



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

FITOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTI-INFLAMATORIA
DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS AISLADOS DE SEMILLAS DE
Casimiroa greggii (Watson) Chiang.

T E S I S :

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B Í O L O G A

PRESENTA:

ANGÉLICA SÁNCHEZ RUIZ

DIRECTORA: HORTENSIA ROSAS ACEVEDO

MÉXICO, D. F.

ENERO 2009.



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.

INDICE

I. ABREVIATURAS	1
II. RESUMEN.....	3
III. INTRODUCCIÓN	4
IV. ANTECEDENTES	6
4.1 Medicina tradicional	6
4.2 Principios activos de las plantas medicinales	8
4.3 Metabolitos secundarios	9
4.4 Tipos de MS comúnmente producidos por el género <i>Casimiroa</i>	10
4.4.1 Alcaloides	10
4.4.2 Flavonoides	11
4.4.3 Cumarinas	12
4.5 Factores que afectan la producción de MS en las plantas	12
4.6 Género <i>Casimiroa</i>	14
4.7 Descripción botánica del género	14
4.8 Antecedentes químicos del género <i>Casimiroa</i>	15
4.9 Antecedentes farmacológicos del género	19
4.10 <i>Casimiroa greggii</i>	21
4.10.1. Ubicación taxonómica de <i>Casimiroa greggii</i>	21
4.10.2 Descripción botánica de <i>Casimiroa greggii</i>	21
4.10.3. Antecedentes químicos de <i>Casimiroa greggii</i>	22
4.10.4 Antecedentes farmacológicos <i>Casimiroa greggii</i>	23
4.11 Cáncer	24

4.12 Fármacos utilizados para el tratamiento de cáncer	26
4.13 Inflamación	30
4.14 Tipos de inflamación	31
4.14.1 inflamación aguda	31
4.14.2 Inflamación crónica	31
4.15 Relación cáncer – inflamación	32
V. JUSTIFICACIÓN	34
VI. HIPÓTESIS	35
VII. OBJETIVO GENERAL	36
VIII. OBJETIVOS PARTICULARES	36
IX. MATERIAL Y METODO	37
9.1 Trabajo de campo	37
9.2 Estudio fitoquímico	37
9.3 Evaluación de la actividad citotóxica	38
9.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria	40
X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
XI. CONCLUSIONES	55
XII. PERSPECTIVAS	56
XIII. ANEXO	57
13.1 Espectros	57
13.2 Propiedades físicas y espectroscópicas de los compuestos puros	67
13.3 Rayos X	71
XIV. LITERATURA CITADA	73

II. RESUMEN

Desde la antigüedad la medicina tradicional ha sido una practica ancestral, donde el uso de la plantas medicinales juega un papel muy importante para mantener la salud (Viseca, 1978) un considerable sector de la población de pende únicamente del uso de la plantas medicinales según la OMS (Lara y Márquez, 1996). El uso de estas plantas se concentra principalmente en aquellos sectores de la población donde existen carencias de atención medica o servicios hospitalarios (Hersch-Martínez, 1995)

Los productos naturales de origen vegetal han sido objeto de estudio durante muchos años así como los efectos fisiológicos que producen (Lara y Márquez, 1996). Este conocimiento ha sido la base para el análisis e investigación de nuevas alternativas en la producción de posibles fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer, es importante mencionar que es una de las principales causas de muerte en México (INEGI, 2006).

Con base en lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica de los extractos y compuestos aislados a partir de semillas de *Casimiroa greggii* recolectadas en las cercanías del Cerro de la Silla en Monterrey, Nuevo León, México.

El presente trabajo abarca el estudio fitoquímico de la especie, que consistió en la obtención de tres extractos de diferente polaridad, a partir de los cuales se obtuvieron los metabolitos secundarios, y el estudio de la actividad biológica donde por medio de ensayos como SRB y TPA se evaluó su actividad citotóxica y antiinflamatoria respectivamente. Los resultados indicaron que los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol poseen actividad citotóxica y únicamente los extractos de hexano y acetato de etilo se les puede atribuir actividad antiinflamatoria.

Se evaluó la citotoxicidad de cuatro de los ocho compuestos aislados, resultando los de mayor actividad la 5,6,2' trimetoxiflavona y casimiroina.

III. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud, más del 80% de la población mundial depende, principalmente, del uso de las llamadas plantas medicinales silvestres para la procuración de salud. Como es de esperarse, la mayoría de esta población se concentra en los países menos industrializados y que, coincidentemente, poseen una importante riqueza florística y cultural (Lara y Márquez, 1996). En México el uso de las plantas medicinales constituye una práctica ancestral y a menudo también, es parte de un sistema más amplio de creencias y es considerada como parte integral de la vida diaria y del bienestar. Los factores que han contribuido a que la población continúe con el uso de plantas medicinales, son principalmente, la carencia de servicios tales como: hospitales, atención médica, así como el incremento en costo de las medicinas (Hersch-Martínez, 1995).

México cuenta con una gran diversidad florística, se estima que aproximadamente el 15% de la flora total posee algún atributo medicinal (4 000 especies), lo que implica que una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa (Ocegueda *et al.*, 2005).

El valor de las plantas medicinales está dado por sus constituyentes químicos, los cuales generalmente son MS que producen efectos fisiológicos. Los alcaloides, terpenoides, glicósidos, flavonoides y lignanos son algunas de las categorías mayores de compuestos con actividad farmacológica demostrada (Balandrin *et al.*, 1985). Los estudios químicos de las plantas medicinales, permiten el aislamiento y caracterización química de los metabolitos que sintetizan las diferentes plantas medicinales, lo que posteriormente conducirá a la producción de nuevos fármacos (Kuklinski, 2000).

Algunas especies del género *Casimiroa* son muy importantes en la medicina tradicional mexicana, es el caso de *Casimiroa edulis*, especie que se conoce comúnmente como zapote blanco y a la cual se le han atribuido propiedades sedantes, hipnóticas, anticonvulcionantes y antiinflamatorias (Argueta *et al.*, 1994). Otra especie que se utiliza de manera similar a *Casimiroa edulis* es *Casimiroa pubescens*, conocida con el nombre común de zapote de rata y de la cual se han aislado compuestos (pubesamidas)

[Escribir texto]

que poseen actividad citotóxica (González-Lugo *et al.*, 2003). En el caso de *Casimiroa greggii*, se ha encontrado la presencia de alcaloides, limonoides y flavonas en raíces y partes aéreas (Domínguez., *et al* 1972, Domínguez., *et al* 1976, Meyer., *et al* 1985) y en raíces se ha demostrado que posee actividad citotóxica en células 9KB de leucemia humana (Meyer., *et al* 1985).

Por otra parte, es bien conocido que el cáncer es la segunda causa de muerte en México, con aproximadamente 12.7% del total de fallecimientos (INEGI, 2006), razón por la cual se hace importante la búsqueda de nuevas moléculas biológicamente activas que en un futuro permitan el diseño de fármacos para el tratamiento de dicho padecimiento.

IV. ANTECEDENTES

4.1 MEDICINA TRADICIONAL

Desde la antigüedad, la MT ha sido una práctica mágico-religiosa en donde el aprovechamiento de las plantas como recurso para la salud, juega un papel muy importante, según consta en diversos testimonios históricos pertenecientes a distintas civilizaciones y culturas (Viesca, 1978).

El hombre primitivo de Mesoamérica resolvió de manera empírica y con su fe religiosa, los problemas de salud y las enfermedades que padeció. Fue así que al asociar algunas hierbas en el ritual mágico religioso nació la farmacia, no en el sentido estricto y científico, sino como una forma de curación y purificación, con el afán de alcanzar la salud y el bienestar (De la fuente, 1997).

En México, una gran parte del conocimiento del uso de las plantas medicinales en la antigüedad y la información que pudo haber existido acerca de esto, fue destruida durante la conquista, por tal motivo es difícil entender el adelanto farmacéutico de los mexicas, ahora solo existen intentos por enlazar de manera racional el origen y desarrollo de las culturas Mesoamericanas.

Con la conquista de la gran Tenochtitlán, consumada en 1521, se introdujo el llamado legado cultural del viejo mundo y con ello la farmacia mexicana también fue sustituida por los conocimientos traídos de Europa, aunque así como otras artes y oficios náhuas, la medicina se practicó de manera latente y fragmentada por los indígenas.

Gracias a algunos documentos y códices conservados y a la labor de investigación de Bernardino de Sahagún y Francisco Hernández, fue posible salvar parte del vasto conocimiento mexicano sobre la medicina y la farmacia. La transmisión de las experiencias sobre farmacia se realizó por la conversión al cristianismo de los indígenas, tal es el caso del mexicano Martín de la Cruz, autor del primer libro de farmacología y herbolario del

continente americano, titulado *Libellus de medicinalibus indorum herbis*. En 1552 fue traducido al latín por otro indígena, Juan Badiano, este ejemplar posee ilustraciones coloridas y una relación con las características medicinales de las plantas del Valle de México y es llamado el Códice de la Cruz y Badiano.

La farmacia practicada por los españoles, eran técnicas heredadas de la cultura grecorromana y llegó hasta ellos con el refinamiento árabe. Por el contrario, la farmacia indígena, siempre se conservó dirigida con un sentido social útil. La farmacia europea asimiló conceptos e ideas mexicas, convirtiéndose en un híbrido, enriquecido con la aceptación de varios productos terapéuticos de origen mexicano y del resto de América. (Islas y Sánchez, 1992; De la fuente, 1997).

La MT relaciona prácticas de salud, aproximaciones, conocimientos y creencias, que incorporan medicinas de origen vegetal, animal o mineral. También contempla terapias espirituales, técnicas manuales, y ejercicios que aplicados de manera individual o en combinación se utilizan para; diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades o mantener la salud.

Países como África, Asia y Latinoamérica usan la medicina tradicional para satisfacer algunas de sus principales necesidades de atención médica. En África más del 80% de la población utiliza la MT como el principal recurso y a veces el único, para la procuración de la salud.

La MT ha mantenido su popularidad en todas las regiones del mundo y su uso se está extendiendo rápidamente en los países industrializados.

En China, los preparados a base de plantas medicinales representan entre el 30% y 50% del total de consumo de medicamentos. En Europa, América del Norte y otras regiones industrializadas, más del 50% de la población han utilizado complementos o medicina alternativa al menos una vez. En Alemania, el 90% de la población ha utilizado un recurso

natural en algún momento de su vida. En los Estados Unidos, 158 millones de la población adulta ha usado medicamentos complementarios.

En la actualidad el uso y popularidad de la Medicina alternativa se ha visto incrementada, en Estados Unidos 17 mil millones de dólares se gastaron en remedios tradicionales en el año 2000. En el Reino Unido, los gastos anuales en la medicina alternativa es de 230 millones de dólares. El mercado mundial de medicinas herbolarias es actualmente de más de 60 mil millones de dólares anuales y está creciendo constantemente.

La MT y en particular las plantas medicinales han jugado un papel preponderante para la prevención de enfermedades y el mantenimiento de la salud así como para el desarrollo de fármacos, ya que el 25% de los medicamentos modernos están hechos a partir de plantas (WHO, 2008).

Ahora bien, se puede señalar que se esta incrementando el uso de las plantas medicinales y que ha crecido el interés por las mismas. Sin embargo, no es que se comience a usar de nuevo, pues en muchos lugares, principalmente en países poco industrializados, nunca se han dejado de utilizar, mientras en otros se ha suspendido su uso por la influencia de la medicina institucional. También es utilizada cuando la medicina alópata no muestra los resultados esperados, o bien para controlar o contrarrestar los efectos secundarios.

4.2 PRINCIPIOS ACTIVOS DE LAS PLANTAS MEDICINALES

El estudio de sustancias de origen natural que poseen una virtud medicinal se conoce como farmacognosia, y el efecto que ocasionan esas sustancias en el organismo se estudia en farmacología. Por su parte, la fitoquímica permite detectar y posteriormente identificar los principios activos responsables de las propiedades atribuidas a las plantas (González *et al.*, 2000).

La farmacognosia está estrechamente relacionada tanto con la botánica como con la química vegetal y su historia permite considerarla como precursora de ambas. Un gran número de plantas son analizadas constantemente en relación a su posible valor farmacológico, particularmente por sus propiedades antiinflamatorias, hipotensoras, hipoglucémicas, amebicidas, anti-fertilidad, citotóxicas, antibióticas y antiparkinsonianas, entre muchas otras (Trease y Charles, 1991).

4.3 METABOLITOS SECUNDARIOS

Los MS se originan a través de las mismas vías o similares de biosíntesis que los metabolitos primarios, sin embargo los MS son compuestos con características particulares y específicas (Anaya, 2003).

Los MS se caracterizan por:

1. Gran heterogeneidad de su estructura química
2. Su distribución restringida
3. Su formación por medio de enzimas codificadas por material genético especial
4. El control estricto de su biosíntesis, por medio de la regulación de la cantidad y actividad de enzimas involucradas
5. La compartimentación de enzimas, precursores, intermediarios y productos involucrados en su biosíntesis, almacenamiento y desintegración
6. La expresión del metabolismo secundario como un aspecto de especialización celular
7. La importancia relativa para la célula sintetizadora como tal, y la mayor importancia para el organismo como un todo
8. La falta de continuidad filogenética en varios de ellos.

Dentro de los compuestos procedentes del metabolismo secundario se encuentran: isoprenoides (terpenos, aceites esenciales, saponinas), derivados fenólicos (fenoles, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, antocianinas, taninos, etc) y alcaloides. La mayoría de los principios activos que se obtienen de las plantas medicinales, proceden del metabolismo secundario (Kuklinski, 2000).

4.4 TIPOS DE MS COMÚNMENTE PRODUCIDOS POR EL GÉNERO CASIMIROA

Diversos estudios han demostrado la presencia de ciertos tipos de MS, que son característicos del género como: cumarinas, alcaloides, flavonoides y limonoides (Meyer *et al.*, 1985; Rizvi *et al.*, 1985).

4.4.1 ALCALOIDES

Los alcaloides son muy difíciles de definir debido a que no son un grupo homogéneo de compuestos, sea desde el punto de vista químico, bioquímico, ecológico o fisiológico. Por lo tanto, toda definición general, debe formularse con reservas. Lo único en que se puede coincidir es que son compuestos heterocíclicos que contiene nitrógeno básico; muchos de ellos son insolubles o poco solubles en agua, y reaccionan con ácidos para formar sales.

A menudo la extracción de cortezas, raíces, hojas, frutos y bayas de plantas produce bases que contienen nitrógeno llamadas alcaloides. El nombre alcaloide proviene del hecho de que estas sustancias son similares a los “alcalis”.

Los alcaloides son producidos por microorganismos, plantas y animales. Actualmente se conocen más de 8 000 compuestos representativos de este grupo de MS (Anaya, 2003).

Al ser administrados a los animales la mayoría de los alcaloides producen efectos fisiológicos sorprendentes y estos varían considerablemente de un alcaloide a otro. Algunos estimulan al sistema nervioso central, otros causan parálisis; otros más elevan la presión

sanguínea, otros la disminuyen. Ciertos alcaloides actúan como analgésicos, la mayoría son tóxicos si se administran a dosis muy altas, en algunos esta dosis es muy pequeña, y a pesar de ello son muy utilizados en la medicina (Solomons, 1982).

4.4.2 FLAVONOIDES

Se encuentran distribuidos en prácticamente todas las plantas superiores, principalmente en partes aéreas como hojas, flores y frutos, dentro de las familias que producen mayor cantidad de flavonoides se encuentran las Polygonáceas, Compuestas, Umbelíferas y Rutaceae.

Las estructuras de los flavonoides, se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos unidos entre si y todos los flavonoides poseen un carbonilo en la posición 4, son estructuras hidroxiladas (OH) en el anillo aromático, y por lo tanto, son polifenólicas.

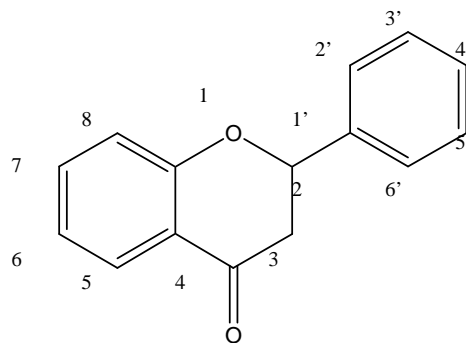


Figura 1. esqueleto básico de las flavonas

Los flavonoides se clasifican en base a sus variaciones estructurales en: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanololes, chalconas e isoflavonoides.

Su actividad terapéutica es muy variada, son utilizados como antihemorrágicos, antiarrítmicos, diuréticos y antiurémicos, antiinflamatorios, antihepatotóxicos, por citar algunos ejemplos (Kuklinski, 2000).

4.4.3 CUMARINAS

Son MS que proceden de la ruta del ácido shikímico, se distribuyen ampliamente en el reino vegetal sin embargo, determinadas familias poseen mayor cantidad de cumarinas como son las Leguminosas (Fabáceas), Rubiáceas, Rutáceas, Asteráceas, Umbelíferas, Apocináceas y compuestas. Las cumarinas se pueden encontrar en ciertos hongos como los del género *Aspergillus* que destacan por ser muy tóxicos.

Las cumarinas se clasifican en:

- 1) cumarinas sencillas
- 2) cumarinas c-preniladas
- 3) furanocumarinas
- 4) piranocumarinas
- 5) dicumarinas

Estos MS poseen estructuras muy variadas y por lo tanto, poseen una gran variabilidad de sus acciones farmacológicas entre las que encontramos, acción vitamínica P, tónicos venosos, fotosensibilizadoras, antiinflamatorios, antiespasmódicos, vaso dilatadores coronarios, ligero efecto hipnótico, sedante y anticoagulantes (Kuklinski, 2000).

4.5 FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE MS EN LAS PLANTAS

Existe una gran variedad de factores físicos, químicos y biológicos, externos e internos, que pueden afectar la producción de especies vegetales y por consiguiente la producción de MS tanto en su calidad como en cantidad. Entre los factores mas importantes encontramos:

- ☞ Radiación
 - Intensidad de la luz
 - Fotoperiodo

- ∅ Edad, estado fenológico y órgano de la planta
- ∅ Deficiencias minerales
- ∅ Temperatura
- ∅ Estrés hídrico
- ∅ Compuestos orgánicos diversos presentes en el medio
- ∅ Factores genéticos
- ∅ Interacciones bióticas intra e interespecíficas
- ∅ Contaminantes sintéticos

Estos factores, que actúan directa o indirectamente sobre las plantas modificando su tiempo y su espacio, y a su vez crean condiciones complejas, heterogéneas y muchas veces adversas a estos organismos, poniendo en juego sus mecanismos de adaptación, producen cambios en la bioquímica básica de la célula y alteran su metabolismo. Cualquier factor ambiental puede ser limitante o determinante de la síntesis de uno o varios MS en una planta.

Las plantas como parte integral de un ecosistema, también se ven sometidas a factores bióticos y abióticos, y de igual forma ejercen una acción determinada sobre su entorno, lo anterior constituye una ley en ecología, la de las interrelaciones del organismo con su medio, del que depende directamente de la fluctuación de luz, temperatura, agua, cantidad y calidad de nutrientes, etc. Esto explica la variación de MS contenidos en estudios fitoquímicos de muestras de la misma especie (Anaya, 2003).

El orden de las Rútales es una de los más ampliamente distribuido en el mundo, esta formado por cinco familias, entre ellas la Rutaceae siendo esta la de mayor diversidad botánica (Márquez, 1998).

4.6 GÉNERO CASIMIROA

El género *Casimiroa* (Rutaceae) fue establecido en México por los botánicos mexicanos Pablo de la Llave y Juan Martínez Lexarza, en 1825, está conformado por diez especies (Martínez, 1951):

Casimiroa tetrameria Millps.

Casimiroa pringlei (Wats.) Engl.

Casimiroa watsoni Engler

Casimiroa edulis Llave et lex.

Casimiroa pubescens Ramírez

Casimiroa sapota Oerst f. *typica*

Casimiroa emarginata St. et Steyerm

Casimiroa microcarpa Lundell

Casimiroa calderoniae Chiang & Medrano

Casimiroa greggii (Watson) Chiang

4.7 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL GÉNERO

Entre los 150 géneros comprendidos en esta familia se encuentra *Casimiroa*. El género *Casimiroa* está conformado por árboles ó arbustos mexicanos y centroamericanos que viven en climas cálidos, de corteza morena-grisácea, salpicada de numerosas lenticelas; de hojas alternas, pecioladas, digitadas, con 3 a 5 foliolos, rara vez 1 ó 7. Hojuelas lanceoladas, subelípticas, ovales u obovadas, con peciolulos cortos o largos, glabras o más o menos vellosas, con numerosas glándulas visibles por transparencia: enteras u obscuramente aserrado-crenadas, con nervaduras prominentes en el envés y anastomosadas cerca del borde, acuminadas, con el ápice generalmente retuso y la base por lo común cuneada o redondeada, a veces inequilátera. Flores pequeñas, blanco-verdosas, unisexuales, en panículas axilares o terminales, sépalos cuatro o cinco, hirsutos; pétalos cuatro o cinco,

valvados y frecuentemente revolutos; estambres (estériles en la flor femenina) en igual número que los pétalos, con los filamentos subulados e insertados abajo del disco; anteras dorso fijas, elípticas u ovals, agudas en la base; ovario súpero, sésil, con uno o cinco lóculos, clara u obscuramente lobulado; óvulos axilares; el fruto es una drupa de 2 a 12 cm, con las semillas en número de una a cinco, con testa apergaminada y reticulada (Martínez, 1951).

Las únicas especies que son objeto de cultivo o semicultivo por sus frutos grandes y comestibles son *Casimiroa edulis* y varias formas de *C. sapota*. Las especies *C. pubescens*, *C. pringlei*, *C. greggii*, *C. watsonii*, *C. tetrameria*, *C. calderoniae* y *C. emarginata* se encuentran en forma silvestre (Martínez, 1951; Martínez, 1969).

4.8 ANTECEDENTES QUÍMICOS DEL GÉNERO CASIMIROA.

Actualmente se conocen miles de MS, pero tal vez existan muchos más y lo que es importante recalcar, es que existen interacciones bióticas dentro y entre especies y una continua evolución de los organismos, lo que permite nuevas rutas biogénicas para eventualmente producir metabolitos secundarios con posibles estructuras novedosas (Anaya, 2003).

Para la familia Rutaceae se ha informado en la literatura la presencia de aceites esenciales, alcaloides, cumarinas, flavonoides, limonoides y algunas ceras (Chiang y González-Medrano, 1961; Lundell 1968). En particular para especies del género *Casimiroa* se ha informado la presencia de diversos compuestos los cuales se muestran en el (Cuadro 1).

	Compuesto	Especie						Referencia
		<i>C. edulis</i>	<i>C. greggii</i>	<i>C. pringlei</i>	<i>C. tetrameria</i>	<i>C. pubescens</i>	<i>C. calderoniae</i>	
Esteroles	Zapoterina	*				*	1, 2, 3, 4, 5	
	7 α -obacunol	*					1, 2, 3, 4, 5	
	Obacunona	*					1, 2, 3, 4, 5	
	β -Sitosterol	*	*				1, 2, 3, 4, 6, 5, 24	
	Daucosterol	*					1, 2, 3, 4, 5	
Alcaloides	Casimiroina	*	*			*	1, 7, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 20, 21, 27	
	Casimiroedina	*					1, 7, 2, 8, 9, 10, 11	
	Edulina	*					13	
	Edulitina	*					1, 7, 2, 3, 10, 11, 12, 13, 14	
	Edulinina	*					1, 7, 2, 3, 8, 9, 10, 11, 12	
	γ -Fagarina,	*					7, 3, 10, 11, 12	
	Dictamina	*					7, 3, 8, 11, 12	
	Skimmianina	*					7, 3, 8, 11, 12	
	Eduleína	*					7, 3, 8, 11, 12	
	Histamina	*					14, 15, 9, 12, 17	
Histaminicos	N,N-Dimetilhistamina	*					2, 17, 15, 16, 9, 12, 17	
	N-Metilhistamina	*					2, 14, 15, 16, 9, 12, 17	
	N-Benzoitiramina	*					3	
Amidas	Palmitamida	*					2	
	Zapotina	*	*		*	*	2, 18, 20, 21, 25, 26, 27	
	Zapotinina	*					7, 2, 5	

	<i>C.</i> <i>edulis</i>	<i>C.</i> <i>greggii</i>	<i>C.</i> <i>pringlei</i>	<i>C.</i> <i>tetrameria</i>	<i>C.</i> <i>pubescens</i>	<i>C.</i> <i>Calderoniae</i>	
Rutina	*						14, 16, 9, 12
Cerrosillina				*			6, 19
		*					
				*			
Cerrosillina B		*		*			6, 19
5,6-Dimetoxiflavona	*	*	*				7, 6, 4, 19, 24, 25
2',5,6-Trimetoxiflavona	*	*					20, 18, 25, 27
Flavonoides 5,6,2-Trimetoxiflavona		*					18
5,6,3'-Trimetoxiflavona				*			19
5,3',5'-Trimetoxiflavona				*			19
5,6,2',3',6'-Pentametoxiflavona				*	*		19
5,6,2',3',4'-Pentametoxiflavona				*	*		21
5, 2',3',4',6'-Pentametoxiflavona				*			19
5,2',3',5',6'-Pentametoxiflavona				*			19
5,6,3',4',5',6'-Hexametoxiflavona				*			19
5,6,2',3',4',6'-Hexametoxiflavona		*					18
5,6,2',3',5',6'-Hexametoxiflavona				*			22
Felopterina	*		*		*	*	2, 9, 10, 11, 19, 21
5-Geraniloxipsoraleno	*						2, 9, 10, 11, 21
8-Geraniloxipsoraleno	*		*				2, 9, 10, 11, 19
8-Gerani-5-metoxi-oxipsoraleno	*						2, 9, 10, 11, 21

	C.	C.	C.	C.	C.	C.	
	<i>edulis</i>	<i>greggii</i>	<i>pringlei</i>	<i>tetrameria</i>	<i>pubescens</i>	<i>Calderoniae</i>	
9-Hidroxi-4-metoxi-furano-(3,2,6)-benzopirano-7-ona			*			2, 9, 10, 11, 21	
Escopoletina	*					7, 3, 8, 11, 12, 21	
Ester metílico de escopoletina	*					11, 21	
Bergapteno	*		*			7, 19, 21	
Cumarinas							
Isopimpineline	*				*	*	11, 21
8-[(4-Acetoxy-3-metil-butyl)oxi]psoraleno		*	*				19
Seselina		*					18, 21
O-Geraniol-ostenol		*					18, 21
8-[(6,7-Dihidroxi-3,7-dimetil-2-octenil)oxi]-psoraleno		*	*				19
Heraclenol	*				*	*	19
Heraclenina	*				*	*	19
Xanthotoxol			*				19, 21
Cumarina 7			*				21
Cumarina 8			*				21
Hidrocarburos							
Cerotato de carnaubilo	*						11
Hentriacontano	*						11
Pubesamida A					*		23
Pubesamidas							
Pubesamida B					*		23
Pubesamida C					*		23

1) Power, 1911; 2) Kincl *et al.*, 1956; 3) Sondheimer *et al.*, 1959; 4) Sondheimer y Meisels, 1960; 5) Rubinsteins *et al.*, 1976; 6) Domínguez *et al.*, 1976; 7) Iriarte *et al.*, 1956; 8) Toube *et al.*, 1967; 9) Romero *et al.*, 1983; 10) Enríquez *et al.*, 1984; 11) Rizvi *et al.*, 1985; 12) Lara y Marquez, 1996; 13) Beyeman y Rooda, 1960; 14) Major y Dürsch, 1958; 15) Mechoulam y Hirshfeld, 1967; 16) Lozoya *et al.*, 1978; 17) Magos *et al.*, 1999; 18) Meyer *et al.*, 1985; 19) Castellanos, 1998; 20) Ito *et al.*, 1998; 21) Garcia-Argaez *et al.*, 2005; 22) Heneka *et al.*, 2005; 23) González-Lugo *et al.*, 2003; 24) Domínguez *et al.*, 1972; 25) Garrat, 1967; 26) Dreyer, 1967; 27) Dreyer, 1968.

Cuadro 1. Compuestos aislados de especies del género *Casimiroa*

4.9 ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS DEL GÉNERO

Casimiroa edulis es la especie más estudiada del género, diversos estudios han revelado diferentes actividades biológicas, las cuales se enlistan a continuación:

Los extractos hidroalcohólicos de las partes aéreas, evaluados en ratas, mostraron actividad antiinflamatoria y diurética (Rizvi *et al.*, 1985). Se ha informado que la corteza contiene compuestos responsables de varios efectos fisiológicos, farmacológicos y biológicos, como son: la actividad antiarrítmica, antidiurética, espasmódica, vasoconstrictiva, sedante e hipotérmica (Ito *et al.*, 1998).

El extracto etanólico de semilla presentó actividad relajante de los músculos esqueléticos y estimulante de los músculos lisos. El fruto presentó actividad analgésica, depresora del sistema nervioso central e hipotérmica. el extracto metanólico-etanólico de semillas, administrado por vía intravenosa, mostró actividad hipotensiva en ratas (Argueta *et al.*, 1994).

De los extractos hidroalcohólicos de semillas de *C. edulis* fue encontrado un glucósido. Los efectos biológicos causados por este glucósido fueron: parálisis de la movilidad, lentitud de las contracciones cardíacas (bradicardia), pérdida del equilibrio, aumento de la secreción intestinal y gástrica, respiración frecuente, pérdida de la sensibilidad y muerte por asfixia (Lozoya, 1982). Por otro lado, la zapotina uno de los compuestos aislados del fruto de *Casimiroa edulis*, induce la diferenciación celular y la apoptosis (Maiti *et al.*, 2007). Además la zapotina posee actividad quimiopreventiva (Murillo *et al.*, 2007).

Del extracto de acetato de etilo de semillas se han aislado alcaloides, flavonoides y limonoides de los cuales se ha informado poseen actividad antimutagenica (Ito *et al.*, 1998).

El extracto acuoso de semillas de *C. edulis* al ser administrado en perros, mostró efectos hipotensivos (Vidrio y Magos 1991). En tanto que el extracto alcohólico de semillas indujo

hipotensión y taquicardia en ratas anestesiadas (Vidrio y Magos 1991). Esta actividad hipotensiva en semillas es corroborada con el trabajo de Major y Dürsch en 1958.

El extracto acuoso de semillas de *C. edulis*, probado en ratas macho mostró efectos hipotensivos (Syed y Nabeeh, 2008).

El extracto etanólico de hojas presentó actividad citotóxica en las líneas de cáncer humano U251(cáncer de sistema nervioso central) y MCF-7 (cáncer de mama) (Awaad y Soliman, 2004).

En estudios realizados con el extracto acuoso de las hojas de *C. edulis* en ratas winstar macho se informa que posee actividad ansiolítica, reduce la locomoción y neutraliza la acción antidepressiva (Molina-Hernandez *et al.*, 2004).

Los extractos acuoso y etanólico de semillas de *C. edulis* poseen propiedades anticonvulsivas, aunque el primero es más activo (Garzón-De la Mora *et al.*, 1999).

El extracto acuoso de hojas de *C. edulis* mostró actividad anticonvulsiva similar a la actividad presentada por fenitoína y pentobarbital, con estos resultados se sugiere que el extracto acuoso posee compuestos con potencial antiepiléptico (Navarro *et al.*, 1995).

En cuanto a estudios de toxicidad en *C. edulis*, se observó que el efecto del extracto alcohólico sobre la presión arterial en perros a una dosis de 0.2 g/kg de peso, ocasiona depresión del sistema nervioso central, paro respiratorio y la muerte por sobredosis. La administración del extracto a perros, a la dosis de 1 g/kg de peso, causa vómito, enfriamiento, inactividad, parálisis y muerte por paro respiratorio. Por otra parte, la aplicación oral de zapote blanco a conejas gestantes reveló en la autopsia un abundante sangrado vaginal. Tratando de determinar la DL₅₀ en ratas se encontró que a la dosis de 2 a 2.5 g/kg de peso, se observaban síntomas de toxicidad tales como pérdida de la coordinación muscular, así como: pérdida del equilibrio, entre otros (Argueta *et al.*, 1994).

Por su parte, *Casimiroa tetrameria* posee propiedades espasmolíticas y antidiarreicas (Heinrichs *et al.*, 2005) y para *Casimiroa pubescens* se ha informado la presencia de compuestos con actividad citotóxica: isopimpinolina, felopterina, heraclenol, heraclenina y pubesamida A, a varias líneas de cáncer humano (González, 2003).

4.10 *Casimiroa greggii*

4.10.1 Ubicación taxonómica de *Casimiroa greggii* (Martínez, 1951)

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rutales

Familia: Rutaceae

Género: *Casimiroa*

Especie: *Casimiroa greggii* (Watson) Chiang.

Descripción botánica de Casimiroa greggii.

A *Casimiroa greggii* (Figura 1), anteriormente *Sargentia greggii*, se le conoce con los nombres comunes de Chapote amarillo en el estado de Nuevo León, Limoncillo en Tamaulipas y San Luis Potosí, en el estado de Tamaulipas también se conoce con el nombre de Naranjillo,

Árbol de hasta 13 m de altura, de corteza gris, lisa, exfoliable; hojas alternas, con 2-3 hojuelas digitadas, de 3-10 cm; flores pequeñas y blancas; fruto amarillo de 1.5-2 cm.

Esta especie se distribuye en los estados de Nuevo León, Tamaulipas y San Luis Potosí (Figura 2) (Martínez, 1979).



Figura 2. Frutos de *Casimiroa greggii*

Tomada de internet

Sereno Watson clasificó en 1980 a *Sargentia greggii*, dentro de un nuevo género y especie de las Rutáceas, basándose en plantas colectadas por Greggii y Pringlei, cerca de la ciudad de Monterrey; seis años mas tarde después de realizar diversas pruebas con base en las características físicas de la planta se propone cambiar el nombre de *Sargentia* por *Casimiroa* (Chiang, 1989).



Figura 3. Área de distribución *Casimiroa greggii*

4.10.3. Antecedentes químicos de *Casimiroa greggii*

Estudios previos señalan la presencia de: alcaloides (maculina y kokusaginina), limonoides (rutaevin y diosfenol limoneno) y flavonas (zapotina, 5,6 2'-trimetoxi-flavona, 5,6,2',3',4',6'-hexametoxi-flavona, 5, 6-dimetoxi-flavona, cerrosillina y cerrosillina B), en raíces y parte aérea de la especie (Domínguez *et al.*, 1972; Domínguez *et al.*,1976; Meyer *et al.*, 1985). De hojas y frutos se han aislado triacontano, β -sitosterol (**5**), cerrosillina (5,6,3',5' tetrametoxiflavona) (**2**), 5, 6-dimetoxiflavona (**1**), 5, 6, 3', 4', 5'-pentametoxiflavona (**3**). De la raíz de la planta, se logran aislar limonoides y alcaloides, maculina, kokusaginina, diostenol de la limonina, rulaevina, (Domínguez *et al.*, 1977)

zapotina (4), 5, 6, 2'-trimetoxiflavona, y 5, 6, 2', 3', 4', 6'-hexametoxiflavona (Márquez, 1998) (Figura 4).

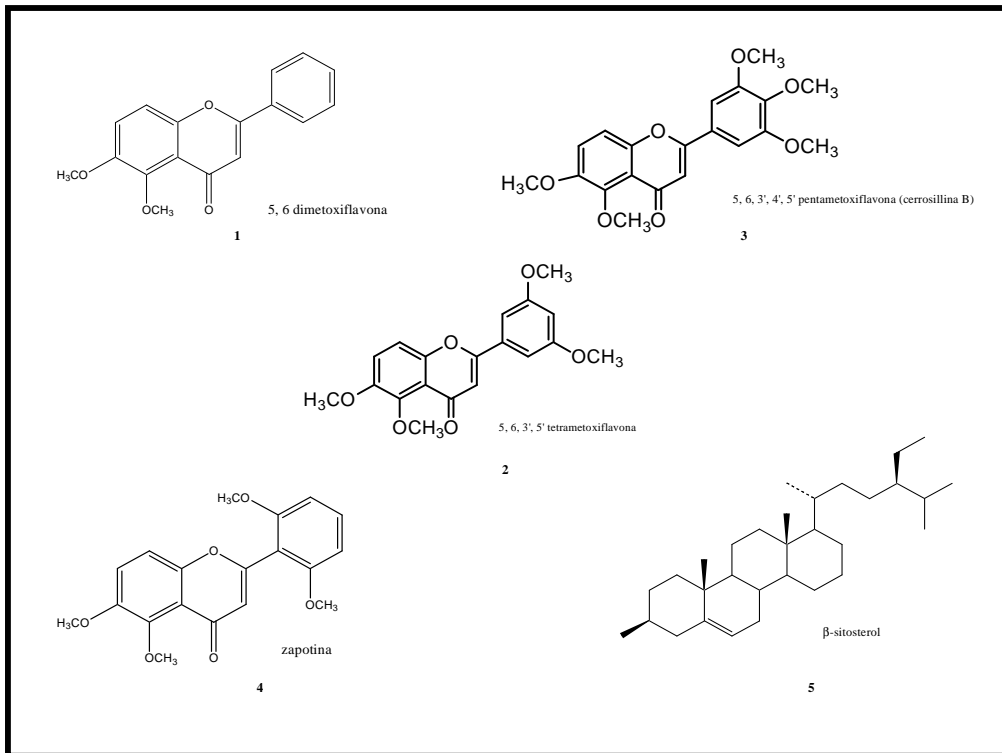


Figura 4. Estructura química de algunos metabolitos secundarios aislados de *Casimiroa greggii*.

4.10.4 Antecedentes farmacológicos *Casimiroa greggii*

Para esta especie se ha informado que el extracto metanólico de las raíces posee actividad citotóxica en células 9 KB de leucemia humana, sin embargo, ninguno de los compuestos aislados de este extracto mostró actividad contra células de la línea murina P-388 (Meyer *et al.*, 1985).

En los primeros 20 años de investigación con lo que respecta a quimioterapia oncológica, los agentes utilizados interactuaban con el ADN e inhibían la síntesis de nuevo material genético o causaban daño irreparable al ADN. En años más recientes la identificación de

fármacos desde al área de los productos naturales se ha emancipado hasta campos de investigación que representan nuevos conocimientos sobre biología oncológica. Como es el caso de la interleucina-2 la cual regula la proliferación de los linfocitos T, esto ha favorecido a pacientes de melanoma maligno y carcinoma de células renales, los cuales no mejoraban con fármacos comunes (Chabner *et al.*, 1996).

4.11 CÁNCER

El cáncer es un conjunto de padecimientos neoplásicos que se presenta en los seres humanos y otras especies animales (Katzung, 1999). Por definición, es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos (Villalva, 2008).

Esta parece ser una enfermedad tan antigua como lo es la vida de los organismos multicelulares en nuestro planeta. Su nombre proviene del griego y significa cangrejo según explica galeno (131 a 203 d.c) en su tratado “*Definitiones Medicae*”(Cortinas, 2003).

El cáncer puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, no es una enfermedad única sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y célula de origen (Villalva, 2008).

Los cánceres pueden surgir en cualquier órgano del cuerpo, aunque algunos sitios son afectados más frecuentemente que otros. Cada cáncer procede de una sola célula que en un momento determinado traspasa sus límites territoriales y es capaz de formar una nueva línea celular que se reproduce sin límite.

Cuando las células se multiplican sin algunos de los límites normales (por ejemplo, cuando se dividen más frecuentemente o están sujetas a menos pérdidas), pero sin sobrepasar su terreno histológico ni invadir los terrenos vecinos, forman *tumores benignos*; los ejemplos van desde los pequeños lunares cutáneos (de los cuales la mayoría de nosotros tiene una docena o más) hasta los “fibromas” uterinos, bastante comunes, los cuales si no son

extraídos pueden a veces llegar a ser muy grandes. Si las células anómalas han adquirido la habilidad de diseminarse hasta lugares distantes, como por ejemplo tejidos vecinos o regiones alejadas, por medio de la circulación sanguínea, entonces se les denomina *tumores malignos o cánceres* (Cairns, 1981).

En los análisis de la OMS, se indica que desde la edad madura hasta la vejez, una de las principales causas de muerte en las mujeres es el cáncer, y las cardiopatías en los hombres. Asimismo, dentro del grupo de tumores malignos que afectan a ambos sexos, el cáncer de pulmón, tráquea y bronquios, y de la próstata, tienen mayor incidencia en los varones y, los de tipo ginecológico, en la población femenina.

En los varones, las tres principales causas de muerte por tumores malignos en el año 2006 corresponden a los de: tráquea, bronquios y pulmón (16.6%), próstata (17.1%) y estómago (10.4 %). En las mujeres, 13.9% de las defunciones por cáncer maligno corresponden al del cuello del útero (cervico-uterino) y 15.0% más al de mama; así mismo, el de hígado y vías biliares intrahepáticas ocasionó 9.2% de las muertes. En la figura 4 se muestra la distribución porcentual, según el tipo de tumor maligno, por sexo (INEGI, 2006).

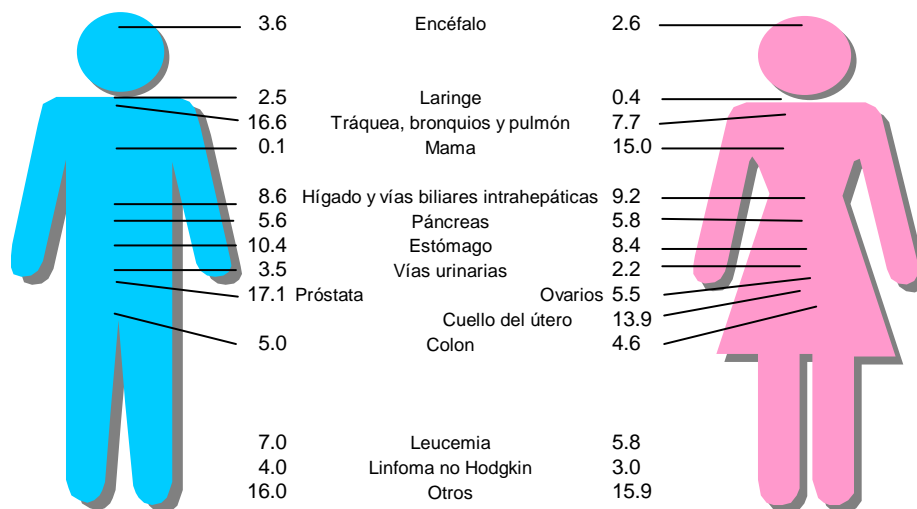


Figura 5. Distribución porcentual de los principales tipos de tumores malignos (tomada de INEGI, 2006).

Como bien se sabe, el cáncer es una enfermedad que si es detectada a tiempo puede ser curable, hoy en día existen varios tratamientos como los procesos quirúrgicos, que consisten en extirpar una parte del órgano o tejido, según lo avanzado y el lugar donde se encuentre localizado el cáncer. Por otra parte, las quimioterapias consisten en suministrar un medicamento que mata células, y puede ser utilizado en diversas etapas durante un tratamiento, antes de un proceso quirúrgico, o bien de manera alterna a un tratamiento de radioterapia, este ultimo básicamente consiste en aplicar Rayos X para matar células, reducir el tamaño del tumor y facilitar su extirpación (IMSS, 2006).

4.12 FÁRMACOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

Es de gran relevancia hacer notar que, actualmente no se cuenta con fármacos o algún agente químico que ataque exclusivamente a la célula cancerosa, únicamente se emplean aquellos en donde la célula maligna resulta ser más vulnerable que la normal, pero sin que esta se encuentre exenta del impacto (Rebolledo, 1952)

Entre los fármacos más utilizados en tratamientos neoplásicos se encuentran los **agentes alquilantes, los antimetabolitos, los productos naturales y hormonas.**

Los **agentes alquilantes** fueron de los primeros recursos terapéuticos antineoplásicos los cuales se siguen utilizando debido a su eficacia sobre ciertos tipos de cáncer. Sin embargo, son muy tóxicos y producen muchos efectos colaterales.

Actúan adhiriéndose a las cadenas orgánicas laterales dentro de las células cancerosas, modificando la composición química de las proteínas de la célula. (Asperheim, 1998).

En este grupo de fármacos, se encuentran la TEM y la TIOTEPA, esta última de poca toxicidad, de modo que ha sido utilizada cada vez mas en quimioterapia a altas dosis. Este tipo de medicamentos puede interferir en la función del ADN en tejidos de proliferación rápida como son: el hígado, riñón y linfocitos maduros, pero son inespecíficos ya que pueden actuar en cualquier etapa del ciclo celular.

Casi todos los agentes alquilantes son muy tóxicos, como la mostaza nitrogenada, mecloretamina, melfalán, clorambucil, ciclofosfamida e ifosfamida, son algunos ejemplos de los fármacos que producen mielosupresión aguda (disminución de la función de la médula ósea). Además, producen daños en mayor o menor grado, en la mucosa intestinal; causan alopecia y producen también efectos tóxicos en los aparatos reproductores, amenorrea permanente en mujeres y azoospermia irreversible en hombres (Chabner *et al.*, 1996).

Por su parte, la acción de los **antimetabolitos**, consiste en interferir en alguna fase del metabolismo celular, desafortunadamente esto no siempre sucede, entre los efectos secundarios que causan es la mielosupresión, lo cual llevo a la discontinuación del fármaco (Asperheim, 1998).

Este grupo se divide en: análogos del ácido fólico, análogos de pirimidina y análogos de purina.

Los *análogos de ácido fólico* ocupan un sitio especial dentro de los fármacos antineoplásicos, por que fueron los primeros en curar un tumor sólido como el coriocarcinoma. La cura regular del coriocarcinoma por metotrexato genero interés para hacer investigaciones sobre la quimioterapia oncológica. Por lo tanto, el metotrexato es uno de los fármacos más estudiados, el cual ejerce su acción mediante las formas reducidas o activas del ácido fólico en el cuerpo. Ha sido utilizado con eficacia contra coriocarcinoma uterino, linfosarcomas y psoriasis.

Los efectos tóxicos primarios del metotrexato se producen en células en fase de división rápida, como médula ósea y de epitelio gastrointestinal. En la administración a largo plazo en el tratamiento de psoriasis o artritis reumatoide tiene efectos tóxicos importantes como fibrosis y cirrosis hepáticas.

Los agentes *análogos de pirimidina* incluyen fármacos diversos que tiene en común la capacidad de inhibir la biosíntesis de nucleótidos pirimidicos o copiar la acción de metabolitos naturales al grado que interfieren en funciones celulares vitales. Medicamentos

de este grupo se han utilizado para tratar trastornos neoplásicos, psoriasis e inflamación por hongos y virus de ADN. Dentro de este grupo encontramos los agentes de tipo fluorouracilo y floxuridina (fluorodesoxiuridina) y citarabina.

Estudios muy diversos de *análogos de purina* han permitido la obtención de algunos fármacos que se utilizan no sólo para tratar cánceres (mercaptopurina, tioguanina) sino que también han servido como agentes inmunosupresores (azatioprina) y antivirales (aciclovir, ganciclovir, vidarabina). La mercaptopurina y la azatioprina constituyen en la actualidad algunos de los fármacos mas importantes y de mayor utilidad en esta categoría.

Un adelanto promisorio ha sido el descubrimiento de inhibidores potentes de la adenosindesaminasa y pentostatina, investigaciones recientes han demostrado que esta ultima posee actividad contra algunas leucemias y linfomas. Se han producido extraordinarios efectos sinérgicos en combinación con algunos análogos de adenosina como la vidarabina

El principal efecto tóxico de la mercaptopurina es la depresión de la médula ósea, puede surgir anorexia, náusea, vómito y rara vez estomatitis y diarrea.

En cuanto a **productos naturales** se refiere, se han descrito las propiedades benéficas de *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don, conocida como Vinca, de los estudios realizados de los extractos de esta planta se presentaron efectos beneficiosos en la diabetes mellitus, en investigaciones posteriores se observó también granulocitopenia y depresión de la médula ósea en ratas, esto llevo a la purificación de un alcaloide activo, y ulteriormente del fraccionamiento de los extractos de esta especie, se obtuvieron cuatro alcaloides dimericos activos: vinblastina, vincristina, vinleurosina y vinrosidina, las dos primeras son agentes clínicos importantes para el tratamiento de leucemias, linfomas y cáncer testicular.

Producen alopecia, celulitis local, ocasionalmente, después de utilizar tratamientos con vincristina surge el síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética. También pueden causar efectos neurotóxicos, insensibilidad y hormigueo de las extremidades,

perdida de reflejos, debilidad de los músculos. La vincristina es una de las excepciones que no causan mielosupresión. Sin embargo, a dosis altas causa convulsiones y coma irreversible.

Otro compuesto utilizado desde 1992 para el tratamiento de cánceres de seno, esófago y pulmones, es el paclitaxel® (taxol), este compuesto fue aislado originalmente del tejo (*Taxus baccata*) y posee efectos farmacológicos peculiares como inhibidor de la mitosis, difiere de los alcaloides de la vinca en que estimula la formación de microtúbulos y no la inhibe.

Los efectos tóxicos primarios se presentan en la médula ósea. Se puede sufrir hipersensibilidad, bradicardia asintomática, ocasionalmente se pueden presentar casos de taquicardia.

La podofilotoxina es otro fármaco de origen natural, obtenida a partir de la mandrágora (*Podophyllum peltatum*), fue utilizada por los indígenas de América y los primeros colonizadores. Se han obtenido glucósidos que muestran actividad terapéutica en algunas neoplasias humanas, como la leucemia en niños, carcinoma de pulmón, tumores testiculares, enfermedad de Hodgkin y linfomas. Los derivados en cuestión se denominan etopósido (VP-16-213) y tenipósido (VM-26)

En los antibióticos, pertenecientes a los productos naturales, encontramos a dactinomicina, sus manifestaciones tóxicas incluyen la anorexia, náusea, supresión hematopoyética, úlceras de la mucosa de la boca, alopecia, descamación, inflamación y pigmentación de áreas sometidas a radiación, entre otras. En lo que se refiere a la daunorrubicina, sus derivados se encuentran dentro de los derivados antitumorales más importantes, son producidos por el hongo *Streptococcus peucetius* var. *caesius*. Se ha utilizado principalmente en leucemias agudas. Las principales propiedades tóxicas de daunorrubicina son la mielosupresión y la leucopenia, además de estomatitis, trastornos gastrointestinales, alopecia que pueden ser reversibles. El medicamento puede producir una considerable

toxicidad local en tejidos radiados como piel, corazón, pulmones, esófago y mucosa gastrointestinal.

La plicamicina antes conocida como mitramicina es un antibiótico citotóxico aislado de *Streptomyces plicatus*, es muy tóxico pero posee actividad en el tratamiento de tumores avanzados de testículos. Es tóxica en médula ósea, hígado y riñones, se puede llegar a presentar complicaciones hemorrágicas graves e incluso la muerte (Chabner *et al.*, 1996).

Las **hormonas** son sustancias que poseen diversos usos para el tratamiento de enfermedades malignas, tal es el caso de los corticosteroides que han logrado producir la reversión de ciertos cánceres, son utilizados ya sea solos o en combinación con otros fármacos, los efectos secundarios se deben a una administración excesiva de corticosteroides provocando básicamente retención de sal y agua, “cara de luna” edema y estrías. La prednisona es tal vez el corticosteroide más utilizado en el tratamiento de cánceres.

Algunos ejemplos de hormonas utilizadas en tratamientos contra cáncer son: testolactona, calusterona, acetato de megestrol y citrato de tamoxifén.

Como es de esperarse los efectos colaterales se ven reflejados en la masculinización cuando se administran andrógenos a una mujer y la feminización cuando se administran estrógenos a un hombre (Asperheim, 1998).

4.13 INFLAMACIÓN

La inflamación es un mecanismo de defensa tisular, una reacción localizada de protección en tejidos con irritación, lesiones o infecciones. Esta palabra deriva del latín “flama” – llama, fuego-, y se define como una respuesta, generalmente local, de un organismo frente a la agresión, caracterizadas por un conjunto de reacciones secuenciales, modulada por mecanismos reguladores.

Las características de la inflamación, consisten en la presencia de dolor, aumento de temperatura, hinchazón y enrojecimiento, (en ocasiones la pérdida de la función). Estos signos –calor, rubor y dolor- de manera general constituyen los efectos de cualquier proceso inflamatorio (Gijón y De Miguel, 1997)

4.14 TIPOS DE INFLAMACIÓN

4.14.1 inflamación aguda

La inflamación aguda es una respuesta inespecífica de un organismo ante un estímulo lesivo, en la que la exudación plasmática y la vasodilatación son intensas, en la que se presentan los efectos comunes del proceso inflamatorio.

En este tipo de inflamación se distinguen dos tipos de fases estrechamente relacionadas:

- Fase vascular: en esta desempeñan un papel fundamental los mediadores bioquímicos como el factor Hageman, los procesos de la coagulación, el sistema de las cininas, las aminas vasoactivas (histamina y serotoninas), derivados del ácido araquidónico, entre otros. La acción de estas sustancias induce una vasodilatación con mayor aporte de sangre a la región afectada y un aumento de la permeabilidad vascular.
- Fase celular: en esta participan células como el basófilo y las plaquetas, que actúan liberando aminas vasoactivas, enzimas proteolíticas y derivados del ácido araquidónico entre otros mediadores (Gijón y De Miguel, 1997).

4.14.2 Inflamación crónica

Esta se define como un respuesta específica frente al agente agresor, mediada por el sistema inmunológico. En la inflamación crónica el estímulo flogógeno no puede ser eliminado, con lo que el proceso inflamatorio continua.

El estímulo inflamatorio persistente, causa la inflamación crónica, es generalmente una sustancia antigénica que desencadena una respuesta inmunológica.

En el curso de la inflamación crónica la reacción vascular es menos intensa que en la inflamación aguda, y en la fase celular el monocito y los linfocitos son las células primordiales (Gijón y De Miguel, 1997).

4.15 RELACIÓN CÁNCER – INFLAMACIÓN

La relación entre la inflamación y el cáncer no es nueva. En 1863 se creía que el origen del cáncer estaba en sitios de inflamación crónica (Flores-Rosete y Martínez-Vázquez, 2008). Actualmente se sabe que la inflamación juega un papel importante en la aparición y progresión de una amplia variedad de enfermedades, incluido el cáncer. Si bien la inflamación aguda es parte de la respuesta de defensa, la inflamación crónica puede dar lugar a cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, pulmonares y neurológicas.

La inflamación crónica se ha relacionado con diversos pasos involucrados en la tumorigénesis, como son: la transformación celular, la promoción, supervivencia, proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis. La inflamación es un factor de riesgo bien conocido para muchos tipos de cáncer, como se muestra en el Cuadro 1 (Aggarwal *et al.*, 2006).

Inductor	Inflamación	Cáncer	% de predisposición a progresión de cáncer
Humo de tabaco	Bronquitis	Cáncer de pulmón	11-24
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis	Cáncer gástrico	1-3
Virus de papiloma humano	Cervicitis	Cáncer cervical	<1
Tabaco y alcohol	Esofagitis	Cáncer de esófago	15
Fibras de asbesto	Asbestosis	Mesoteloma	10-15

Cuadro 2. La inflamación como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer.

En el proceso de inflamación las ciclooxigenasas (COX) son enzimas clave que catalizan la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas y tromboxanos. Existen dos tipos de ciclooxigenasa; COX-1 y COX-2. (1). La COX-1 es una enzima constitutiva y se produce en muchos tejidos como el tracto gastrointestinal y los riñones, la COX-2 es inducida y se expresa durante el proceso de inflamación en el sitio del daño. La prostaglandinas inducidas por la COX-2 causan inflamación (Meric *et al.*, 2006).

La COX-2 ha sido implicada en una variedad de tumores (Potter y Ulrich, 2006) y en algunos estudios preclínicos se ha observado que la administración de inhibidores de la COX-2 redujeron el tamaño y número de pólipos colorrectales (Meric *et al.*, 2006). Entre los inhibidores de la COX-2 que se han empleado en la clínica para el tratamiento del cáncer están los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's). Actualmente se sabe que este grupo de fármacos compiten con el ácido araquidónico, liberado en la respuesta inflamatoria, para acoplarse al sitio activo en los canales enzimáticos. Se ha postulado que los AINEs bloquean la COX al ligar enlaces de hidrógeno a la arginina polar en posición 120. Para que un AINEs sea selectivo, es crítica la presencia de un aminoácido clave en la posición 530 de estas enzimas, concretamente la isoleucina para COX-1 y la valina para COX-2, que deja una abertura en la pared del canal, que permite el acceso a un lugar de acoplamiento (Cryer y Feldman, 1998; Hawkey, 1999; Feldman y McMahon, 2000).

En 1990 aparecieron los primeros inhibidores de las COX: nimesulida y meloxicam, inhibidores significativamente mejores de COX-2 que de COX-1. El meloxicam (Movalis®, Parocin®, Uticox®) es una enolcarboxamina relacionada con el piroxicam, y se estima que tiene una selectividad entre 3 y 77 veces mayor para COX-2. Esta selectividad para COX-2, sin embargo, disminuye al aumentar la dosis del fármaco. La nimesulida (Antifloxil®, Guaxan®, Severin F®) pertenece a la familia de las sulfonamidas. Presenta una selectividad entre 5 y 16 veces mayor para COX-2 y al igual que en el caso del meloxicam, a partir de ciertas dosis más elevadas pierde la selectividad COX-2. El celecoxib es un compuesto derivado del 1,5-diarilpirazol con una selectividad 375 veces mayor para COX-2, mientras que el rofecoxib es un derivado metilsulfonilfenil que presenta una relación COX-2/COX-1 superior a 800 (Potter y Ulrich, 2006; Meric *et al.*, 2006).

V. JUSTIFICACIÓN

México tiene una amplia tradición en el uso de plantas con propiedades medicinales, dentro de las especies a las que se les ha atribuido propiedades terapéuticas se encuentran algunas del género *Casimiroa*, las cuales cuentan con antecedentes químicos y farmacológicos que fundamentan sus propiedades antiinflamatorias y citotóxicas.

Por otra parte en nuestro país el cáncer es un problema de salud pública. De acuerdo con las estadísticas es la segunda causa de muerte, para el año 2006 se presentaron 63 888 defunciones por este padecimiento (INEGI, 2006). Se estima que cada año el número de casos de cáncer se incrementará, por lo cual se hace importante la búsqueda de nuevas moléculas que permitan el desarrollo de fármacos para el tratamiento de esta enfermedad. Bajo esta perspectiva se planteó la presente investigación en la que se evaluó la actividad antiinflamatoria y citotóxica de los extractos orgánicos y compuestos aislados de semillas de *Casimiroa greggii*.

[Escribir texto]

VI. HIPÓTESIS

Existe evidencia experimental que avala las propiedades antiinflamatorias y citotóxicas de algunas flavonas y cumarinas, aisladas de especies pertenecientes al género *Casimiroa*. Además de estudios previos, que han demostrado la presencia de este tipo de MS en extractos de raíces y partes aéreas de *Casimiroa greggii*, entonces es factible suponer la presencia de MS en semillas de *C. greggii* y que presenten propiedades antiinflamatorias y citotóxicas.

[Escribir texto]

VII. OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio fitoquímico de las semillas de *Casimiroa greggii*, así como evaluar la actividad citotóxica y el porcentaje de inhibición de la inflamación de extractos orgánicos y de sus MS.

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener extractos orgánicos (hexano, acetato de etilo y metanol) de semillas de *Casimiroa greggii*.
- Aislar y purificar los MS mayoritarios por medio de métodos cromatográficos.
- Identificar la estructura química de los metabolitos aislados por comparación de los datos espectrales con los informados en la literatura.
- Evaluar el porcentaje de inhibición de la inflamación de extractos crudos y compuestos aislados en el modelo de TPA.
- Evaluar la actividad citotóxica de extractos y compuestos aislados mediante el ensayo de SRB.

[Escribir texto]

IX. MATERIAL Y MÉTODO

9.1 TRABAJO DE CAMPO

El material vegetal fue recolectado en las faldas del Cerro de la Silla en Monterrey, N. L. (25° 37' 40'' N y 100° 14' 20'' W) en septiembre del 2005. Se recolectaron frutos sanos, es decir aquellos que no mostraran evidencias de plagas o enfermedades y de coloración uniforme. También fue recolectado y prensado un ejemplar de herbario, el cual fue depositado en el herbario MEXU. El material vegetal fue trasladado en bolsa de papel al Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

9.2 ESTUDIO FITOQUÍMICO

El análisis fitoquímico de las semillas de *Casimiroa greggii* se realizó en el Laboratorio 1-4 de Productos Naturales del Instituto de Química.

Del material vegetal recolectado se utilizaron las semillas, las cuales fueron extraídas del fruto de forma manual con ayuda de un cuchillo, después fueron lavadas con agua para eliminar todo residuo de pulpa, las semillas se secaron a temperatura ambiente y se molieron en una licuadora industrial marca internacional modelo LI-5, posteriormente se pesaron obteniendo un total de 416 g, las semillas secas y molidas, se maceraron sucesivamente con hexano, acetato de etilo y metanol, tres veces por cada disolvente, durante 48 h a temperatura ambiente. El disolvente fue eliminado por destilación a presión reducida en un rotavapor Büchi R-200. Una vez obtenidos los extractos, de manera individual fueron incorporados en gel de sílice, para su posterior separación por cromatografía en columna.

La separación de los extractos se realizó por cromatografía en columna, en una columna abierta, la cual fue empacada con gel de sílice. Se emplearon eluyentes de polaridad ascendente: hexano (100%), mezclas de hexano-acetato de etilo (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6,

3:7, 2:8, 1:9), acetato de etilo (100%), mezclas de acetato de etilo-metanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) y metanol (100%). A cada una de las fracciones así obtenidas se les realizó cromatografía en capa fina y las que mostraron un patrón cromatográfico similar fueron reunidas.

Posteriormente la purificación de los compuestos se realizó por cristalizaciones sucesivas, una vez precipitado el compuesto y para verificar su pureza se realizó cromatografía en capa fina.

La identidad de los compuestos fue determinada por métodos físicos, espectroscópicos y espectrométricos. Aquellos compuestos conocidos fueron identificados por comparación de sus datos espectroscópicos y constantes físicas con lo informado en la literatura (Meyer *et al.*, 1985; Ito *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 2003).

9.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

La evaluación de la actividad citotóxica se efectuó mediante el ensayo de la SRB de acuerdo con la metodología propuesta por Monks y colaboradores (1991), la cual se describe a continuación.

Cultivos celulares: se emplearon seis líneas celulares de cáncer humano: cáncer de colon HCT-15, mama MCF-7, SNC U251, leucemia K-562, próstata PC-3 y pulmón SKUL, las cuales fueron cultivadas en medio RPMI-1640 adicionado con 10% de SFB, 2 μ M glutamina. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a una atmósfera de 5% de CO₂, a una temperatura de 37 °C y un ambiente saturado de humedad.

Preparación e inoculación de las células: las células adheridas a los frascos de cultivo fueron removidas con 2 ó 3 mL de solución tripsina-EDTA al 0.05%. Posteriormente la tripsina fue inactivada adicionado 10 mL de medio RPMI-1640 adicionado con 5% de SRB, las células se disociaron con pipeteo suave, la densidad y viabilidad de las líneas celulares fueron contadas en un hemocitómetro y evaluadas por exclusión con azul de

tripano. Después de ser contadas las células se procedió a hacer una dilución para obtener una densidad adecuada para cada línea. La suspensión celular se sembró en placas de 96 pozos. Una vez hecho lo anterior, todas las líneas celulares fueron incubadas por un período de 24 h a 37 °C y 5% de CO₂ antes de adicionar los compuestos a evaluar.

Dilución de los compuestos a evaluar: los extractos se evaluaron a una concentración de 50 µg/mL y fueron solubilizados en DMSO (40 µM). Inmediatamente después de la preparación de las soluciones 100 µL cada disolución se agregó a los pozos. Dado que los compuestos a evaluar no son filtrados o esterilizados la contaminación bacteriana se controló por la adición de diversos antibióticos como la penicilina, estreptomycin y anfotericina B al 10%. Se usó como control negativo diferentes concentraciones de DMSO. Los cultivos se incubaron por un período de 48 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad. El crecimiento y viabilidad celular se evaluó mediante la técnica de SRB.

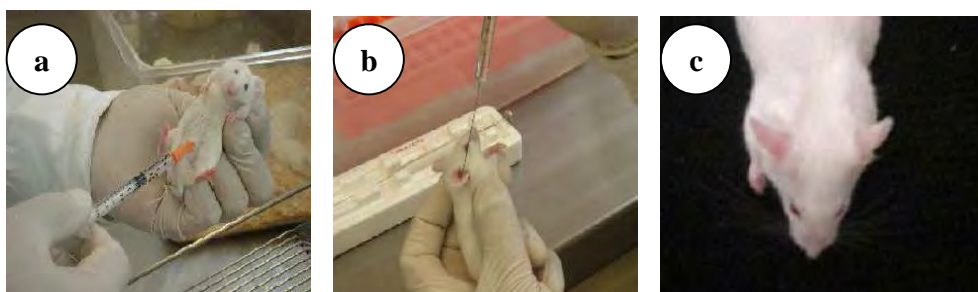
Ensayo SRB: transcurridas las 48 h los cultivos celulares se fijaron *in situ* adicionado 50 µL de TCA frío (50% p/v), los cultivos se incubaron por 60 min a 4 °C. Transcurrido este tiempo se desechó el sobrenadante y los cultivos se lavaron cinco veces con agua desionizada, se dejó secar por 24 h. Posteriormente se adicionó a los pozos 100 µL de solución SRB (0.4% p/v en ácido acético al 1%) durante 10 min, el exceso de SRB se remueve lavando cinco veces con ácido acético al 1%, se dejó secar por 24h. Finalmente, el botón celular teñido se solubiliza con buffer Tris y la DO fue leída en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm. La densidad óptica es proporcional al crecimiento celular e inversamente proporcional al grado de citotoxicidad de un compuesto prueba. La citotoxicidad es reportada como el porcentaje de inhibición del crecimiento celular y se determino de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento} = 100 - (\text{DO (muestra)} / \text{DO (vehículo)}) * 100$$

9.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Ensayo de TPA: la determinación cuantitativa de la actividad antiinflamatoria de los extractos se realizó utilizando el método de inducción de edemas en orejas de ratón por el TPA, siguiendo la metodología propuesta por Merlos *et al.*, 1991. Se emplearon ratones machos (cepa CD1, de 20 a 25 g) los cuales se pesaron y fueron separados al azar en grupos de tres: un grupo control y grupos tratados. Cada grupo fue anestesiado con PBS a una dosis de 31.5 mg/kg por vía intraperitoneal (Fig. 6a). A los grupo control y tratados se les aplicó tópicamente 10 μ L de la solución etanólica de TPA (250 μ g/mL) en la oreja derecha, y 10 μ L de etanol en la oreja izquierda. 10 minutos después de la aplicación de TPA, a los grupos tratados se les aplicó 20 μ L de los extractos en ambas caras de la oreja derecha a las dosis de 1.0 μ mol/oreja disueltos diclometano (Fig. 6b) y en la oreja izquierda sólo se aplicó 20 μ L del vehículo respectivamente. Se dejaron 4h de post-aplicación (Fig. 6c) y eventualmente cada grupo de animales fue sacrificado por dislocación cervical tomando biopsias de cada oreja con un sacabocados de 7 mm de diámetro. Cada una de las orejas control y tratadas fueron depositadas en tubos de eppendorff previamente pesados. Se obtuvieron las diferencias de pesos entre la oreja control y la tratada de cada animal. El porcentaje de inhibición fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - [(x \text{ tratado} / x \text{ control}) 100]$$



Figuras 6. Modelo 13-acetato de 12-*O*-tetradecailforbol (TPA) en oreja de ratón.

- a. Aplicación de PBS (pentobarbital sódico)
- b. Aplicación de TPA (13-acetato de 12-*O*-tetradecainoilforbol).
- c. Edema en oreja de ratón.

Análisis estadístico: los resultados se analizaron mediante una prueba de *t* de student y una prueba de Dunnet, utilizando el programa Sigma-stat (2.0). El nivel de significancia en todos los análisis fue de $p < 0.05$.

X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 RENDIMIENTO

10.1.1 Rendimiento de los extractos

Los extractos se obtuvieron por maceración sucesiva con disolventes de diferente polaridad, en el cuadro 3 se muestra la cantidad de extracto orgánico obtenido y los resultados del rendimiento, el cual se calculó como un porcentaje del total del material vegetal inicial (416 g).

EXTRACTO	Cantidad obtenida (g)	RENDIMIENTO (%)
HEXÁNICO	3	0.7211
ACETATO DE ETILO	3.5	0.8413
METANÓLICO	26.3	6.3221

Cuadro 3. Rendimiento de los extractos orgánicos de semillas de *Casimiroa greggii*.

10.2 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS

10.2.1 EXTRACTO HEXÁNICO

Se separaron 3 g de extracto hexánico, por medio de cromatografía en columna abierta, empleando disolventes de polaridad creciente. Se colectaron un total de 95 fracciones de 250 mL cada una (Cuadro 4).

Número de fracción	Disolvente	proporción (%)
1-11	hexano	100
12-30	Hexano-AcOEt	9:1
31-51	Hexano-AcOEt	8:2
52-62	Hexano-AcOEt	7:3
63-72	Hexano-AcOEt	1:1
73-77	AcOEt-Hexano	7:3
78-81	AcOEt	100
82-87	AcOEt-Metanol	1:1
88-95	Metanol	100

Cuadro 4. Fracciones obtenidas del extracto hexánico de semillas de *Casimiroa greggii*

La cromatografía del extracto hexánico permitió el aislamiento de cuatro compuestos: β -sitosterol [1] el cual se aisló de la fracción 16 (espectros 1 y 2 del anexo). Por otro lado, de las fracciones 39-41 y 56 se aislaron dos flavonas identificadas como 5,2' dimetoxiflavona [2], la cual se aísla por primera vez para el género (espectros 3 y 4 del anexo), y zapotina [3] (cuadro 11 del anexo) respectivamente, Por ultimo se aisló de la fracción 65 un alcaloide identificado como casimiroina [4] (espectro 5 y 6 del anexo) (Figura 7).

La caracterización química de todos los compuestos, se realizó por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas (RMN ^1H ; ^{13}C , EM, IR), con las descritas en la literatura (Meyer *et al.*, 1985; Ito *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 2003).

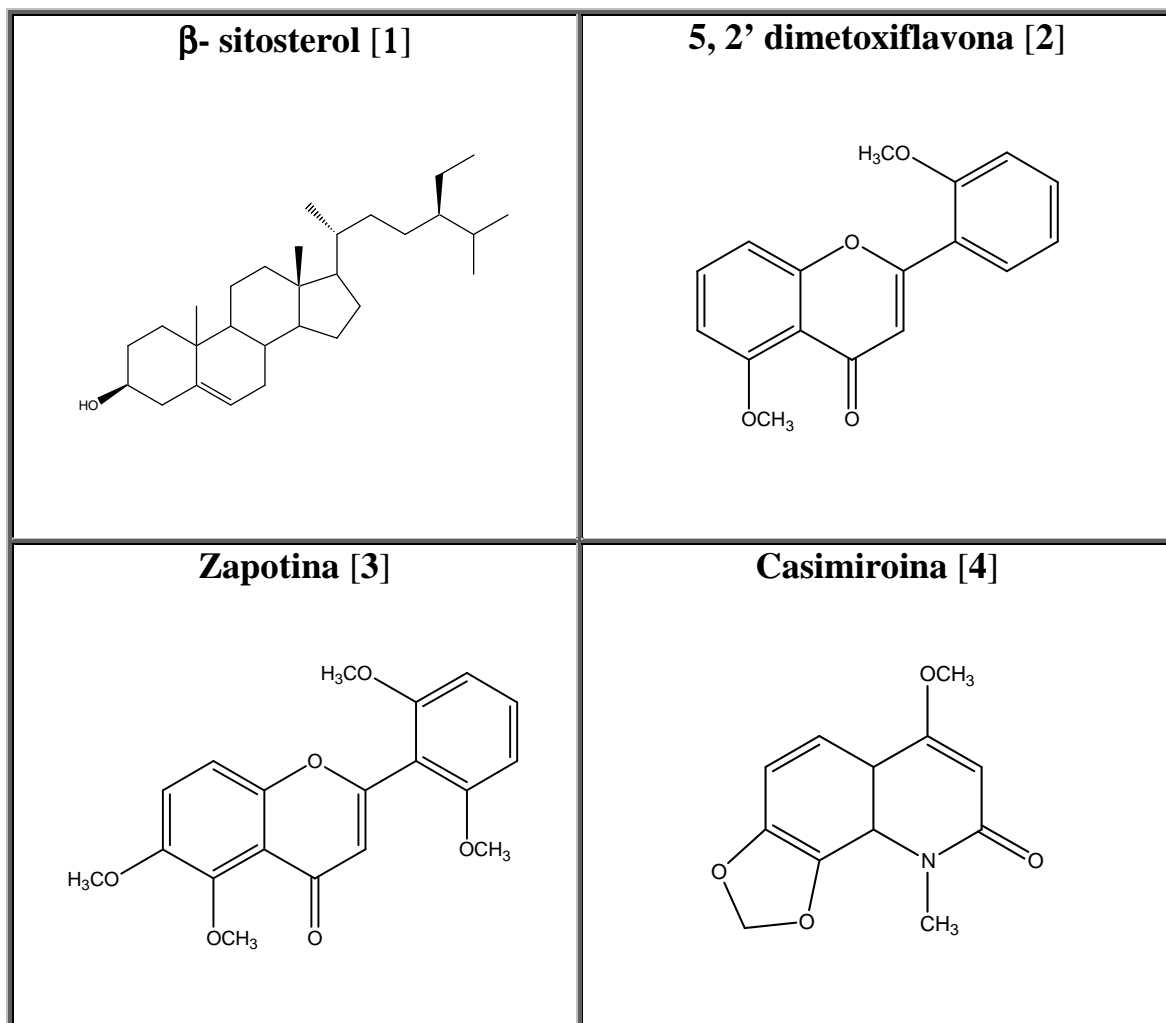


Figura 7. Estructuras química de los compuestos aislados del extracto hexánico de semillas de *C. greggii*.

10.2.2 EXTRACTO ACETATO DE ETILO

La separación de los componentes del extracto de AcOEt, se realizó por medio de cromatografía en columna abierta, fueron separados 3.5 g de extracto, se colectaron un total de 142 fracciones de 250 mL cada una (Cuadro 5).

Número de fracción	Disolvente	proporción (%)
1-5	Hexáno	100
6-11	Hexáno-AcOEt	9:1
12-17	Hexáno-AcOEt	8:2
18-33	Hexáno-AcOEt	7:3
34-40	Hexáno-AcOEt	6:4
41-51	Hexáno-AcOEt	1:1
52-68	AcOEt-Hexáno	6:4
69-84	AcOEt-Hexáno	7:3
85-98	AcOEt	100
99-108	AcOEt-Metanol	9:1
109-118	AcOEt-Metanol	7:3
119-126	AcOEt-Metanol	6:4
127-131	AcOEt-Metanol	1:1
132-142	Metanol	100

Cuadro 5. Fracciones obtenidas del extracto de AcOEt de semillas de *Casimiroa greggii*

De este extracto se aislaron 2 flavonas: 6,7 dimetoxiflavona [5] aislada de la fracción 13, (espectro 7 del anexo) (figura 8) la cual se reporta por primera vez para el género. La segunda flavona fue identificada por medio de rayos X como zapotina [3] aislada de la fracción 17 (cuadro 11, Rayos X 1, espectro 3 del anexo) (figura 7).

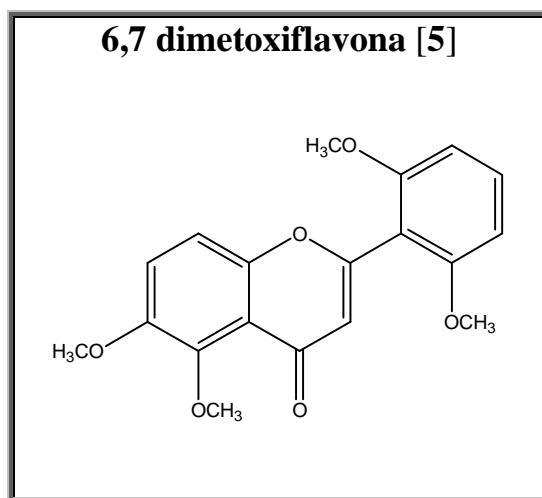


Figura 8. Estructura química de 6,7 dimetoxiflavona, aislada del extracto de AcOEt de semillas de *Casimiroa greggii*.

10.2.3 EXTRACTO METANÓLICO

La cromatografía en columna abierta del extracto metanólico se realizó empleando 26.3 g de extracto, permitiendo así el aislamiento de 4 compuestos, tres flavonas y un carbohidrato: 5,6,2' trimetoxiflavona [6], aislada de la fracción 46-54 (espectro 8 y 9 del anexo). La zapotina [3], fue aislada de la fracción 51-54, (cuadro 11 y Rayos X 1 del anexo). La última de las flavonas fue identificada por medio de rayos X como 5,6 dimetoxiflavona [7] aislada de la fracción 34 (Cuadro 12 y Rayos X 2 del anexo). Por último, de la fracción 155 se aisló sacarosa [8] (espectro 10 del anexo). (Cuadro 6 y Figura 9).

Número de fracción	Disolvente	proporción (%)
1-3	Hexáno	100
4-24	Hexáno-AcOEt	9:1
25-66	Hexáno-AcOEt	8:2
67-78	Hexáno-AcOEt	7:3
79-109	Hexáno-AcOEt	6:4
110-133	Hexáno-AcOEt	1:1
134-144	AcOEt-Hexáno	7:3
145-155	AcOEt	100
156-167	AcOEt-MeOH	1:1
168-172	MeOH	100

Cuadro 6. Fracciones obtenidas del extracto metanólico de semillas de *Casimiroa greggii*

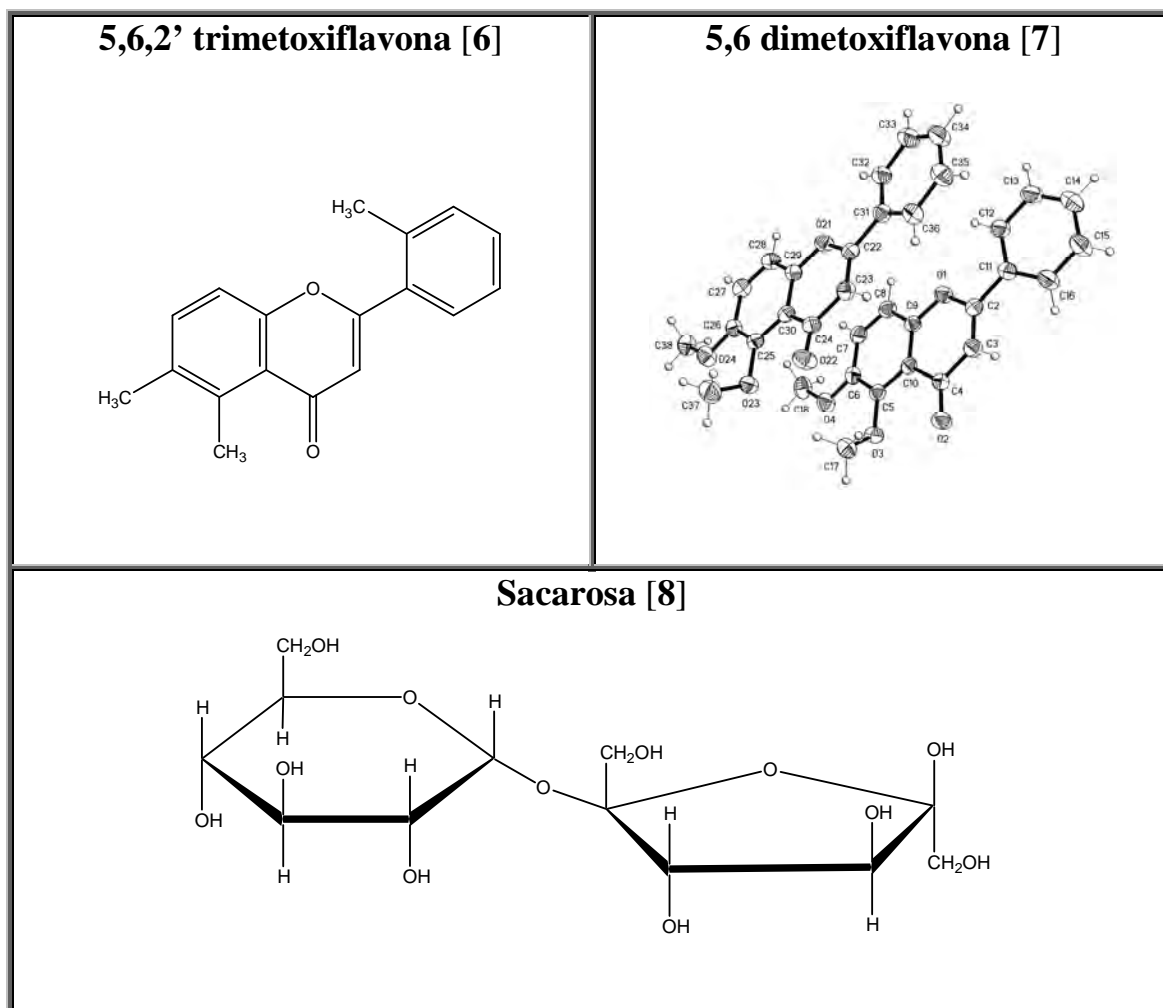


Figura 9. Compuestos aislados del extracto metanólico de semillas de *Casimiroa greggii*.

Como se esperaba se aislaron flavonas y alcaloides que son los tipos de compuestos que caracterizan al género y que incluso se han utilizado como marcadores quimiotaxonómicos (García-Argaez *et al.*, 2005). Entre los compuestos aislados esta el β -sitosterol, el cual es un esteroil ampliamente distribuido en el reino vegetal (Bittner *et al.*, 2001; Perera *et al.*, 2006).

La zapotina se ha aislado de otras especies del género *Casimiroa* como son *C. edulis* (de fruto, corteza, semilla y raíz), (Iriarte *et al.*, 1956; Kincl *et al.*, 1956; Sondhermer y Meisels, 1960; Garrat, 1967; Dreyer, 1967; Dreyer, 1968; Ito *et al.*, 1998), de semillas de *C. pubescens* (García-Argaez *et al.*, 2005), de hojas de *C. tetrameria* (Heneka *et al.*, 2005) y de raíces de *C. greggii* (Meyer *et al.*, 1985).

La casimiroina se ha aislado también de fruto, semilla, hoja y raíz de *C. edulis*, (Power, 1911; Iriarte *et al.*, 1956; Kincl *et al.*, 1956; Dreyer, 1968; Rizvi *et al.*, 1985; Ito *et al.*, 1998), de raíces de *C. greggii* (Meyer *et al.*, 1985) y de semillas de *C. pubescens* (García-Argaez *et al.*, 2005).

La 5,6 dimetoxiflavona se ha encontrado en fruto, corteza y raíz de *C. edulis* (Iriarte *et al.*, 1956; Garrat, 1967), en frutos y hojas de *C. greggii* (Domínguez *et al.*, 1972), y en partes aéreas de *C. pringlei* (Castellanos, 1998).

La 5,6,2' trimetoxiflavona se ha aislado de fruto, corteza, semillas y raíces de *C. edulis* (Sondhermer y Meisels, 1960; Garrat, 1967; Dreyer, 1968; Ito *et al.*, 1998;), y de raíces de *C. greggii* (Meyer *et al.*, 1985).

Las flavonas 5,2' dimetoxiflavona y 6,7 dimetoxiflavona se aíslan por primera vez en el género, resaltando también que la segunda, se aísla por primera vez de una fuente natural.

10.3 RENDIMIENTO COMPUESTOS PUROS

El rendimiento de los compuestos aislados se cuantificó como un porcentaje del total del extracto obtenido (hexano 3 g, acetato de etilo 3.5 g y metanol 26.3 g). Del extracto metanólico se obtuvo un mayor rendimiento; sin embargo, esto no se vio reflejado en el rendimiento de los compuestos puros obtenidos a partir de éste, ya que, como se puede observar en el cuadro 7 el rendimiento por ejemplo de zapotina es menor que en los extractos de hexano y acetato de etilo.

Extracto	Compuesto	mg	Rendimiento (%)
HEXÁNICO	β -sitosterol	9.6	0.32
	zapotina	7.7	0.2567
	casimiroína	9.5	0.3167
ACETATO DE ETILO	5,2' trimetoxiflavona	7.2	0.2404
	6,7 dimetoxiflavona	3.7	0.1057
	zapotina	20.4	0.5828
METANOL	5,6,2' trimetoxiflavona	8.5	0.0323
	zapotina	11.7	0.0444
	5,6 dimetoxiflavona	1.1	0.0041
	sacarosa	3112.1	11.8330

Cuadro 7. Rendimiento de los compuestos puros de los extractos orgánicos de semillas de *Casimiroa greggii*

Como bien se sabe, los frutos pertenecientes a este género, son frutos comestibles y de un sabor dulce, lo que nos indica la presencia, de una gran cantidad de azúcares entre otros componentes, esto se ve reflejado en la cantidad de sacarosa obtenida.

10.4 PRUEBAS BIOLÓGICAS

10.4.1 Actividad citotóxica de los extractos

La evaluación de la actividad citotóxica de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanol, se realizó mediante el ensayo de SRB. Los resultados mostraron que los tres extractos fueron activos, inhibiendo el crecimiento celular en 6 líneas de cáncer humano a una concentración de 50 μ g (Cuadro 7).

Línea celular	Inhibición del crecimiento celular (%)		
	Extracto		
	Hexano	Acetato de etilo	Metanol
Cáncer de SNC (U251)	100	46.2	100
Cáncer de próstata (PC-3)	100	54.3	100
Leucemia (K-562)	100	81.9	80.29
Cáncer de colon (HCT-15)	100	63.3	89.88
Cáncer de mama (MCF-7)	100	81.2	67.75
Cáncer de pulmón (SKUL)	100	53.6	100

Cuadro 7. Actividad citotóxica de los extractos orgánicos de semillas de *Casimiroa greggii*.

En el cuadro 8, se observa que el extracto hexánico mostró ser el más activo exhibiendo un 100% de inhibición del crecimiento celular en todas la líneas evaluadas, β -sitosterol y zapotina son dos MS aislados de dicho extracto, los cuales poseen probada actividad citotóxica (Nguyen *et al.*, 2004; Keng-Chia *et al.*, 2003; Ian-Lih *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 1998; Murillo *et al.*, 2007; Maiti *et al.*, 2007; Mata-Greenwood *et al.*, 2001), por lo que es probable que la actividad citotóxica se deba a la presencia de estos compuestos. Por otra parte también casimiroina podría estar contribuyendo a la actividad citotóxica del extracto ya que como compuesto puro fue citotóxico (Cuadro 9).

El extracto de acetato de etilo fue activo aunque en menor proporción que el extracto hexánico; se observó que las líneas de leucemia (k-562) y mama (MCF-7) fueron más susceptibles, resultado que se puede atribuir a la presencia de zapotina, uno de los compuestos aislados de este extracto y que como compuesto puro mostró ser citotóxico (Cuadro 9).

En lo que corresponde al extracto metanólico este también fue activo en todas las líneas evaluadas siendo las mas susceptibles las de SNC (U251), próstata (PC-3) y cáncer de pulmón (SKUL). La actividad de este extracto se pude atribuir a la presencia de 5,6,2' trimetoxiflavona y zapotina, los cuales mostraron actividad citotóxica (Cuadro 8).

10.4.2 Evaluación citotóxica de los compuestos puros

Debido al bajo rendimiento de los compuestos (menor a 10 mg en la mayoría de los casos), únicamente se evaluó la actividad citotóxica de cuatro de los MS obtenidos: 5,6,2' trimetoxiflavona, casimiroina, 6,7 dimetoxiflavona y zapotina.

La 5,6,2' trimetoxiflavona aislada del extracto metanólico, resultó ser activa en 6 líneas de cáncer humano, siendo más susceptibles U251, HCT-15, MCF-7 y SKUL presentando un 100% de inhibición del crecimiento celular en dichas líneas, siendo así el compuesto de mayor actividad de los compuestos evaluados. Por otro lado casimiroína, aislada del extracto hexánico fue activa en 6 líneas de cáncer humano, donde las líneas celulares más susceptibles fueron MCF-7, HCT-15 y PC-3.

La flavona 6,7, dimetoxiflavona, aislada del extracto de acetato de etilo, no presentó actividad en ninguna de las líneas de cáncer humano evaluadas y por ultimo zapotina aislada de los tres extractos resultó ser activa en las 6 líneas evaluadas siendo las más sensibles las líneas K-562 y PC-3 (Cuadro 8).

Inhibición del crecimiento celular (%)				
Compuesto	5,6,2' trimetoxiflavona	6,7 dimetoxiflavona	casimiroina	zapotina
Línea celular				
Cáncer de SNC (U251)	100	0	83.7	78.25
Cáncer de próstata (PC-3)	93	0	95	80.85

Leucemia (K-562)	85.99	0	79.3	89.9
Cáncer de colon (HCT- 15)	100	0	96.5	76.5
Cáncer de mama (MCF-7)	100	0	100	72.64
Cáncer de pulmón (SKUL)	100	0	93.4	78.71

Cuadro 8. Actividad citotóxica de 4 de los MS de los extractos orgánicos de semillas de *Casimiroa greggii* sobre 6 líneas de cáncer humano.

Sin considerar a la 6,7 dimetoxiflavona; la cual no presentó actividad en ninguna de las líneas celulares, zapotina fue el MS de menor actividad citotóxica, seguida de casimiroina y finalmente el compuesto más activo fue la 5,6,2' trimetoxiflavona.

De acuerdo con los resultados se observó una correlación directa entre la actividad citotóxica y la diversidad de metabolitos presentes en el extracto, es decir en el extracto hexánico que fue el más activo están presentes tres metabolitos con probada actividad citotóxica: β -sitosterol, casimiroina y zapotina; en el extracto metanólico están presentes sólo dos compuestos con dicha actividad: 5,6,2' trimetoxiflavona y zapotina; mientras que el extracto de acetato de etilo únicamente se encuentra uno: zapotina. Lo anterior indica que la potencia de la actividad muy probablemente se debe a un efecto sinérgico.

10.5 Actividad antiinflamatoria de los extractos

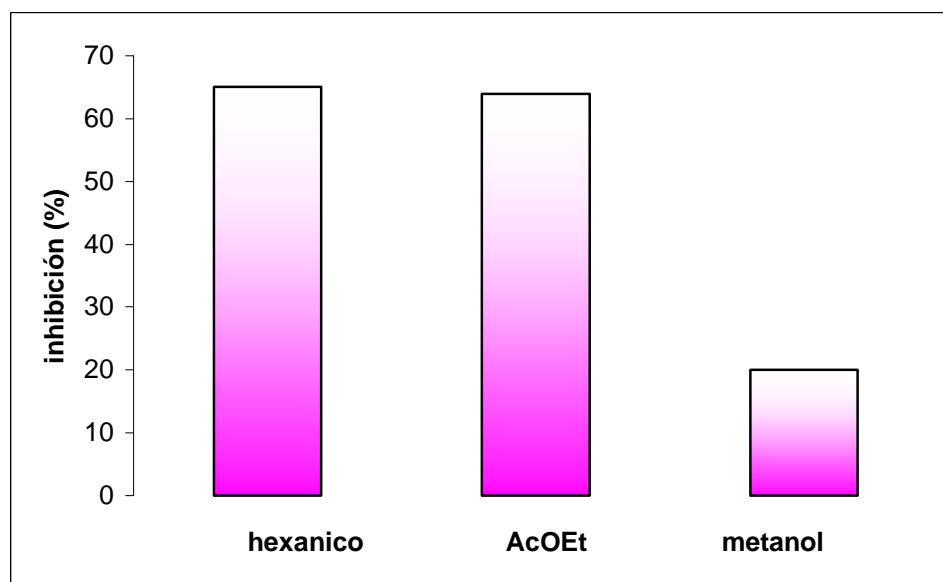
En el modelo de actividad antiinflamatoria de edema inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecainoil forbol) en oreja de ratón, a la dosis de 1 mg/oreja (n=3), los extractos hexánico y acetato de etilo mostraron actividad sin embargo, el extracto metanólico fue inactivo, como se muestra en el cuadro 9.

Extracto	Inhibición del edema (%)
Hexánico	65.08
Acetato de etilo	64.19
Metanólico	20

Cuadro 9. Actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos de semillas de *Casimiroa greggii* en el modelo de TPA en oreja de ratón.

Como se observa en el cuadro 9 la actividad antiinflamatoria fue mayor en los extractos de hexano y acetato de etilo. La actividad del extracto hexánico puede deberse probablemente a la presencia de β -sitosterol, compuesto de actividad antiinflamatoria ya probada (Bulawa y Flemin, 2008; Wang *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2004).

Cabe señalar que para determinar que metabolitos son los responsables de la actividad biológica del extracto de acetato de etilo, es necesario evaluar los compuestos puros.



Grafica 1. Porcentaje de inhibición del edema de los extractos orgánicos de semillas de *Casimiroa greggii*. Los datos que se muestran son la media \pm el error estándar (n=3).

XI. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados se puede concluir que:

- ☞ Los extractos orgánicos de semillas de *Casimiroa greggii* presentan metabolitos secundarios característicos del género.
- ☞ En el extracto hexánico β -sitosterol, casimiroina, 5,2'-dimetoxiflavona y zapotina fueron los MS mayoritarios.
- ☞ En el extracto de AcOEt los MS mayoritarios fueron 5,6 dimetoxiflavona y zapotina.
- ☞ En el extracto metanólico los MS mayoritarios fueron 5,6,2' trimetoxiflavona, 5,6 dimetoxiflavona, zapotina y sacarosa.
- ☞ Se informa por primera vez para el género la presencia de 5,2' dimetoxiflavona y 6,7 dimetoxiflavona.
- ☞ La 6,7 dimetoxiflavona se aísla por primera vez de una fuente natural.
- ☞ Los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de semillas de *Casimiroa greggii* poseen actividad citotóxica en 6 líneas de cáncer humano.
- ☞ La flavona 5,6,2' trimetoxiflavona, zapotina y casimiroina poseen actividad citotóxica en 6 líneas de cáncer humano.
- ☞ Los extractos hexánico y de acetato de etilo poseen actividad antiinflamatoria.

[Escribir texto]

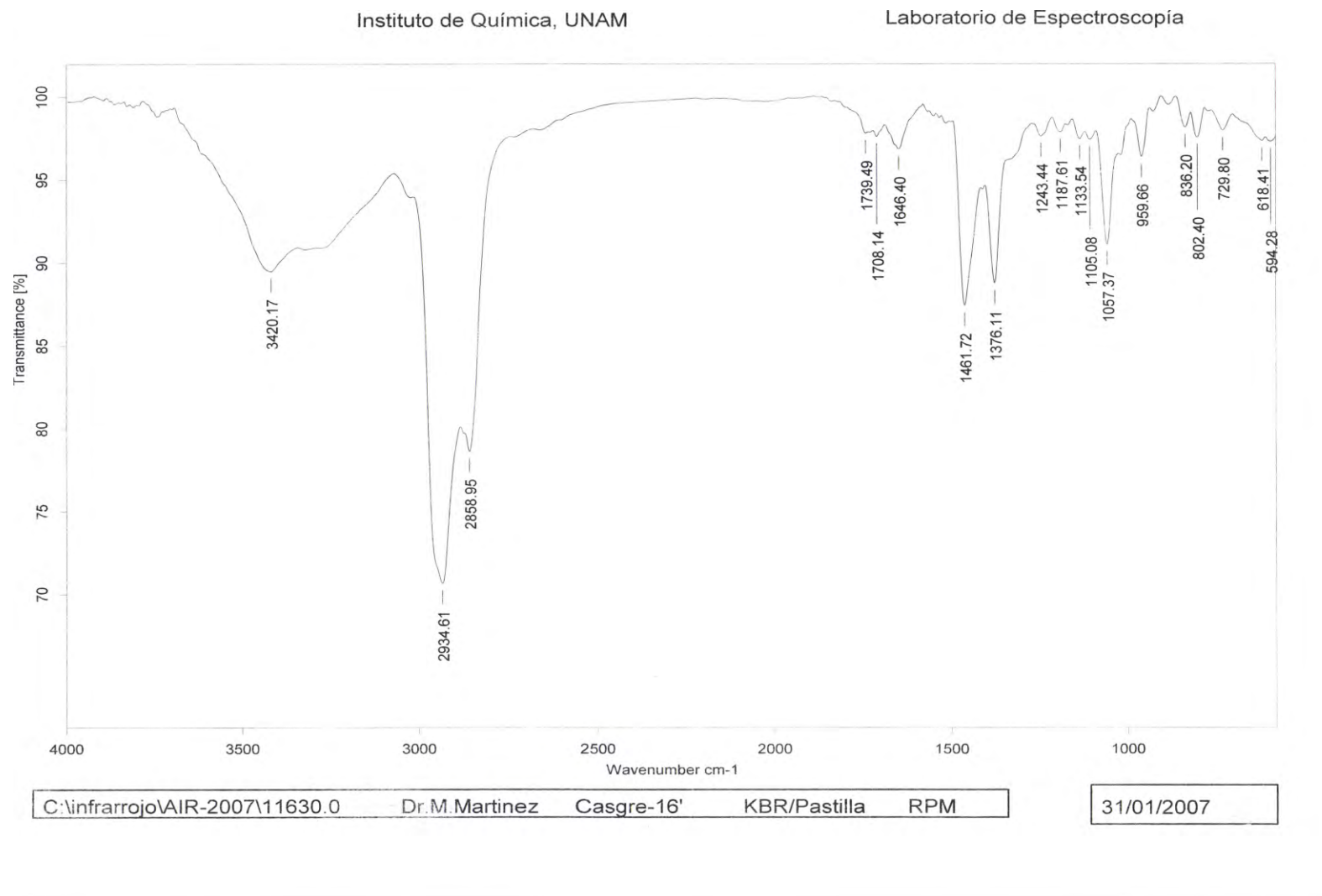
XII. PERSPECTIVAS

Es importante continuar con el estudio de semillas de *Casimiroa greggii*, debido a que son escasos los estudios de esta especie y de esta estructura en particular.

Resultaría importante evaluar la actividad citotóxica de 5,2' dimetoxiflavona la cual es aislada por primera vez para el género. Así como también evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados en este estudio.

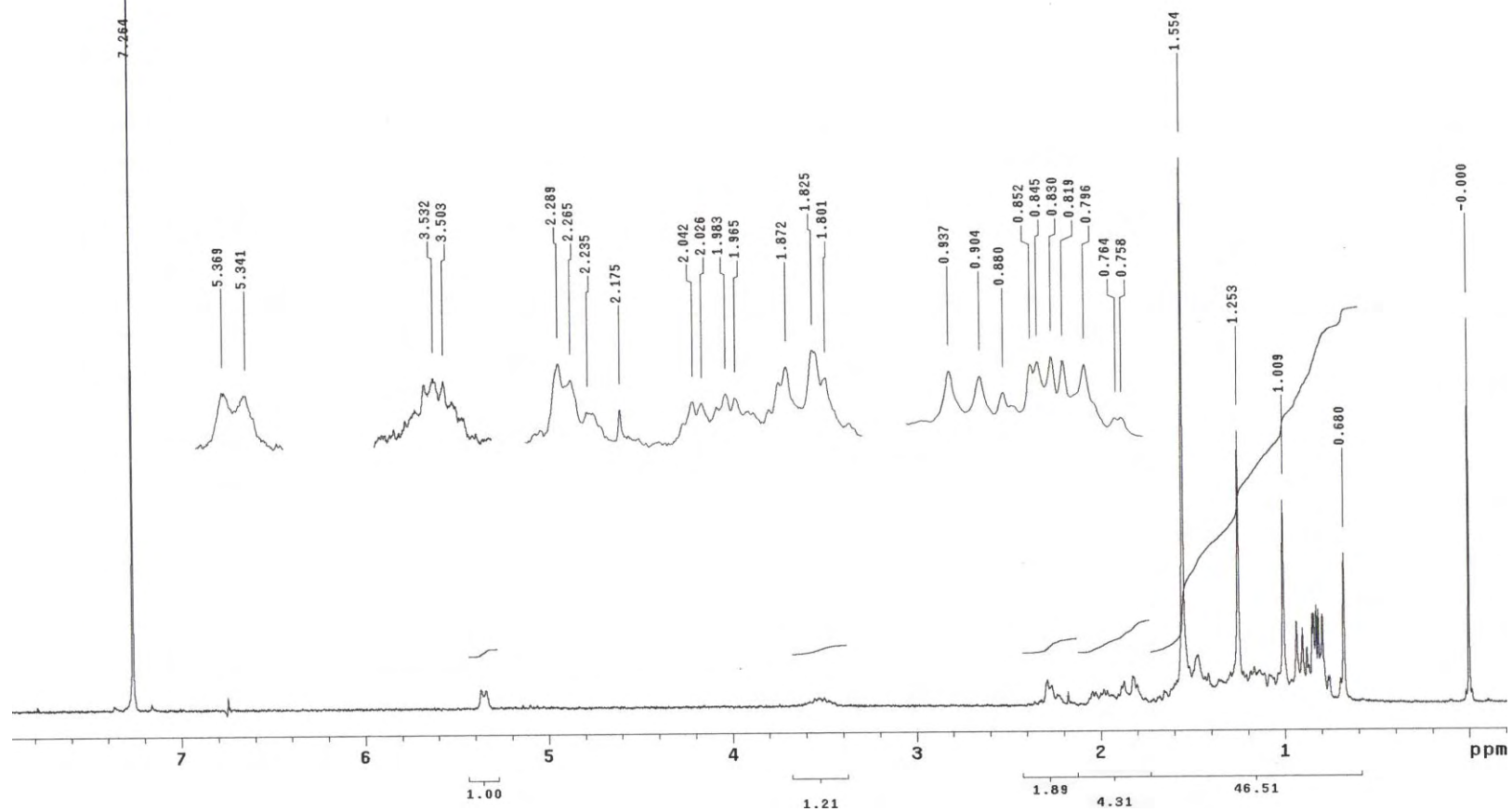
XIII. ANEXO

13.1 ESPECTROS



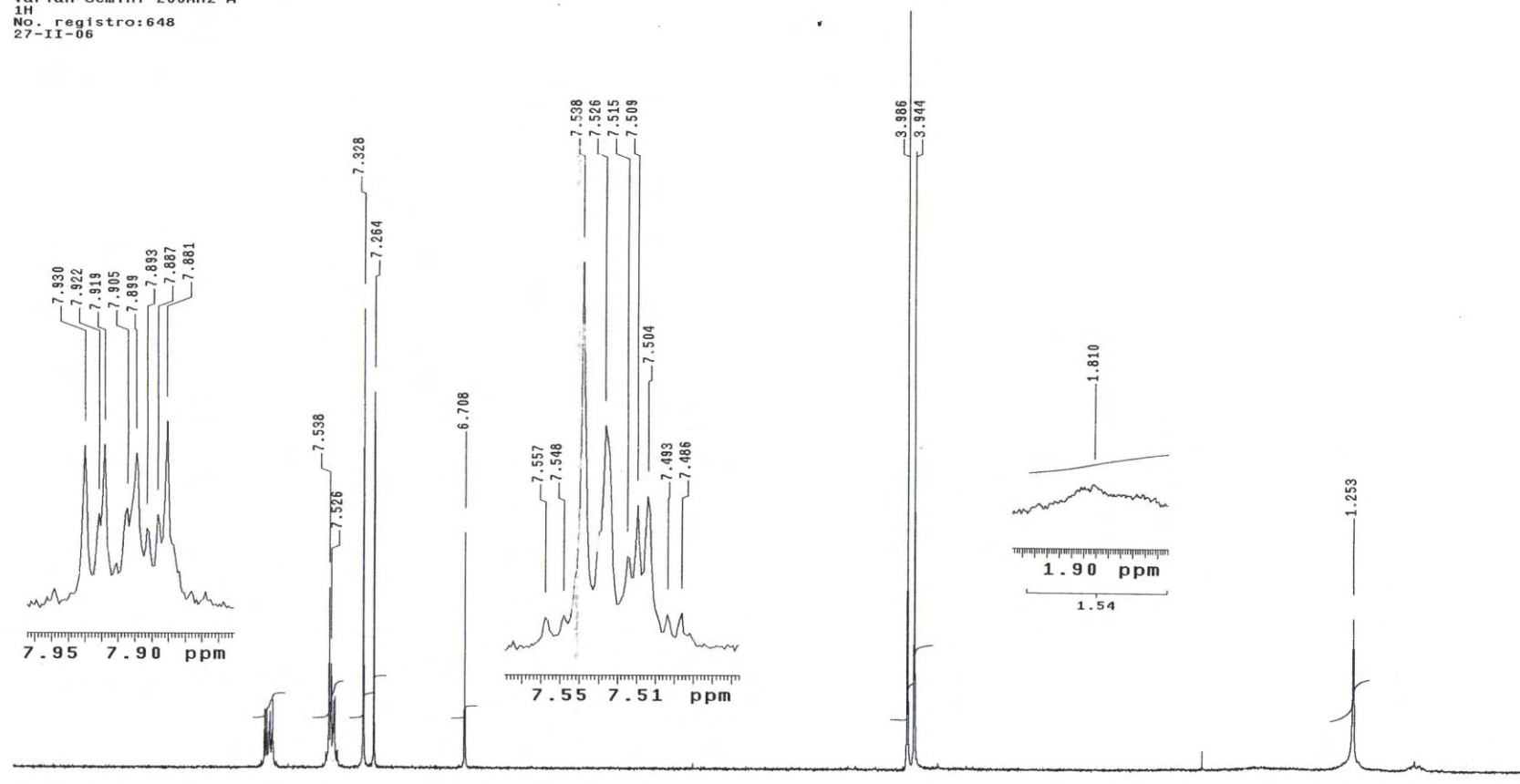
Espectro 1. IR de β -sitosterol

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/ EHS
Dr. Mariano Martínez/Angelica S.
Clave: Casgre-16
Disolvente: CDCl₃
Hidrogeno-1
Gemini 200 MHZ (B)
30-I-07
No. de registro: 0234



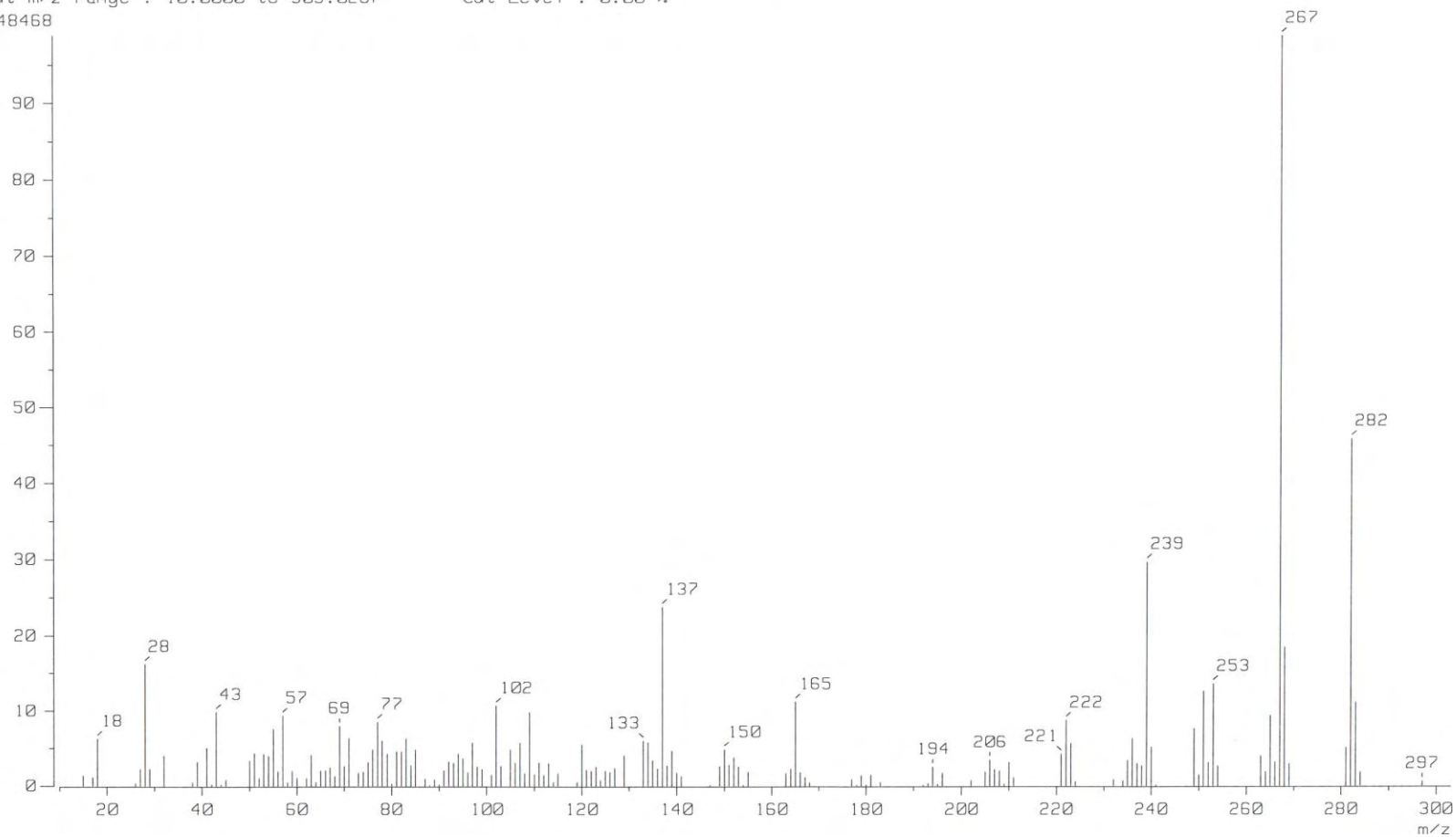
Espectro 2. RMN ¹H de β-sitosterol

Instituto de Química UNAM N2
Dr. Mariano Mtz./Angelica S.
Clave: CF-39-4C
DC13
Varian-Gemini 200MHz-A
1H
No. registro:648
27-II-06



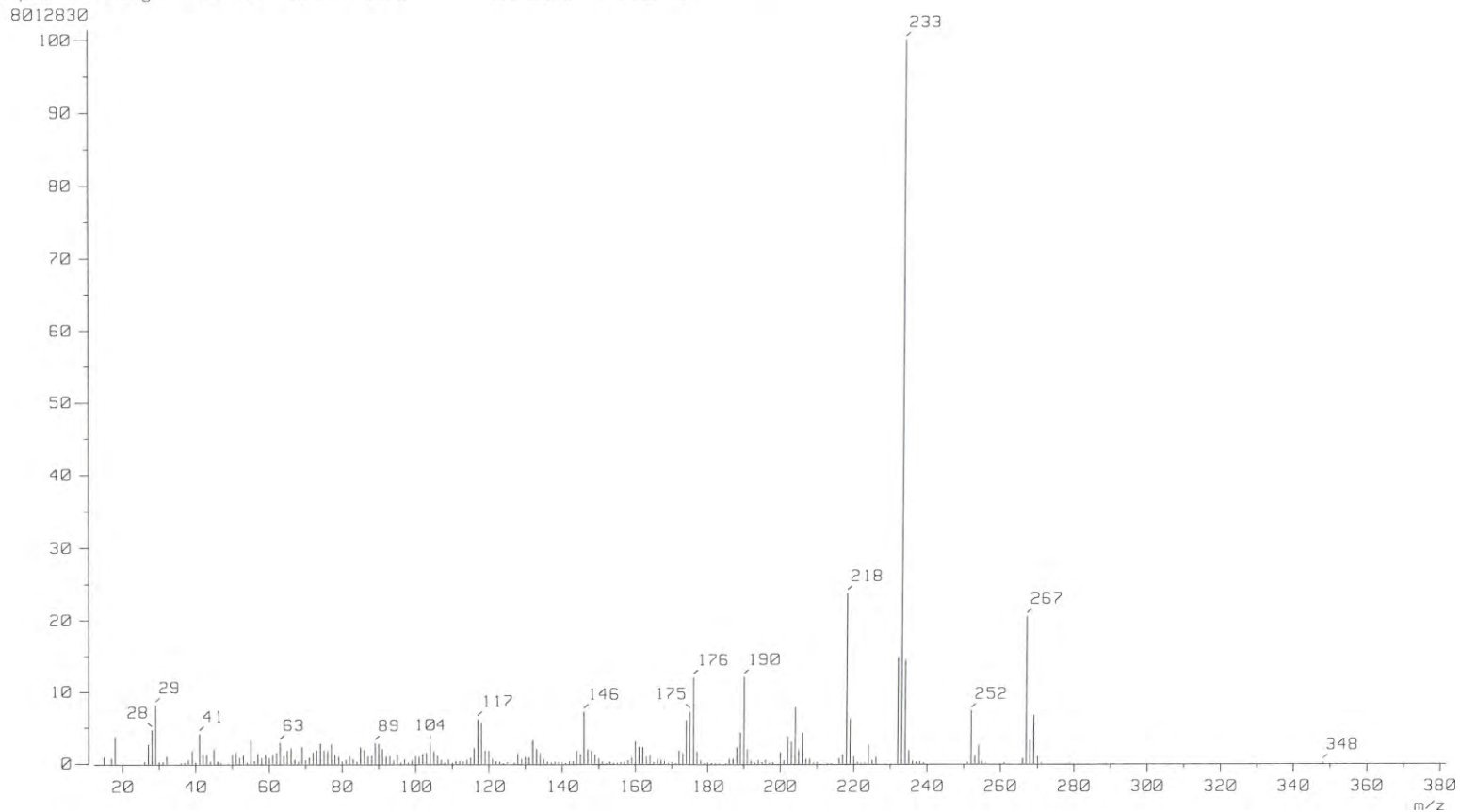
Espectro 3. RMN ^1H de 5,2' dimetoxiflavona

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Martinez-Mariano-011 Date : 12-Feb-108 18:22
Sample: 253 M225 cosgrex-39-41 JeolRXC505HA
Note : Javier-Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 0.52 min Scan# : (8,20) Temp : 248.9 deg.C
BP : m/z 267.0000 Int. : 139.75
Output m/z range : 10.0000 to 303.0267 Cut Level : 0.00 %
1448468

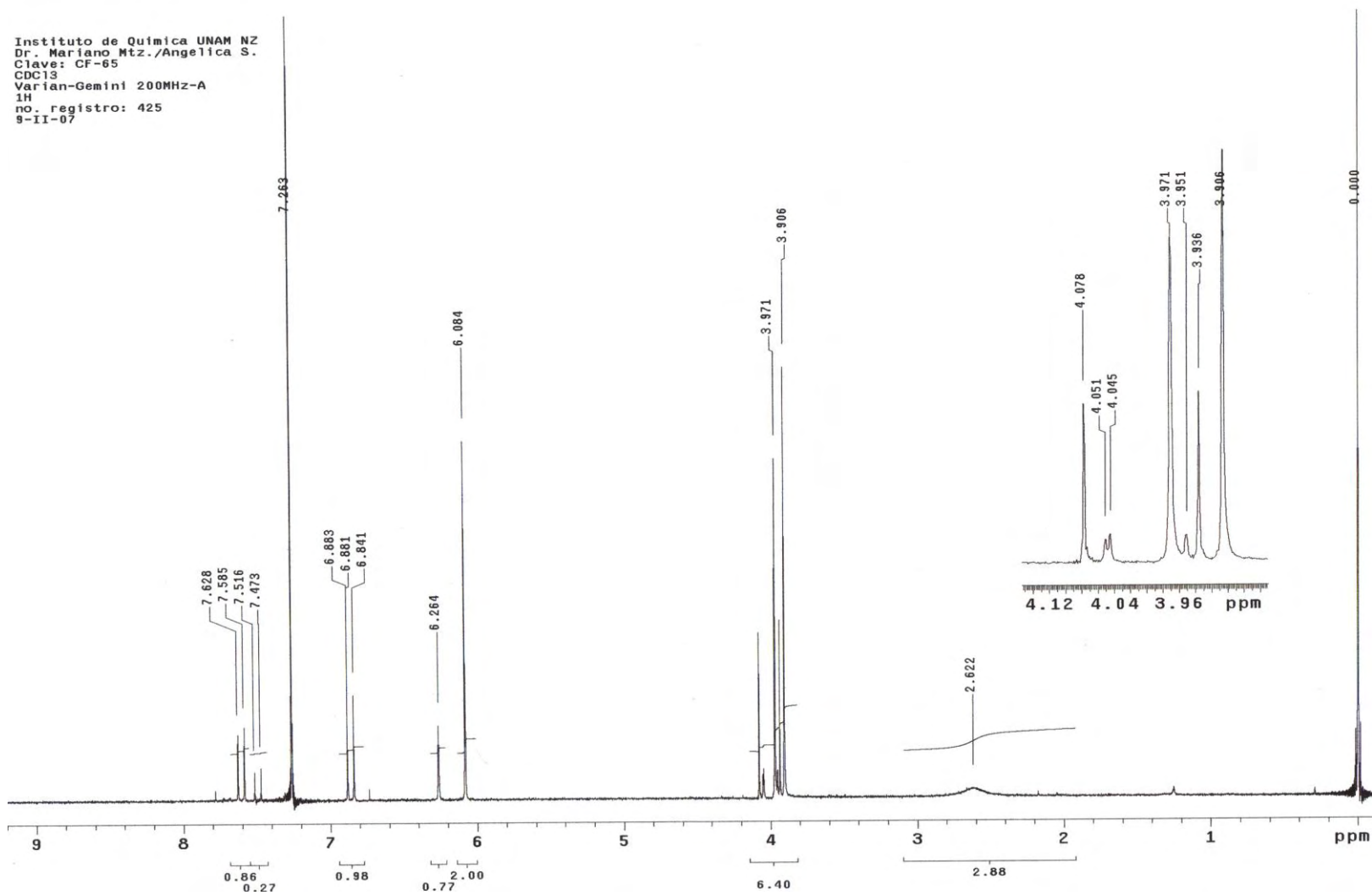


Espectro 4. EM de 5,2' dimetoxiflavona

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Martinez-Mariano-067 Date : 06-Feb-108 11:15
Sample: 210 M224 casgrehex-65 JeolAX505HA
Note : Javier-Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 0.28 min Scan# : (6,11) Temp : 270.4 deg.C
BP : m/z 233.0000 Int. : 753.28
Output m/z range : 12.3442 to 381.5579 Cut Level : 0.00 %



Espectro 5. EM de Casimiroina

Espectro 6. RMN ^1H de Casimiroina

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM / EHS

Dr. Mariano Martinez/ Angélica S.

Clave: CasgreAcOet-13

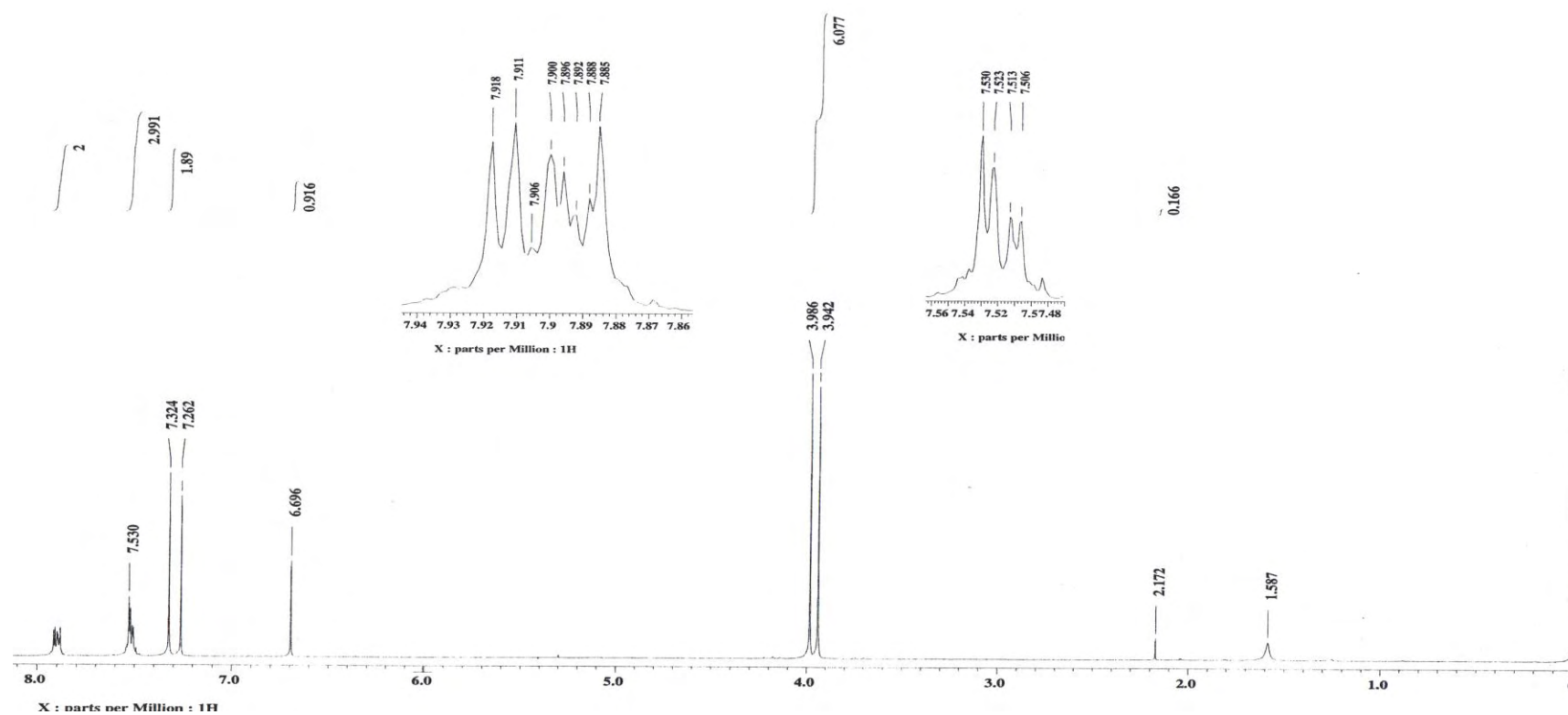
Disolvente: CDCl₃

Hidrogeno-1

Eclipse 300 MHz Jeol (E)

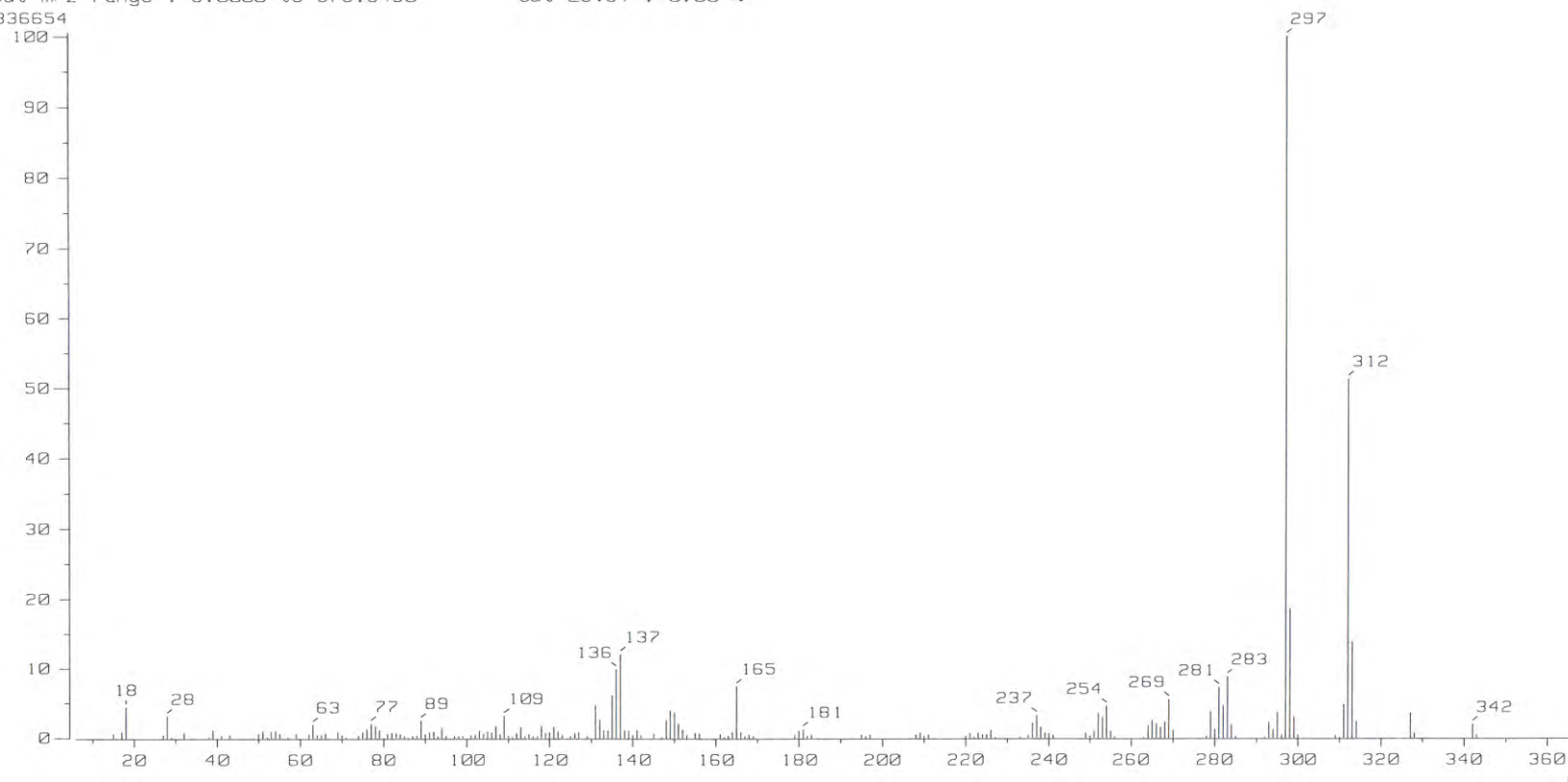
11-02-08

No. de registro: 0489



Espectro 7. RMN ¹H de 6,7 dimetoxiflavona

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Martinez-Mariano-008 Date : 10-Jan-108 14:06
Sample: 19 M223 Casgre46-54met JeolAX505HA
Note : Javier-Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 0.41 min Scan# : (10,13) Temp : 226.3 deg.C
BP : m/z 297.0000 Int. : 743.07
Output m/z range : 6.0000 to 373.5490 Cut Level : 0.00 %



Espectro 8. EM de 5,6,2' trimetoxiflavona

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM / EHS

Dr. Mariano Martinez/Angelica S.

Clave: casgremet46-54*

Disolvente: CDCl₃

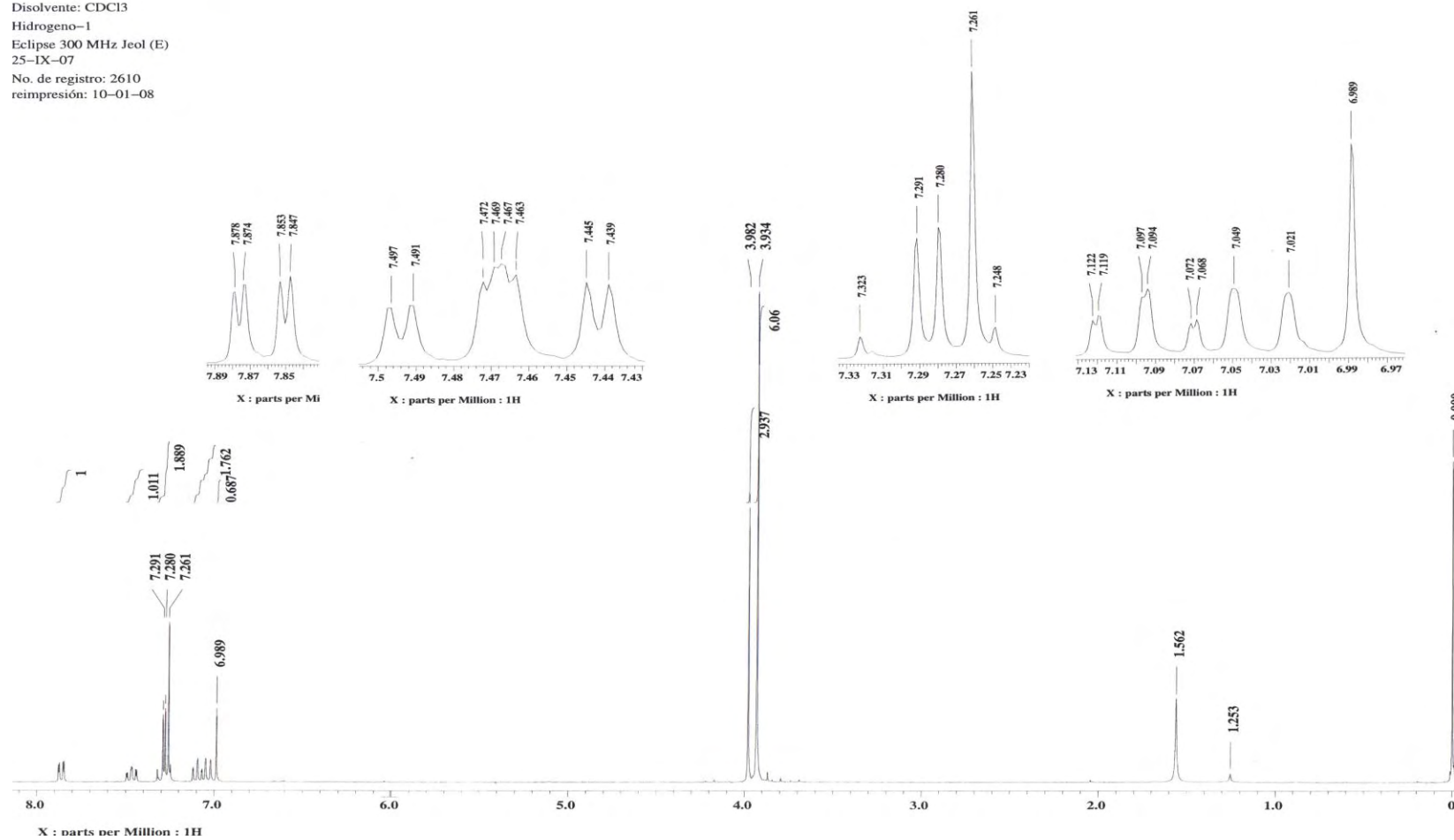
Hidrogeno-1

Eclipse 300 MHz Jeol (E)

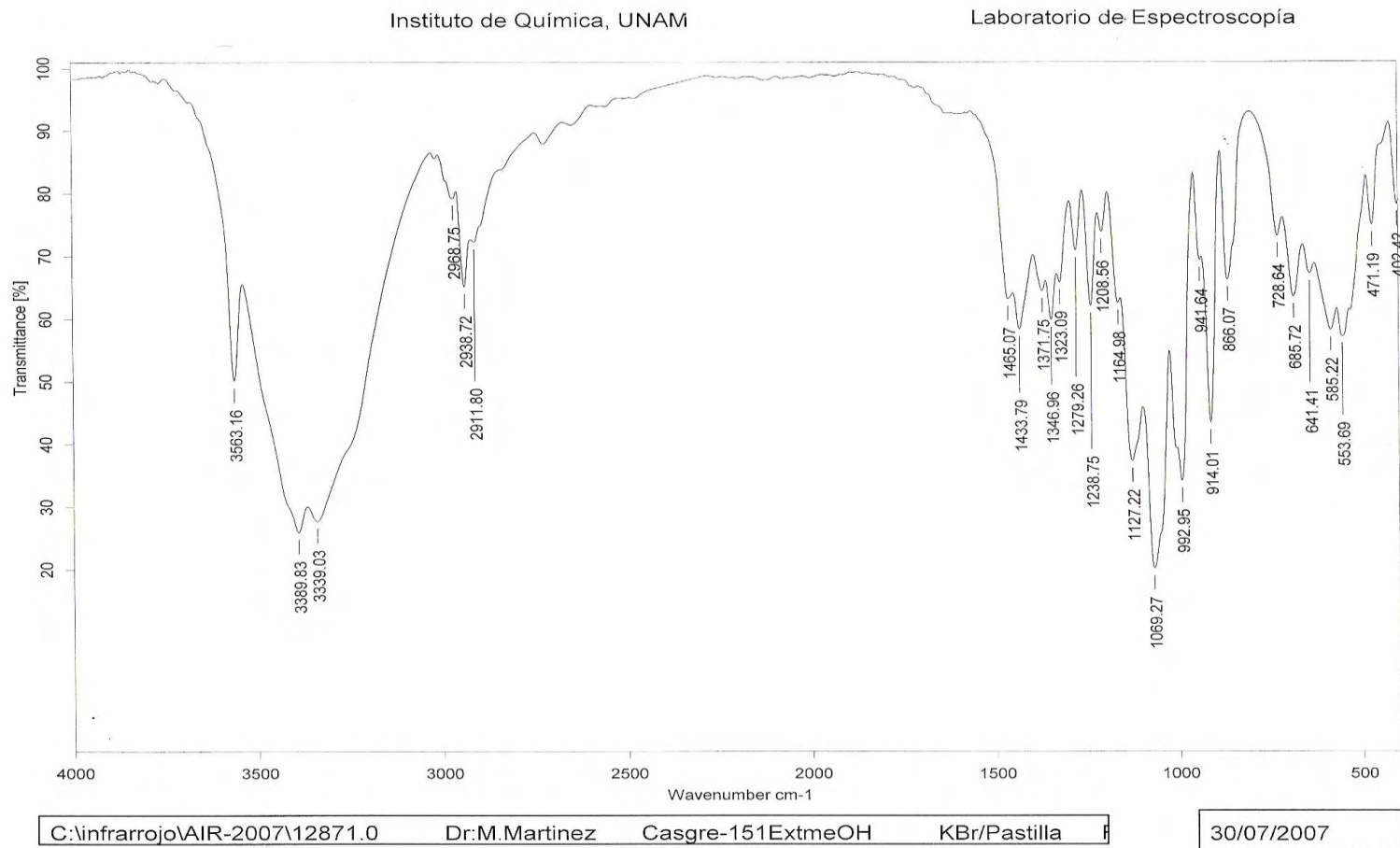
25-IX-07

No. de registro: 2610

reimpresión: 10-01-08



Espectro 9. RMN ¹H 5,6,2' trimetoxiflavona



Espectro 10. sacarosa

***13.2 PROPIEDADES
FÍSICAS Y
ESPECTROSCOPICAS DE
LOS COMPUESTOS
PUROS***

10.2 PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DE LOS COMPUESTOS PUROS

(1) β -sitosterol:

$C_{29}H_{50}O$, sólido blanco (9.6 mg), P.M: 414, p.f.: 132-135 °C

IR (KBr) 3420, 2934, 2858, 1646, 1461, 1376, 1057, 959, 802 cm^{-1}

RMN 1H (200Mz, $CDCl_3$, TMS): δ 0.68 (3H,s, CH_3 18), 0.81 (3H,d, J = 7.0 Hz, CH_3 27), 0.84 (3H,d, J = 7.0 Hz, CH_3 26), 0.85 (3H,t, J = 7.0 Hz, CH_3 29), 0.93 (3H,d, J = 6.6 Hz, CH_3 21), 1.09 (3H, s, CH_3 19), 3.53 (1H, m, H - 3a), 5.36 (1H,d br, J = 5.3 Hz, H 6) ppm.

(2) 5, 2' dimetoxiflavona:

$C_{17}H_{14}O_4$, sólido blanco (7.2 mg), P.M: 282, p.f.: 185-190 °C

EM m/z 282, 267, 239.

RMN 1H (200Mz, $CDCl_3$, TMS): δ 7.9 (2H), 7.5 (3H, m), 7.3 [2H, m, (H-7,8)1], 6.7 (1H, s), 3.98, 3.94 (6H, s) ppm.

(3) Zapotina:

$C_{19}H_{18}O_6$, sólido blanco (7.7 mg), P.M: 342, p.f.: 78-79 °C.

(4) Casimiroina:

$C_{12}H_{11}NO_4$, sólido blanquecino (9.5 mg), P.M:233, p.f.:180-185 °C

EM m/z 233, 218, 204, 202, 190, 175.

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ 7.62 (1H, d, $J= 8.6$ Hz, H-5), 7.47 (1H, d, J) 6.88 Hz, H-6), 6.26 (2H, s, H-9), 6.08 (1H, s, H-3), 3.97 (3H,s, OMe), 3.90 (3H, s, N-Me) ppm.

(5) 6, 7 dimetoxiflavona:

$C_{17}H_{14}O_4$, sólido blanco (3.7 mg), P.M: 282, p.f.: 195-198 °C

(6) 5, 6, 2' trimetoxiflavona:

$C_{18}H_{16}O_5$, sólido blanco (8.5 mg), P.M: 312, p.f.: 120 °C

EM m/z 312, 297, 283, 181, 165, 137.

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ 7.89 (1H, dd, $J=1.7, 7.8$ Hz, H-6'), 7.52 (1H, m, H-4'), 7.32 (2H, ABq, $J=9.2$ Hz, H-7, 8), 7.26 (1H, m, H-5'), 6.70 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-3'), 3.98 (3H, s, OCH_3), 3.94 (6H, s, $2OCH_3$) ppm.

(7) 5, 6 dimetoxiflavona:

$C_{17}H_{14}O_4$, cristales blancos (1.1 mg), P.M: 282, p.f.: 190 °C

(8) sacarosa:

$C_{12}H_{22}O_{11}$, cristales transparentes (3112.1 mg). P.M: 370, p.f.: 102 °C

IR (KBr): 3563.16, 3389, 3339.03, 2968.75, 2938.72, 2911.80, 1433.79, 1346.96, 1238.75, 1069.27, 992.95, 866.07, 641.41, 553.69, 471.19, 402.42.

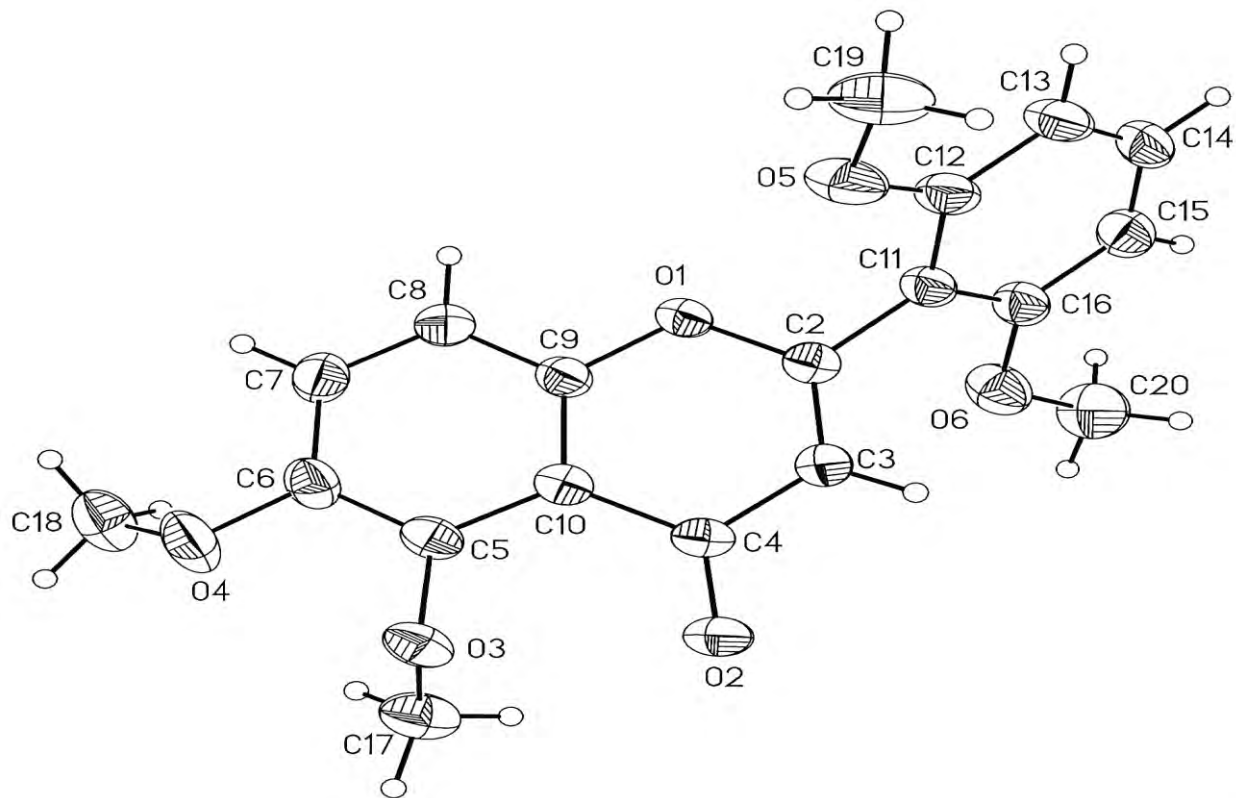
Empirical formula	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	
Formula weight	342.33	
Temperature	298(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	<i>P</i> 2 _{1/n}	
Unit cell dimensions	<i>a</i> =9.8462(8) Å <i>b</i> =17.3508(13) Å <i>c</i> =9.9230(8) Å	$\alpha=90^\circ$ $\beta=103.4920(10)^\circ$ $\gamma=90^\circ$
Volume	1648.5(2) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.379 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.103 mm ⁻¹	
<i>F</i> (000)	720	
Crystal size/ color / shape	0.43 x 0.27 x 0.20 mm / Prism / colorless	
Theta range for data collection	2.35 to 25.37°	
Diffractometer used/ Scan Mode	Bruker Smart APEX AXS CCD area detector/ omega scans	
Index ranges	-11 ≤ <i>h</i> ≤ 11, -20 ≤ <i>k</i> ≤ 20, -11 ≤ <i>l</i> ≤ 16	
Reflections collected	17884	
Independent reflections	3013 [<i>R</i> (int) = 0.0393]	
Completeness to theta = 25.37°	100.0 %	
Absorption correction	None	
Refinement method	Full-matrix least-squares on <i>F</i> ²	
Max. and min. transmission	0.9913 and 0.9696	
Data / restraints / parameters	3013/ 0 / 230	
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.000	
Final <i>R</i> indices [<i>I</i> >2σ(<i>I</i>)]	<i>R</i> 1 = 0.0389, <i>wR</i> 2 = 0.1018	
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> 1 = 0.0512, <i>wR</i> 2 = 0.1066	
Largest diff. Peak and hole	0.160 and -0.158 e. Å ⁻³	
Solved by	Solved Hernandez-Ortega	

Cuadro 11. Constantes físicas de zapotina

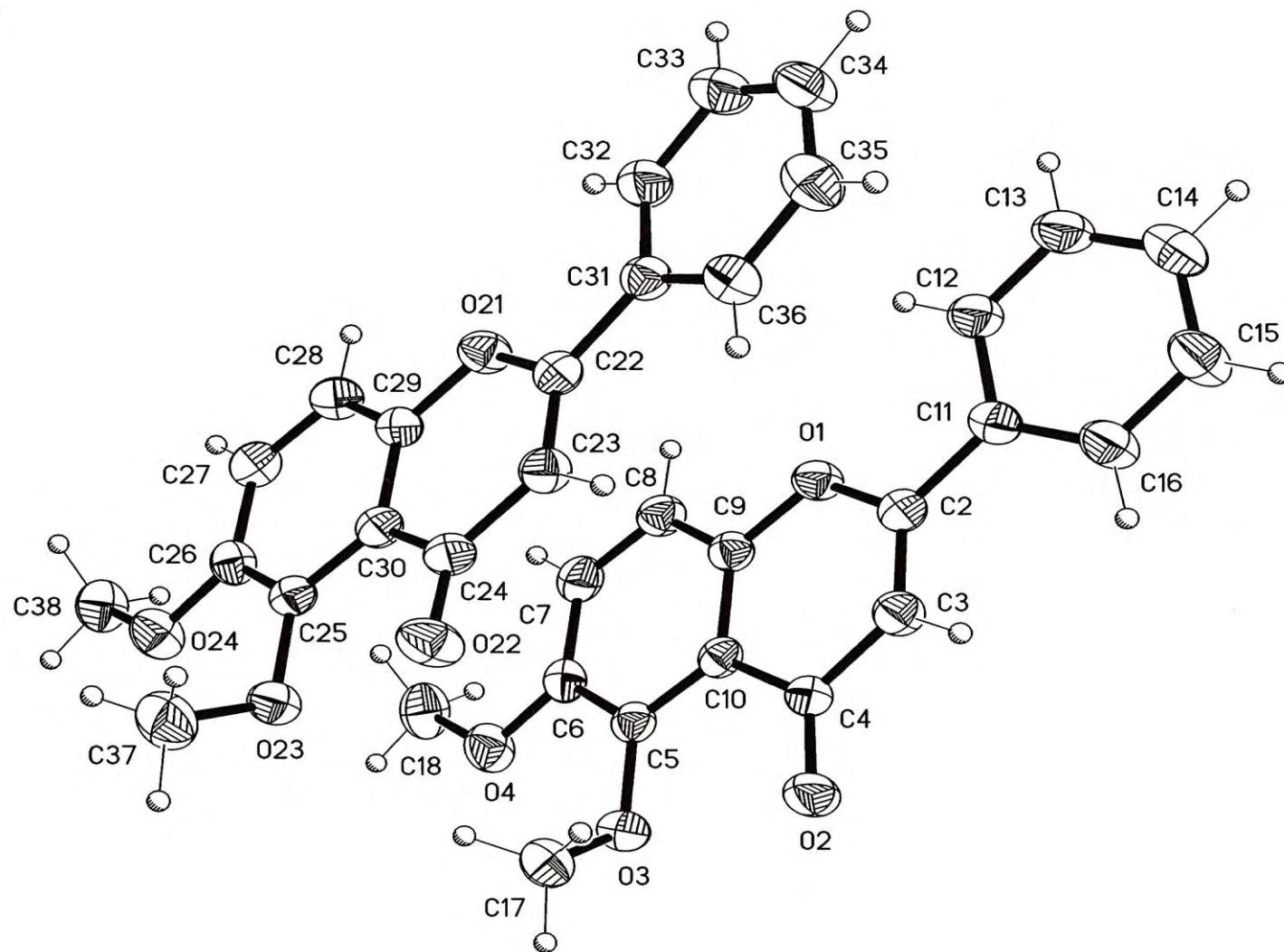
Empirical formula	$C_{17}H_{14}O_4$	
Formula weight	282.28	
Temperature	298(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	$P 2_{1/c}$	
Unit cell dimensions	$a=12.400(2)$ Å $b=15.970(2)$ Å $c=13.977(2)$ Å	$\alpha=90^\circ$ $\beta=96.091^\circ(2)$ $\gamma=90^\circ$
Volume	$2752.2(7)$ Å ³	
Z	8	
Density (calculated)	1.363 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.097 mm ⁻¹	
$F(000)$	1184	
Crystal size/ color / shape	0.348 x 0.198 x 0.096 mm /colorless /block	
Theta range for data collection	165 to 25.36°	
Index ranges	$-14 \leq h \leq 14$, $-18 \leq k \leq 19$, $-16 \leq l \leq 16$	
Reflections collected	18558	
Independent reflections	5034 [$R(\text{int}) = 0.0393$]	
Completeness to theta = 25.36°	99.8%	
Measurement device	Bruker Smart Apex CCD diffractometer	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.9913 and 0.9696	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2	
Data / restraints / parameters	5034/ 0 / 382	
Goodness-of-fit on F^2	1.019	
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0.0483$, $wR2 = 0.1107$	
R indices (all data)	$R1 = 0.0839$, $wR2 = 0.1287$	
Largest diff. Peak and hole	0.175 and -0.136 e. Å ⁻³	

Cuadro 12. Constantes físicas de 5,6 dimetoxiflavona

13.3 RAYOS X



Rayos X 1. Estructura de Zapotina



Rayos X 2. Estructura de 5,6 dimetoxiflavona

XIV. LITERATURA CITADA

Aggarwal, B., B. Shishir, S. Pandey, M. Sethi, G. Sandur. 2006. Inflammation and cancer: How hot is the link?. *Biochemical pharmacology*, **72**:1605–1621.

Ahmad, F., L. C. Lau, R. M. Ali, O. B. Kean. 2004. Anti - inflammatory activity of camaric acid from *Lantana camara*. *Current Topics in Phytochemistry* 6 131-136.

Anaya, M. L. 2003. Ecología Química. Plaza y Valdez. México. pp 38,39.

Argueta, V. A., L. Cano, M. Rodarte. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana III, Instituto nacional indigenista, INI. México. pp 1413-1414.

Asperheim, M. D. M. K. 1998. Farmacología Texto Introductorio. Mc Graw Hill Interamericana 8ª edición. pp. 229-236.

Awaad, A. S. y G. A. Soliman. 2004. Essential oil, coumarins, and flavonoids of *Casimiroa edulis* leaves growing in Egypt and their biological activities. *Egyptian Journal of Biomedical Sciences*, **15**:42-58.

Balandrin, M. F., J. A. Klocke, E. S. Wurtele, W. H. Bollinger. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medical herbs. *Science*, **228**: 1154-1160.

Beyerman, H. C y R.W. Rooda. 1960. Structure and synthesis of eduline. Alkaloids of *Casimiroa edulis*. Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap., *Proc., Ser. B* **63** 432-3.

Bulawa, C and J. Flemin. 2008. Compounds and methods for modulating protein trafficking. *PCT Int. Appl.* 97pp.

Cairns, K. 1981. Cáncer: ciencia y sociedad. Reverté. España. pp. 15.

Castellanos, B. S. V. 1998. Flavonoides y furanocumarinas aisladas de *Casimiroa pringlei*. Tesis Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México pp.124.

Chabner, B. A., C. J. Allegra, G. A. Curt y P. Calabresi. Fármacos antineoplásicos en: Goodman & Gidman (ed.) 1996. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9ª edición. Mc Graw Hill. Interamericana. Vol. 2 pp. 1309-1358.

Chiang, F. y F. González-Medrano. 1961. Nueva Especie de *Casimiroa* (Rutaceae) de la zona árida oaxaqueño-poblana. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **41**:23-26.

Chiang, F. 1989. *Casimiroa greggii*, Formely in sargentia (Rutaceae). *Taxon*, **38**:116-119.

Cortinas, C. 2003. Cáncer: herencia y ambiente. Ciencia para todos. 3ª edición. pp. 17

Cryer B., M. Feldman. 1998. Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2. selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *American Journal of Medicine* **104**:413-421.

De la fuente, J. R. 1997. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Primer suplemento para: Farmacias, droguerías, boticas y almacenes de depósito y distribución de medicamentos. Secretaria de Salud. pp 26,31,32.

Domínguez, X., V. Rodríguez, A. D. Villegas y P. Rojas. 1972. Extractives of *Sargentia greggii*. *Phytochemistry*, **11**:2648-2649.

Domínguez, X., D. Villegas, V. M. Rodríguez y G. Zamora. 1976. Estructura de la cerrosillina B (5, 6, 3', 4', 5' -pentametiflavona) aislada de las hojas del chapote amarillo (*Sargentia greggii*) *Latinoamericana de Quimica*, **7**: 45

Dominguez, X. A., D. Butruille, A. Rudy, G. Garcia G. 1977. Alkaloids and limonoids in the root of *Sargentia gregii* (Rutaceae). *Revista Latinoamericana de Quimica*. 8(1). 47-8.

Dreyer, D.L. 1967. The Structure of Zapotin, *Tetrahedrom*. **23**: 4607-4612.

Dreyer, D.L. 1968. Bitter Principles IX. Extractives of *Casimiroa edulis* Llave et Lex. The structure of Zapoterin. *J. Organic Chemistry* 33 (9): 3577-3582.

Enriquez, R.G., M. L. Romero, L. I. Escobar, P. Joseph-Nathan, W. F. Reynolds. 1984. High performance liquid chromatographic study of *Casimiroa edulis*. II. Determination of furanocoumarins. *Journal Chromatography* **287**:209-214.

Feldman, M., A.T. McMahon. 2000. Do Cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, with less Gastrointestinal Toxicity? *Annals International Medicine*, **132**:134-143.

Flores-Rosete, G. y M. Martínez-Vázquez. 2008. Anti-inflammatory and Cytotoxic Cycloartanes from Guayule (*Parthenium argentatum*). *Natural Products Communications*. 3(3): 413-422.

Garcia-Argaez, A.N., N.M. Gonzalez-Lugo, H. Parra-Delgado, M. Martinez-Vazquez. 2005. Casimiroin, zapoterin, zapotin and 5, 6, 2', 3', 4'-pentamethoxyflavone from *Casimiroa pubescens*. *Biochemical Systematics and Ecology* **4**:441-443.

Garrat, P.J. 1967. Constituents of *Casimiroa edulis* LLAVE ET LEX-VIII *Tetrahedrom*. 5(23): 2413-2416

Garzon-De la Mora, P., P.M. Garcia-Lopez, J. Garcia-Estrada, A. Navarro-Ruiz, T. Villanueva-Michel, L.M. Villarreal-de Puga, J. Casillan-Ochoa. 1999. Casimiroa edulis seed extracts show anticonvulsive properties in rats. *Journal of ethnopharmacology*. **68**:275-82

Gijón, B. J. y De Miguel, M. E. 1997. Inflamación y dolor: conceptos básicos. Grupo aula medica. pp. 1,16,18.

González, E. M., E. I. L. López, E. M. S. González, F. J. A. Tena. 2000 CIIDIR Durango. Instituto Politécnico Nacional. pp. 25.

González, N. M. 2003. Pubesamidas A, B y C, alcaloides, cumarinas y flavonas aisladas de *Casimiroa pubescens* (Rutaceae). Evaluación de su actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuatitlan. UNAM. México.

González-Lugo, N., A. García-Argáez y M. Martínez-Vazquez. 2003. Isolation of three new cytotoxic N-benzoyltiramide derivatives from *Casimiroa pubescens* (Rutaceae). Book of abstracts and final program, 51st Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, August 31st – September 4th, Kiel, Germany. pp.184.

Hawkey, C.J. 1999. COX-2 Inhibitors. *Lancet* **353**:307-314.

Heinrich, M., B. Heneka, A. Ankli, H. Rimpler, O. Sticher, T. Kostiza,. 2005. Spasmolytic and antidiarrhoeal properties of the Yucatec Mayan medicinal plant *Casimiroa tetrameria*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **57(9)**:1081-1085.

Heneka, Bilkis., H. Rimpler, A. Ankli, O. Sticher, S. Gibbons, M. Heinrich. 2005. A furanocoumarin and polymethoxylated flavonoids from the Yucatec Mayan plant *Casimiroa tetrameria*. *Phytochemistry* **6**:649-652.

Hersch-Martínez, P. 1995. Commercialization of wild medicinal plants from southwest Puebla, Mexico. *Economic Botany* 49(2):197-206.

Ian-Lih, T., J. Yi-Feng, D, Chang-Yih., C. Ih-Sheng. 2001. Cytotoxic constituents from the leaves of *Litsea akoensis*. *Chinese Pharmaceutical Journal* 53(6), pp 291-301.

IMSS, 2006 http://www.imss.gob.mx/cancer/tipos_cancer consultada 01-10-08

INEGI, 2006 “estadística a propósito del día mundial contra el cáncer” datos nacionales.

<http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf> consultada 23-01-08.

Iriarte, J., F. A. Kincl, G. Rosenkranz, F. Sondheimer. 1956. The Constituents of *Casimiroa edulis*. Llave et Lex. Part II. The bark. *Journal Chemistry Society.*, 4170-4173.

Islas, P. V., R. J. F. Sánchez. 1992. Breve historia de la farmacia en México y en el mundo. Asociación farmacéutica mexicana. pp 45, 64,65

Ito, A., L. A. Shamon, B. Yu, E. Mata-Greenwood, S. K. Lee, R. B. Van Breemen, R. G. Mehta, N. R. Farnsworth, H. H. S. Fong, J. M. Pezzuto, A. D. Kinghorn. 1998. Antimutagenic constituents of *Casimiroa edulis* with potential cancer chemopreventive activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 46(9):3509-3516.

Katzung, B. G. 1999. farmacología básica y clínica. Ed. Manual moderno, Séptima edición. pp 1011-1013.

Keng-Chia, C., D. Chang-Yih, C. Ih-Sheng, T. Ian-Lih. A cytotoxic butenolide, two new dolabellane diterpenoids, a chroman and a benzoquinol derivative from Formosan *Casearia membranacea*. 2003. *Planta Medica*. 69(7), pp 667-672.

Kincl, F., J. Romo, G. Rosenkranz, F. Sondheimer. 1956. The constituents of *Casimiroa edulis*. Llave et Lex. Part.1 The seed. *Journal chemistry society.*, 4163-4169

Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia. Omega. pp 51,52,100-102,106,107,125.

Lara, O. B y C. Márquez. 1996. Plantas medicinales de México, composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp.7,8.

Lozoya, X., R. D. Rodríguez, G. J. Ortega, H. R. Enriquez. 1978. Isolation of a hypotensive substance from seeds of *Casimiroa edulis*. *Archivos de investigación Médica Mexicana*. **9**:565-73.

Lozoya, X. 1982. Flora Medicinal de México, 1era. Parte, Plantas Indígenas, IMSS, México. pp. 130-147.

Lundell, C.L. 1968. Studies of Tropical American Plants, V. *Wrightia*, 4(2):79-96.

Maiti, A., M. Cuendet, T. Kodratyuk, V. L. Croy, J. M. Pezzuto y M. Cushman. 2007. Synthesis and Cancer Chemopreventive Activity of Zapotin, a Natural Product from *Casimiroa edulis*. *Journal medical chemistry*. 50(2):350-355.

Magos, G. A., H. Vidrio, W. F. Reynolds, R. G. Enriquez. 1999. Pharmacology of *Casimiroa edulis* IV. Hypontensive effects of compounds isolated from methanolic extracts in rats and guinea pigs. *Journal of Pharmacology*, **64**: 35-44.

Major, R.T y F. Dürsch. 1958. Na, Na-dimethylhistamine, a hypotensive principle in *Casimiroa edulis* Llave et Lex. *Journal of Organic Chemistry* **23**:1564-1565.

Márquez, I. 1998. Estudio fitoquímico de *Casimiroa sp* Originaria de San Luis Potosí. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp.7:27-31.

Martínez, M. 1951. Las Casimiroas de México y Centroamérica. *Anal. Instit. Biol.* 22 (1). 25-181.

Martínez, M. 1969. Las plantas medicinales de México, Editorial Botas, 5^{ta} edición. 349-355.

Martínez, M. 1979. Catalogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica, México. pp. 271, 117

Mata-Greenwood, E., A. Ito, H. Westenburg, B. Cui, R. G. Mehta, A. D. Kinghorn, J. M. Pezzuto. 2001. Discovery of novel inducers of cellular differentiation using HL-60 promyelocytic cells. *Anticancer Research.* 21(3B). 1763-1770.

Mechoulan, R., A. Hirshfeld. 1967. The síntesis of zapotidine. *Tetrahedron.* 1:239-242.

Méric, J.B., S. Rottey, K. Olausen, J.C. Soria, D. Khayat, O. Rixe, J.P. Spano. 2006. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 59:51-64.

Merlos, M., L. A. Gómez, M. Giral, M. L. Vencat, R. J. García, J. Form. 1991. Effects of PAF-antagonists in mouse ear edema induced by several inflammatory agents. *British Journal of Pharmacology*, 104:990-994.

Meyer, B. N., M. E. Wall, M. C. Wani y H. L. Taylor. 1985. *Journal of Natural Products.* 48:952.

Molina-Hernandez, M., N. P. Tellez-Alcantara, J. P. Garcia, J. I. O Lopez, M. T. Jaramillo. 2004. Anxiolytic-like actions of leaves of *Casimiroa edulis* (Rutaceae) in male Wistar rats. *Journal of ethnopharmacology* **1**:93-8.

Monks, A., D. Scudeiro, P. Skehan, R. Schoemaker, K. Paul, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd. 1991. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of National Cancer Institute*, **33**:757.

Morales, G., P. Sierra, A. Mancilla, A. Paredes, L.A. Loyola, O. Gallardo, J. Bohórquez. 2003. Secondary Metabolites from four medicinal plants from northern Chile: antimicrobial activity and biotoxicity against *Artemia salina*. *Journal of the Chilean Chemical Society*. **48(2)**: pp.13-18.

Murillo, G., W. H. Hirschelman, I. Aiko, R. M. Moriarty, A. D. Kinghorn, J. M. Pezzuto, R. G. Mehta. 2007. Zapotin, a phytochemical present in a Mexican fruit, prevents colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, **57(1)**:28-37.

Navarro, R. A., R. B. E. Bastidas, J. E. Garcia, L. P. Garcia, P. Garzon. 1995. Anticonvulsant activity of *Casimiroa edulis* in comparison to phenytoin and phenobarbital. *Journal of ethnopharmacology*, **3**:199-206.

Nguyen, A.T., H. Malonneb, P. Dueza, R. Vanhaelen-Fastre, M. Vanhaelena, J. Fontaine. 2004. Cytotoxic constituents from *Plumbago zeylanica*. *Fitoterapia* **75**: 500–504.

Ocegueda, S., E. Moreno, P. Koleff. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas* **62**:12-15.

Potter, J. D y C. M. Ulrich, 2006. COX-2 and gastric cancer: More on inflammation and neoplasia. *Gastroenterology*, **130**:2198-2200.

Power, F. B. 1911. The Constituents of the seeds of *Casimiroa edulis*. *Journal Chemistry Society*. **99**:1993-2010

Rebolledo, M. L. 1952. *Terapéutica Clínica*. Librería de Medicina, 1º edición, México. pp. 463.

Rizvi, S. H., R. S. Kapil y A. Shoeb. 1985. Alkaloids and coumarins of *Casimiroa edulis*. *Journal of natural products*. **48**:146.

Romero, M. L., L. I. Escobar, X. Lozoya, R. G. Enríquez. 1983. High performance liquid chromatographic study of *Casimiroa edulis*. I. Determination of imidazole derivatives and rutin in aqueous and organic extracts. *Journal Chromatography*. **283**:245-251.

Rubinstein, I., J. Goad, A. D. H. Clague, J. Mulheirn. 1976. The 220MHz NMR Spectra of phytosterols, **15**:195-200.

Solomons, T. W. G. 1982. química orgánica. Ed. Limusa. pp 426,427, 911.

Sondheimer, F., A. Meisels, F. A. Kincl. 1959. Constituents of *Casimiroa edulis*. Llave et Lex. V. Identity of Casimirolid and Obacunone. *Journal Chemistry Society*. **24**:870.

Sondheimer, F. y A. Meisels. 1960. Contituents of *Casimiroa edulis*. Llave et Lex VI *Tetrahedron*. **9**:139-144.

Syed, A. T. y Nabeeh R. I. 2008. Probable neuro sexual mode of action of *Casimiroa edulis* seed extract versus [correction of verses] sildenafil citrate (Viagra(tm)) on mating behavior in normal male rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1**:1-6.

Toube, T. P., J. W. Murphy, A. D. Cross. 1967. Spectra and stereochemistry. XXIV. The structures of edulitine and edulinine. *Tetrahedron*, 23(5):2061-2065.

Trease, G. E., W. E. Charles. 1991. Farmacognosia. Ed. Interamericana. 13ª edición. pp. 3,66,71,205, 590,692.

Vidrio, H. y G. A. Magos. 1991. Pharmacology of *Casimiroa edulis*; Part I. Blood pressure and heart rate effects in the anesthetized rat. *Planta medica*. 57:20-24.

Vidrio, H. y G. A. Magos. 1991. Pharmacology of *Casimiroa edulis*; II. Cardiovascular effects in the anesthetized dog. *Planta medica*. 57:217-220.

Viesca, C. 1978. La medicina tradicional mexicana: sus raíces prehispánicas. *Medicina tradicional*. 1(3): 43-48.

Villalva, J. 2008. <http://www.monografias.com/trabajos12/cance/cance.shtml>. Consultada el 24-01-08.

Wang, Y., G. Meili, G. Zhang, Q. Xue. 2006. Chemical constituents in root of *Petasites tricholobus* and their anti - inflammatory activity. *Dier Junyi Daxue Xuebao*. 27(11), 1210-1213.

WHO, 2008 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/> consultada 30-06-08