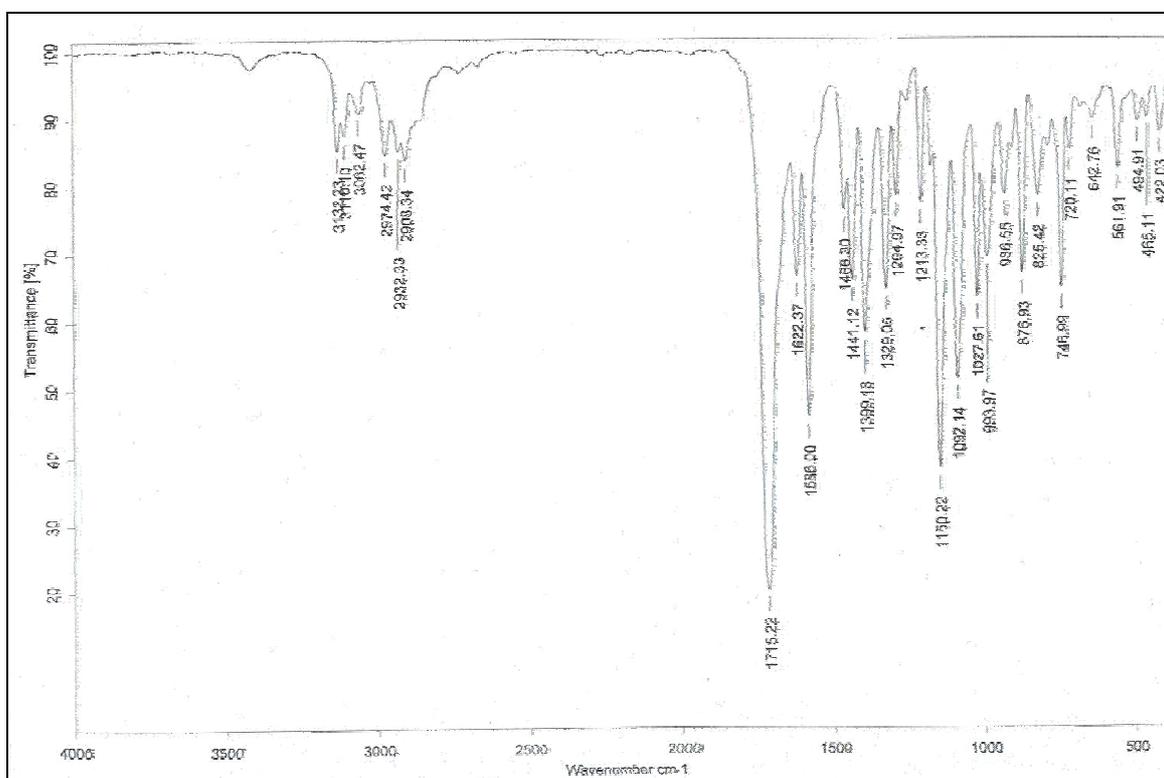


Figura 19. Espectro de IR de la imperatorina (sólido 1).

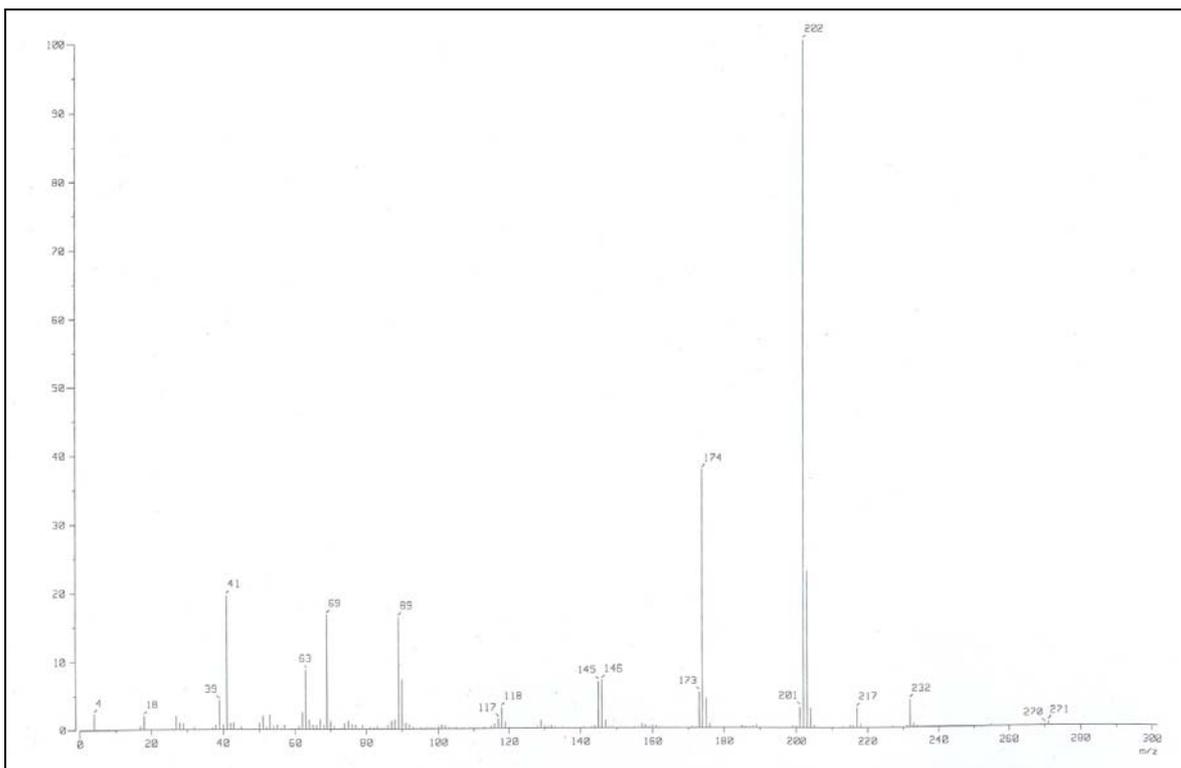


Figura 20. Espectro de masas de la imperatorina (sólido 1).

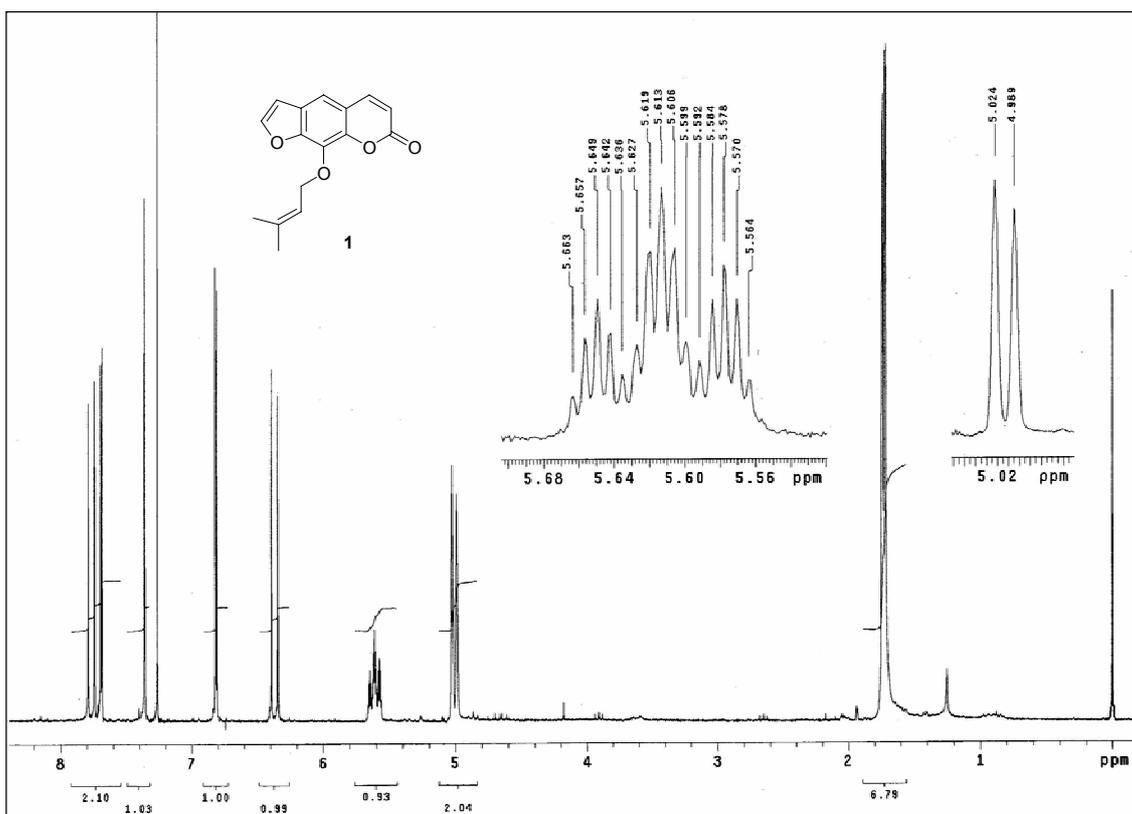


Figura 21. Espectro de RMN¹H de la imperatorina (sólido 1).

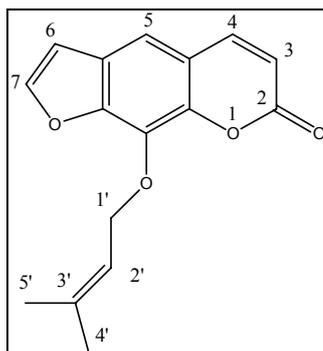


Figura 22. Estructura de la imperatorina (sólido 1).

El análisis cromatográfico del extracto de acetato de etilo, permitió la obtención de imperatorina (44.37mg) de la fracción 43 (9:1, Hex/AcOEt).

Por otro lado, a partir de las fracciones 111-115 (7:3, Hex/AcOEt) se llevó a cabo el aislamiento de 222mg de un sólido blanquecino de p.f. 83-84 °C (sólido 3). Dicho sólido se purificó por medio de recristalizaciones sucesivas. En el espectro de IR (Figura 23) se observa la presencia de una banda ancha a 1729 cm^{-1} . Además, en el espectro de masas se observa un pico de m/z 328 que corresponde a una fórmula de $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$, (Figura 24).

En el espectro de RMN ^1H (Figura 25), se observan señales semejantes a la imperatorina; sin embargo, se observa la presencia de una señal simple a 4.65 ppm que integra para 2 hidrógenos, así como una señal a 2.0 ppm correspondiente a los hidrógenos de un metilo de un grupo acetato. En el Cuadro 11 se muestran los desplazamientos de las señales de RMN ^{13}C . En la Figura 26 se muestra el espectro de RMN ^{13}C . Tales evidencias concordaron con la estructura del acetato de tricoclina (Figura 27). La estructura de este compuesto ya había sido informada en la literatura como un derivado semisintético (Miyakado, 1978), sin embargo esta es la primera vez que se informa su aislamiento como producto natural.

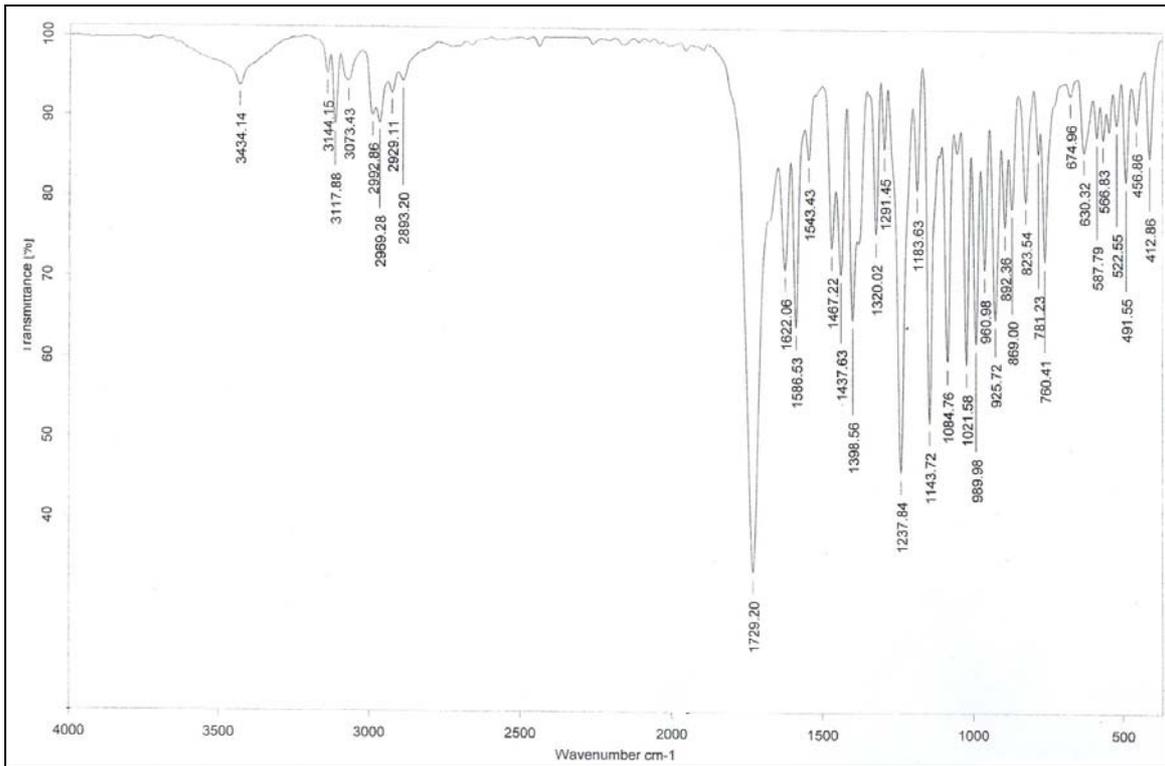


Figura 23. Espectro de IR del acetato de tricoclina (sólido 3).

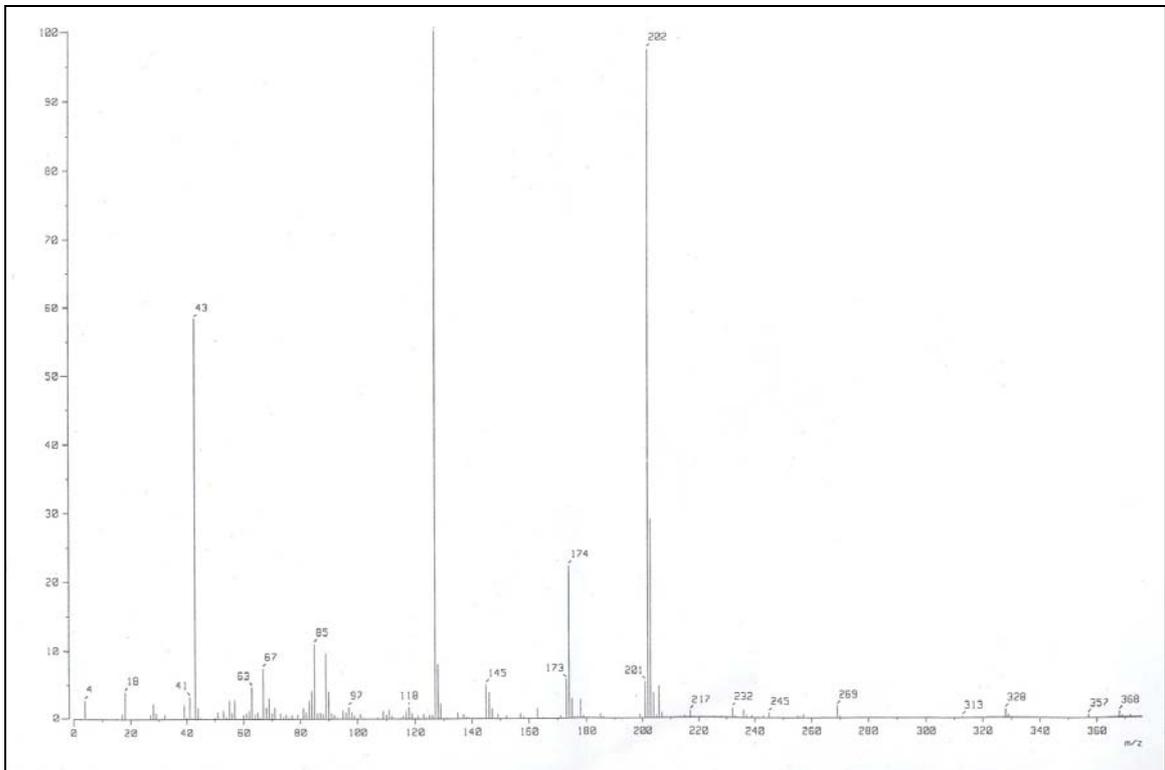


Figura 24. Espectro de masas del acetato de tricoclina (sólido 3).

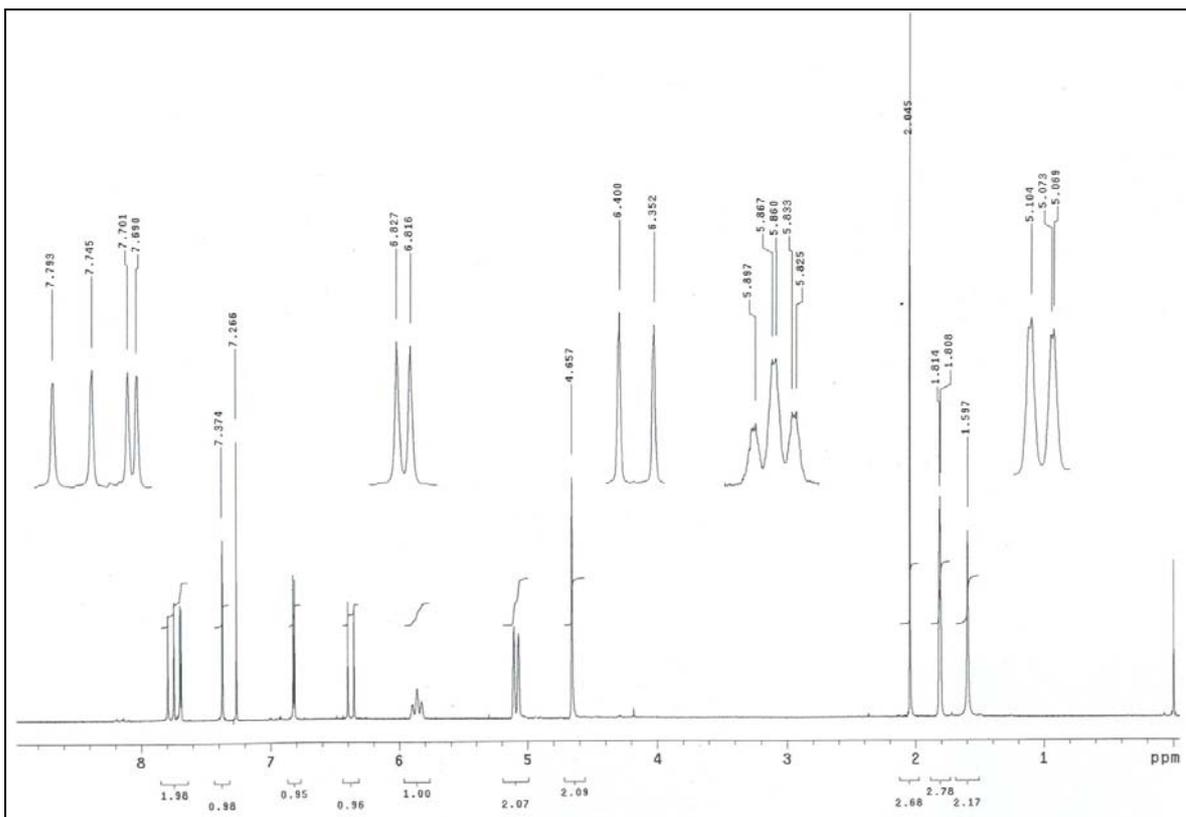


Figura 25. Espectro de RMN ^1H del acetato de tricoclina (sólido 3).

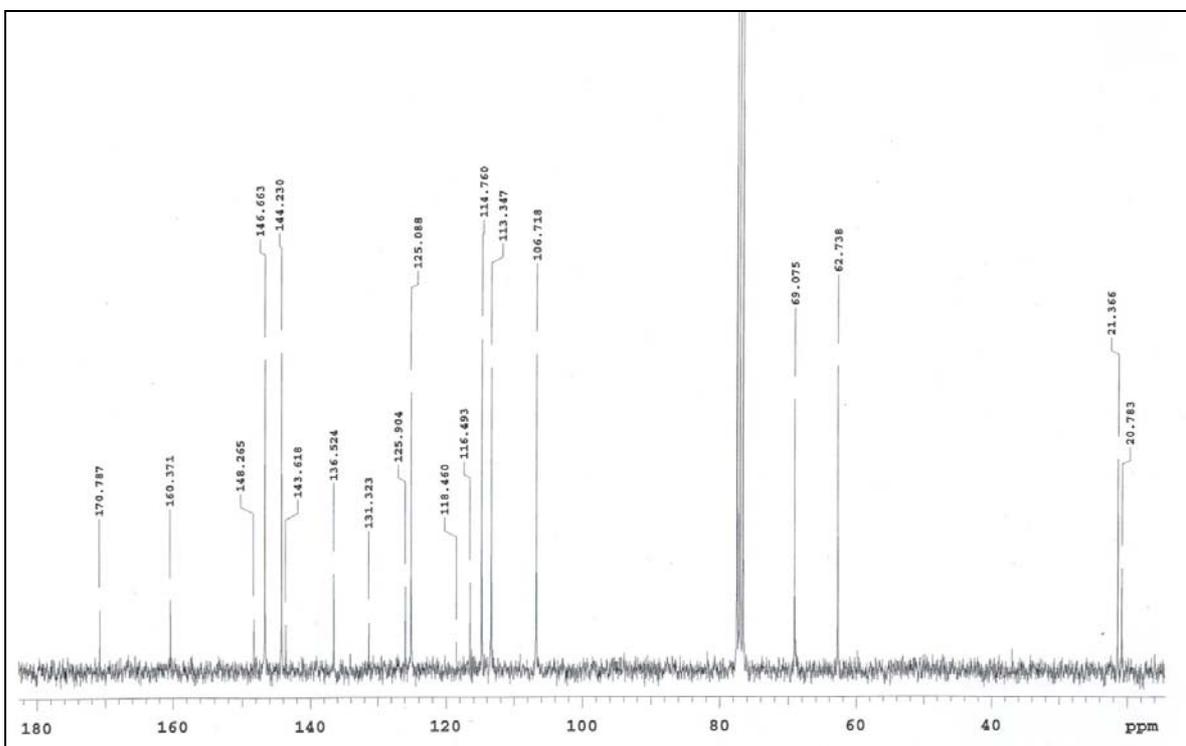


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C del acetato de tricoclina (sólido 3).

Cuadro 11. Desplazamiento (ppm) de las señales de RMN ^1H y RMN ^{13}C del acetato de tricoclina (sólido 3).

Asignación	RMN ^{13}C	RMN ^1H	J (Hz)
2, C=O	160.7	-	-
3	114.7	6.36 (d)	9.6
4	144.2	7.75 (d)	9.6
5	113.3	7.36 (s)	-
6	106.7	6.81 (d)	2.1
7	146.7	7.67 (d)	2.1
1'	69.0	5.08 (dd)	0.8, 6.6
2'	125.0	5.85 (ta)	-
3'	116.5	-	-
4'	21.3	1.88 (s)	-
5'	62.7	4.65 (s)	-
C=O	170.8	-	-
CO- <u>CH</u> ₃	20.8	2.04 (s)	-
C _(qar)	148.3, 143.6 136.5, 131.3 125.9	-	-

qar: carbono cuaternario aromático

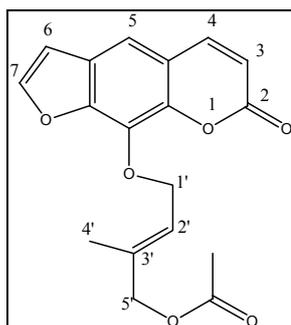


Figura 27. Estructura del acetato de tricoclina (sólido 3).

7. Conclusiones

El extracto de acetato de etilo de hojas de *C. calderoniae* presentó efectos sedantes-hipnóticos a partir de la dosis de 500 mg/kg. Además, dicho extracto presentó efectos anticonvulsivos, a la dosis de 1000 mg/kg, en el modelo de inducción química con pentilentetrazol.

El extracto etanólico de hojas, a dosis bajas, protegió a los animales de experimentación de la muerte inducida por el tratamiento con una dosis letal total de pentilentetrazol. Sin embargo a dosis altas del extracto, dicho efecto se revirtió, lo que implica un efecto dual.

El estudio químico de la especie *C. calderoniae* permitió el aislamiento e identificación de cuatro compuestos, dos furanocumarinas –imperatorina y acetato de tricoclina- y dos flavonas, - la tangeretina y la 5,6,2',3'- tetrametoxiflavona -. Esta última resultó ser una nueva flavona. Asimismo, es la primera vez que se informa la obtención del acetato de tricoclina a partir de una fuente natural, ya que previamente se había informado su estructura como un producto semisintético.

El presente estudio apoya la propuesta de que el estudio químico de especies relacionadas quimiotaxonómicamente puede conducir al aislamiento de compuestos bioactivos.

Los resultados de la presente investigación constituyen un aporte al conocimiento químico y biológico del género *Casimiroa* y evidencian su potencial como fuente de compuestos bioactivos.

8. ANEXO

FLAVONOIDES

Los flavonoides son metabolitos secundarios que ocupan una posición prominente entre los fenoles de las plantas superiores. Son compuestos que poseen dos anillos fenólicos conectados por una unidad de tres carbonos (sistema C₆-C₃-C₆ como estructura base) Los flavonoides provienen de la unión de las rutas del ácido siquímico y del acetato mevalonato. Se originan de unidades de acetato por intermediario fenilpropanoide derivado de la ruta del ácido siquímico. El anillo A esta formado por la condensación cabeza-cola de 3 unidades de acetato y el anillo B formado del precursor fenilpropanoide. Suelen encontrarse sustituidos comúnmente por -OH, -OCH₃, u O-ósido. En la Figura 38 se muestra la estructura general de los flavonoides (Trease *et al.*, 1988)

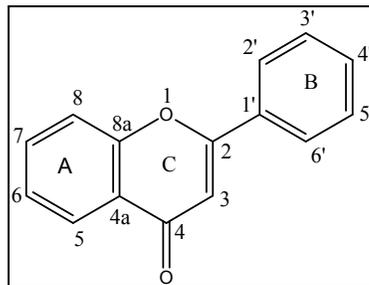


Figura 38. Estructura general de flavonoides.

Entre las acciones biológicas que se han atribuido a los flavonoides están sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, así como citotóxicos en líneas celulares de cáncer humano. Asimismo se han encontrado evidencias de que los flavonoides tienen propiedades protectoras en cultivos neuronales. Asimismo se ha informado que algunos flavonoides actúan como ligandos del receptor GABA y que poseen actividad sedante (Dajas *et al.*, 2005).

En la Figura 39 se muestra la ruta biogénica de los flavonoides.

FLAVONOIDES

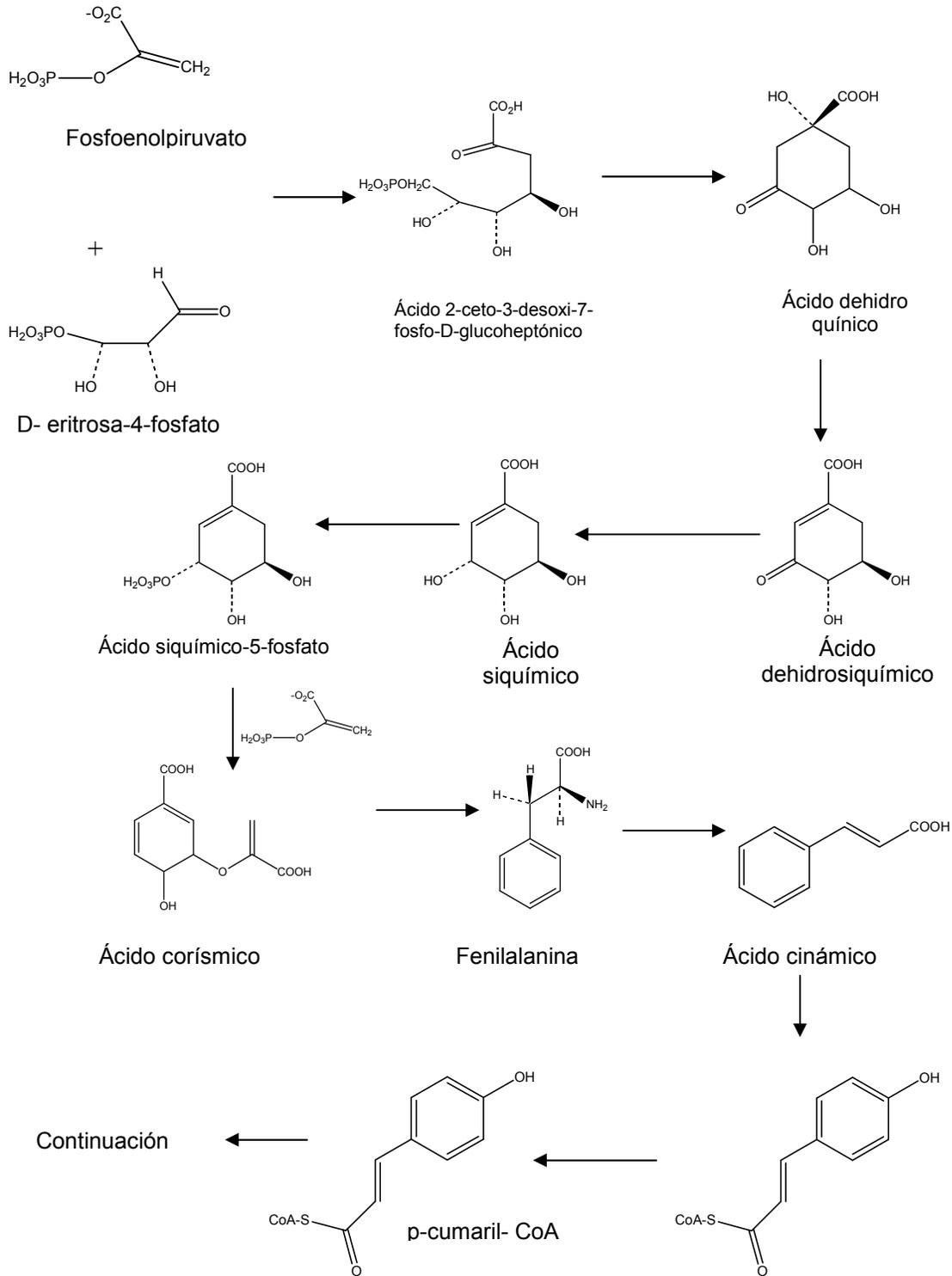


Figura 39. Ruta biogénica de los flavonoides.

Continuación

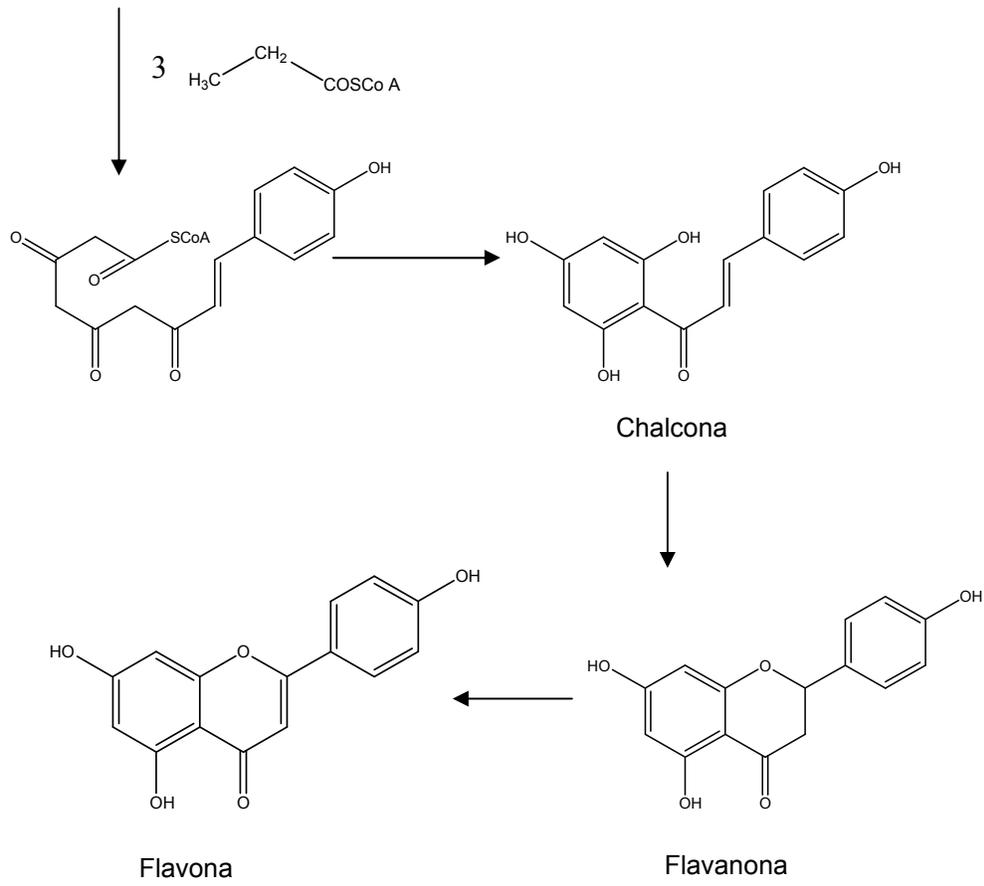


Figura 39. Ruta biogénica de los flavonoides

CUMARINAS

Las cumarinas son metabolitos secundarios que proceden de la ruta del ácido siquímico. Estos metabolitos son derivados de benzo- α -pirona que se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal; sin embargo, existen determinadas familias que poseen gran cantidad de estos compuestos, como son las Rubiáceas, Rutáceas, Asteráceas, Umbelíferas, Apocináceas y Compuestas.

Entre las propiedades farmacológicas que se les atribuyen se encuentran, la reducción de linfedema en el hombre, inhibición de las enzimas tirosin-cinasas, así como actividades antiinflamatorias y fototóxicas (Hoult *et al.*, 1996). En la Figura 40 se muestra la estructura general de las cumarinas y en la Figura 41 se muestra su ruta biogenética.

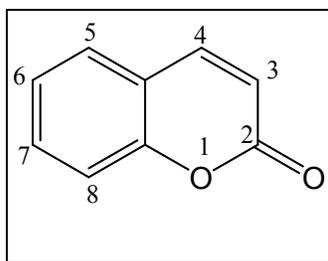


Figura 40. Estructura general de las cumarinas.

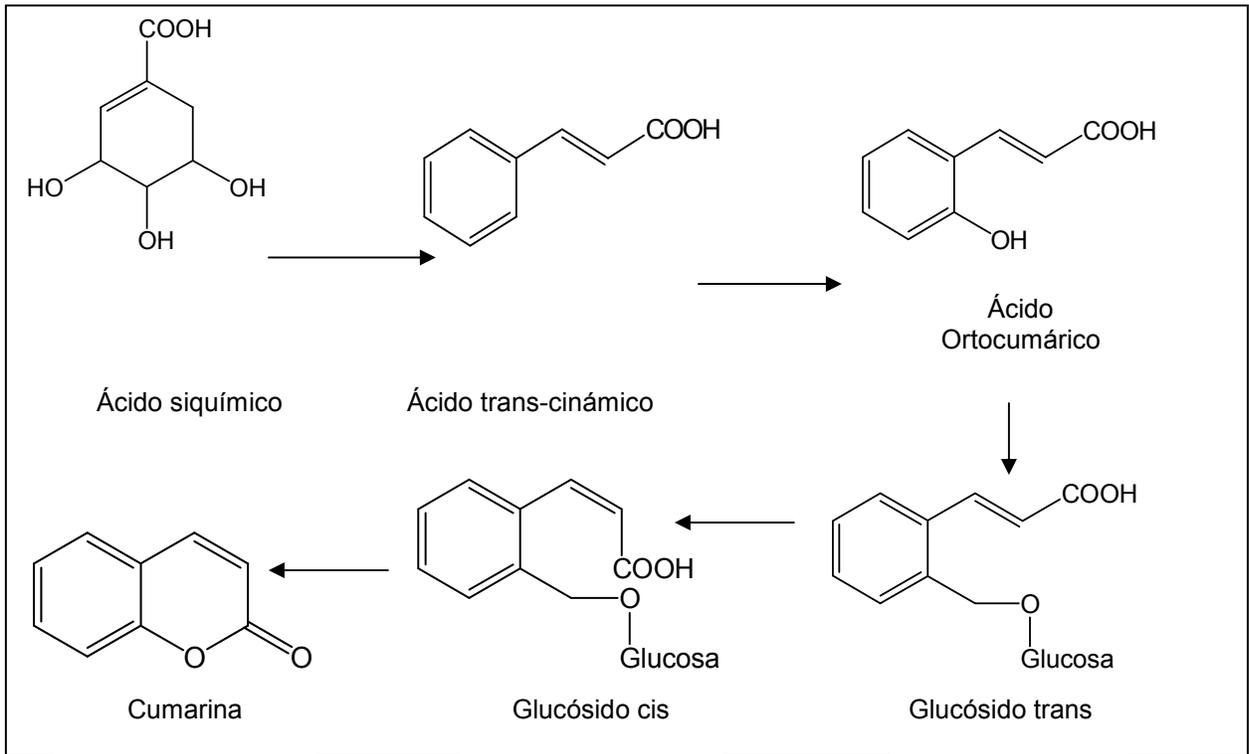


Figura 41. Ruta biogénica de las cumarinas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alvernia, J., 2000. Fisiología [med.javeriana.edu.co/ fisiologia/fw/c523.htm](http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c523.htm)
fisio@hermes.javeriana.edu.co, documento web (revisada 3 de febrero 2006).
- Appendino, G., Bianchi, F., Bader, A., Campagnuolo, C., Fattorusso, E. 2004. Coumarins from *Opopanax chironium*. New dihydrofuranocoumarins and differential induction of apoptosis by imperatorin and heraclenin. *Journal of Natural Products* **67**:4:532-536.
- Avallone, R., Zanolì, P., Puia, G., Kleinschnitz, M. 1999. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochemical Pharmacology* **59**:1387-1394.
- Barnes, J., Anderson, L. A., Phillipson, J. D. 2001. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **53**:583-600.
- Brailowsky, S. 1998. *Las sustancias de los sueños*. Segunda edición. Colección la ciencia para todos. Fondo de cultura económica. DF, México. p. 352.
- Brailowsky, S. 1999. *Epilepsia. Enfermedad sagrada del cerebro*. Primera edición. Colección la ciencia para todos. Fondo de cultura económica. DF, México. p. 148.
- Castellanos, S. 1998. Flavonoides y Cumarinas aisladas de *Casimiroa pringleii*. Tesis. FES. Zaragoza, UNAM, México, p. 90.
- Chiang, F., González-Medrano, F. 1981. Nueva especie de *Casimiroa* (Rutaceae) de la zona árida oaxaqueño-poblana. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **41**:23-26.
- Chiang, F., González-Medrano, F. 1984. Nota sobre la ortografía correcta de *Casimiroa calderonii* Chiang et Medrano. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **46**: 89.
- Choi, S. Y., Ahn E.M., Song, M. C., Kim D. W., Kang, J. H., Kwon, O. S., Kang, T. C., Baek, N. I. 2003. In vitro GABA-transaminase inhibitory compounds from the root of *Angelica dahurica*. *Phytotherapy Research* **19**:10:839-845.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. 1989. *Epilepsia* **30**: 389-399.

- Dajas, F., Arredondo, F., Echeverri, M., Ferreira, A., Morquio, A., Rivera, F. 2005. Flavonoids and the brain: Evidences and putative mechanisms for a protective capacity. *Current Neuropharmacology* **3**:193-205.
- Datla, K. P., Chirstidou, M., Widmer, W., Rooprai, H., Dexter, D. 2001. Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport* **12**:3871-3875.
- Davies, K. M. 2003. Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Functional Plant Biology* **30**:913 – 925.
- Dominguez, X. A., Rodríguez V., Villegas, A. D., Rojas P. 1972. Extractives from *Sargentia greggii*. *Phytochemistry* **2**:2649-2651.
- Dominguez, X. A., Villegas, A. D. 1976. Estructura de la Cerrosillina B (5,6,3',4',5'-pentametoxiflavona) aislada de las hojas del chapote amarillo(*Sargentia greggii*). *Revista Latinoamericana. de Química* **7**:45-46.
- Douglas, J. 2001. Valerian *Valerinana officinalis*. L. *Crop & Food Research* **34**.
- Eadie, J., Bladin P. F., 2001. A disease once sacred. A history of the medical understanding of epilepsy. John Libbey and Co., Oxford University Press., Eastleih, England p. 248.
- Feria-Velasco, A., Orozco-Suárez, S. 2005. La epilepsia: como conocerla para tratarla mejor. *Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias* **56**:14-24.
- García-Argáez, A. N. 2002. Estudio fitoquímico de apoyo taxonómico al género *Casimiroa* (Rutaceae). Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM, México, p. 107.
- García-Argáez, A. N., González-Lugo, N. M., Márquez, C., Martínez-Vázquez, M. 2003. Cumarinas presentes en el género *Casimiroa*. *Revista de la Sociedad Química de México* **47**:151-154.
- García-Argáez, A. N, González-Lugo, N. M., Parra-Delgado, H., Martínez-Vázquez, M. 2004. Pubesamides A, B, and C, three new N-benzoyltyramide derivatives isolated from *Casimiroa pubescens*. *Zeitschrift für Naturforschung* **59**: 245-248.
- García-Argáez, A. N, González-Lugo, N. M., Parra-Delgado, H., Martínez-Vazquéz, M. 2005. Casimiroin, zapoterin, zapotin and 5,6,2',3',4'-pentamethoxyflavone from *Casimiroa pubescens*. *Biochemical Systematics and Ecology* **33**:441-443.

- García-Pedrosa, F. 1999. Epilepsia. Epidemiología de la epilepsia. *Compendio de epilepsia*. SSA. México. Págs. 22-23.
- Garzón de la Mora, P., García-López, P., García-Estrada, J., Navarro-Ruíz, A., Villanueva-Michel, T. 1999. *Casimiroa edulis* seed extracts show anticonvulsive properties in rats. *Journal of Ethnopharmacology* **68**:275-282.
- González Lugo, N. M. 2003. Pubesamides A, B y C, alcaloides, cumarinas y flavonas aisladas de *Casimiroa pubescens* (Rutaceae) Evaluación de su actividad antiinflamatoria y citotóxica. Tesis FES Cuautitlan, UNAM, México, p.142.
- Granillo, R. J. 2002. Epilepsias modelos experimentales de epileptogénesis. *Revista Neurológica Argentina* **27**.
- Heneka, B., Rimpler, H., Ankli A., Sticher, O., Gibbons, S, Heinrich, M. 2005. A furanocoumarin and polymethoxylated flavonoids from the Yucatec Mayan plant *Casimiroa tetrameria*. *Phytochemistry* **66**: 6:649-652.
- Hobbs, W. R., Rall, T. W., Verdoorn, T. A. Hipnoticos y sedantes; etanol *En* Hardman J.G., Limbird L. E., Molinoff P. B., Ruddon R. W., Goodman Gilman A. traducción Blengio P. J. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica Novena edición. Mc Graw-Hill. Vol I México pp. 389-391.
- Hoult, J. R., Payá, M. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural productos with therapeutic potential. *General Pharmacology* **27**: 713-722.
- INEGI /SSA. Dirección general de información y evaluación del desempeño. CONAPO., 2002. Proyecciones de la población de México., 2000-2050. "www.inegi.gob.mx" documento PDF. (revisada 6 de octubre 2005).
- Iriarte, J., Kincl F., Rosenkranz, G., Sondheimer, F. 1956. The constituents of *Casimiroa edulis* Llave et Lex. Part II. The bark. *Journal of Chemical Society* **44**: 4170-4173.
- [Janos, P.](http://www.pr.mq.edu.au) "www.pr.mq.edu.au" documento web. www.pr.mq.edu.au/macnews/sept01/apaf.htm (revisada 12 de diciembre 2005).
- Kincl, A., Romo, J., Rosenkranz, G., Sondheimer, F. 1956. The constituents of *Casimiroa edulis* Llave et Lex. Part I. The seed. *Journal of Chemical Society* **26**:4163-9.
- Kwon, Y., Kobayashi, A., Kajiyama, S., Kawazu, K., Kanzaki, H., Kim, C. 1997. Antimicrobial constituents of *angelica dahurica* roots. *Phytochemistry* **44**:887-889.

- López- Rubalcava, C., Piña-Medina, B., Estrada-Reyes, R., Heinze, G., Martínez-Vazquez, M. 2006. Anxiolytic-like actions of the hexano extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sciences* **78**:730-737.
- Lozoya, X., Romero, G., Olmedo, M., Bondani, A. 1977. Farmacodinamia de los extractos alcohólico y acuoso de la semilla de *Casimiroa edulis*. *Archivos de Investigación Médica* **8**:145-154.
- Magos, G. A., Vidrio, H. 1991. Pharmacology of *Casimiroa edulis*; Part I. Blood pressure and heart rate effects in the anesthetized rat. *Planta Medica* **57**:20-24.
- Magos, G. A., Vidrio, H. 1991b. Pharmacology of *Casimiroa edulis*; II. Cardiovascular effects in the anesthetized dog. *Planta Medica* **57**:217-220.
- Magos, G. A., Vidrio, H., Enríquez, R. 1995. Pharmacology of *Casimiroa edulis*; III. Relaxant and contractile effects in rat aortic rings. [*Journal of Ethnopharmacology*](#) **47**:1-8.
- Magos, G. A., Vidrio, H., Enríquez, R., Reynolds, W. 1999. Pharmacology of *Casimiroa edulis* IV. Hypotensive effects of compounds isolated from methanolic extracts in rats and guinea pigs. [*Journal of Ethnopharmacology*](#) **64**:35-44.
- Martínez, M. 1951. Las Casimiroas de México y Centroamérica. *Anales del Instituto de Biología* **22**:25-181.
- Martínez-Conesa, C., Ortega, V., Yáñez, J., Alacaraz, M., Canteras, M., Benavante, Castillo, J. 2005. Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin and diosmin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:6791-6797.
- Masuda, T., Takasugi, M., Anetai, M. 1998. Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*. *Phytochemistry* **47**:13-16.
- Mata, E. R., Rivero, C. J. 2000. Curso teórico de farmacognosia. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Mayo. México D. F. p140.
- Mc Namara, J. O. Fármacos eficaces para el tratamiento de las epilepsias. *En* Hardman, J.G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., Goodman Gilman, A. traducción Blengio P. J. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica Novena edición. Mc Graw-Hill. Vol I México pp 491-517.

- Medina M., 1998. "Conceptos básicos sobre las epilepsias" marco@gbm.hn
<http://neurologia.rediris.es/congreso-1/conferencias/epilepsia.html> documento web
(revisada el 1 de octubre 2005).
- Miyakado, M. 1978. Trichoclin, a new furocoumarin from *Trichocline incana*.
Phytochemistry **17**:143-144.
- Molina-Hernandez, M., Tellez-Alcántara, N. P., Pérez, J., Olivera, J. I., Jaramillo, M. T.
2004. Anxiolytic-like actions of leaves of *Casimiroa edulis* (Rutaceae) in male
Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* **93**:93-98.
- Muccillo, A. L., Urban, H., Navarro, A. 2004. Endothelium-dependent vasorelaxing,
activity of aqueous extracts of lyophilized seeds of *Casimiroa edulis* (AECe) on rat
mesenteric arterial bed. *Journal of Ethnopharmacology* **95**:163-167.
- Navarro, R. A., Bastidas, B. E., García, E. J., García, L. P., Garzón, P. 1995.
Anticonvulsant activity of *Casimiroa edulis* in comparison to Phenytoin and
Phenobarbital. *Journal of Ethnopharmacology* **45**:199-206.
- Núñez, O. L., "www.epilepsiahoy.com/" documento web
"www.epilepsiahoy.com/medicos.html#farma"
(revisada el 29 septiembre 2005).
- Pan, M. H., Chen, W. J., Ho, C. T., Lin, J. K. 2002. Tangeretin induces cell-cycle G₁ arrest
through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating
Cdk inhibitors p21 and p 27 in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis*
23:1677-1683.
- Pellegrino, F. C. 2000. Evidencias anatómicas del área de cobertura de electrodos
especiales temporales en electroencefalografía canina. *Revista Chilena de
Anatomía* **18**:287-295.
- Power, F., Callan, T. 1912. The constituents of seeds of *Casimiroa edulis*. *Journal of
Chemical Society* **25**:1993-2010.
- Quiñónez, G. 1999. Epilepsia. Mecanismos básicos de la epileptogénesis. *Compendio de
Epilepsia*. SSA. México. Págs. 28-29.
- Ramírez, E., Rivero, M. 1936. The pharmacodynamic action of the White Zapote
(*Casimiroa edulis*). *Revista Mensual Médica* **9**:3.

- Razdan, T. K., Kachroo, V., Harkar, S., Koul G. L. 1982. Furanocoumarins from *Heracleum canescens*. *Phytochemistry* **21**:923-927.
- Rocha, L. 2005. La enfermedad que alguna vez fue sagrada. *Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias* **56**:6-13.
- Rodríguez, I. 1999. Definición. *Compendio de epilepsia*. Programa prioritario de epilepsia. SSA. México. págs. 10-12.
- Romero, M., Escobar, L., Lozoya, X., Enríquez, R. 1983. High-Performance Liquid Chromatography study of *Casimiroa edulis*. I. Determinación of imidazole derivatives and rutin in aqueous and organic extracts. *Journal of Chromatography* **16**:245-251.
- Schimmer, O., Beck, R., Dietz, U. 1980. Phototoxicity and photomutagenicity of furocoumarins and furocoumarin drugs in *Chlamydomonas reinhardtii*. Comparison of biological activities as a basis of risk evaluation. *Planta Medica* **40**:68-76.
- Setzer, W., Vogler, B., Bates, R., Schmidt, J., Dicus, C. 2003. HPLC-NMR/HPLC-MS Analysis of the bark extract of *Stauranthus perforatus*. *Phytochemical analysis* **14**: 54-59.
- Sierpina, V., Wollschlaeger, B., Blumenthal, M., 2003. *Ginkgo biloba* Complementary and alternative medicine. *American Family Physician* **68**:923-926.
- Sondheimer, F., Meisels, A. 1960. Constituents of *Casimiroa edulis* Llave et Lex VI. 2', 5,6 trimethoxyflavone, 2',5,6,7 tetramethoxyflavone (zapotin) and 2',6,7 trimethoxyflavone (zapotinin). *Tetrahedron* **9**:139-144.
- Trease, G. E., William C. E., 1988. Tratado de farmacognosia. 12a edición. Editorial interamericana. España. págs. 295, 298.
- Van Slambrouck, S., Parmar, V. S., Sharma, S. K., De Bondt, B., Foré, F., Coopman, P., Vanhoecke, B. W., Boterberg, T., Depypere, H. T., Leclercq, G. Bracke, M.E. 2005. Tangeretin inhibits extracellular-signal-regulated-kinase (ERK) phosphorylation. *FEBS Letters* **579**: 1665-1669.
- Varona, J., Escribano, E., Martín-Calderón JL. 2001 Fenobarbital: farmacocinética, toxicología y monitorización por el Laboratorio. *Revista de Diagnostico Biológico* **50**:13-16 [citado 03 Febrero 2006].

- Weber, B., Hartmann, B., Stöckigt, D., Schreiber, K., Roloff, M., Bertram, H., Schmidt, C. 2006. Liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/nuclear magnetic resonance as complementary analytical techniques for unambiguous identification of polymethoxylated flavones in residues from molecular distillation of orange peel oils (*Citrus sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:274-278.
- Yang, L., Wang M., Chen L., Wang, C. 2003. Cytotoxic Activity of Coumarins from the Fruits of *Cnidium monnieri* on Leukemia Cell Lines. *Planta Medica* **69**:1091-1095.