



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Fitoquímica y evaluación farmacológica de las
propiedades sedantes de extractos de las
hojas de *Casimiroa edulis* Llave y Lex.**

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO
P R E S E N T A:
BARRERA LÓPEZ REYNA ARACELI

DIRECTOR: Dr. Mariano Martínez Vázquez
ASESORA: Dra. Hortensia Rosas Acevedo



MÉXICO, D.F.

2008



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.

La presente tesis

**Fitoquímica y evaluación farmacológica de las propiedades
sedantes de extractos de las hojas de *Casimiroa edulis* Llave y Lex.**

Se realizó en el laboratorio L-4 del Instituto de Química, UNAM;

Bajo la dirección de:

Dr. Mariano Martínez Vázquez

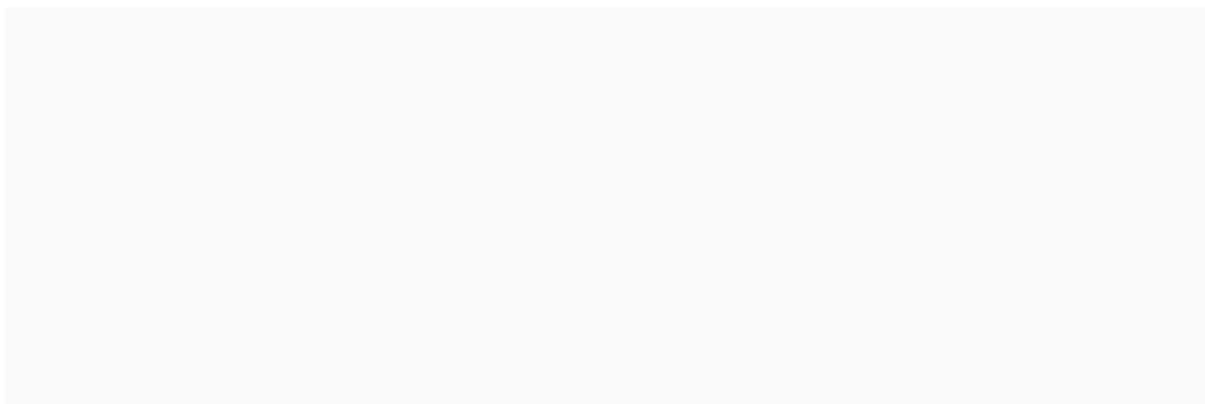
Dra. Hortensia Rosas Acevedo

Y en el laboratorio de fitofarmacología del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”

Bajo la dirección de:

M. en C. Rosa Estrada Reyes

MIEMBROS DEL JURADO



AGRADECIMIENTOS

A las profesoras Estela Jiménez y Roció Breceda:

Por la colaboración brindada, por la atención, el tiempo y los valiosos consejos que aportaron para la realización de ésta tesis, gracias.

A la Doctora Rosi:

Por las facilidades proporcionadas, las recomendaciones y conocimientos aportados, los cuales permitieron mejorar este trabajo de investigación.

Al Dr. Mariano:

Gracias por la paciencia que me brindo durante todo este tiempo, y por transmitirme un poco de su conocimiento, los cuales permitieron mejorar este trabajo de investigación.

A la Dra. Hortensia:

Por el apoyo, mas de una tutora de tesis. Por la oportunidad de demostrarme que con paciencia, esfuerzo, constancia y perseverancia se pueden lograr todas las metas. Gracias por la asesoría y por compartir sus experiencias como investigadora y como ser humano. Y definitivamente por haber plasmado su huella en mi camino.

A la Doctora Catalina:

Por su permanente disposición, por la paciencia, por escucharme y aconsejarme. Por compartir su conocimiento e inspirar en mi mucha admiración. Por su ejemplo de profesionalismo y definitivamente por hacer mas perfecto aquello en que creo.

Al Dr. Francisco:

Por brindarme todo su apoyo y confianza, por su tiempo, por los consejos y sugerencias, por su valiosa aportación. Por ser una personas que en lo profesional admiro mucho y respeto; y por ser una gran influencia en mi vida profesional.

Finalmente a todas las personas que se cruzaron en este camino y que me dieron palabras de aliento y apoyo.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con amor, a mi familia; ellos que me han formado, apoyado y comprendido durante (...) años para lograr mis metas.

A mis padres y abuelos:

Por darme la oportunidad de compartir mis triunfos con ellos,
Por su sabiduría. Su fuerza y su amor me han dirigido por la vida y me han dado las alas que necesitaba para volar. Los amo y no pasa un día sin que agradezca a Dios por haber sido parte de sus vidas.

A mis tías:

Quienes con cariño me alentaron a triunfar, para lograr mis metas. Por compartir mis alegrías, por sus sabios consejos, recomendaciones y por su apoyo incondicional. Gracias por recordarme que hay personas valiosas en el mundo y gracias por estar en el mío.

A mis hermanos y primos:

Por que a su lado compartí los momentos más agradables de mi vida, por que siempre están conmigo, por su apoyo. Ustedes han enriquecido mi vida con su cariño y su alegría. Los quiero.

A mis amigas:

Agradezco su amistad, confianza, comprensión, el constante estímulo y compañía. Por las aventuras en campo y durante toda la carrera.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	7
2. RESUMÉN.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
4. ANTECEDENTES.....	11
4.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Casimiroa edulis</i>	11
4.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.....	13
4.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	14
4.4. ETNOBOTÁNICA DE <i>Casimiroa edulis</i>	15
4.5. ESTUDIOS QUÍMICOS DE LA ESPECIE.....	16
4.6. ANTECEDENTES DE EFECTOS FARMACOLÓGICOS DE <i>Casimiroa edulis</i>	18
4.7. CONCEPTO E IMPORTANCIA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.....	19
4.7.1. FLAVONOIDES.....	21
4.7.2. IMPORTANCIA ECOLÓGICA DE LOS FLAVONOIDES.....	24
4.7.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS FLAVONOIDES.....	25
4.8. PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS EN ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRA.....	26
4.9. FÁRMACOS CON ACTIVIDAD SEDANTE.....	27
4.9.1. BENZODIAZEPINAS.....	28
4.9.1.1. DIAZEPAM.....	29
4.9.2. BARBITÚRICOS.....	30

4.9.2.1. PENTOBARBITAL.....	31
4.9.3. SUEÑO.....	32
5. HIPÓTESIS.....	33
6. JUSTIFICACIÓN.....	33
7. OBJETIVOS.....	34
8. METODOLOGÍA.....	35
8.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO.....	35
8.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEDANTE.....	37
8.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	39
9. RESULTADOS.....	40
9.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO.....	40
9.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEDANTE.....	41
9.3. ANÁLISIS DE CLAR.....	48
10. DISCUSIÓN.....	49
11. CONCLUSIONES.....	57
12. BIBLIOGRAFÍA.....	58
13. ANEXÓ.....	64

1. ABREVIATURAS

MS	Metabolito secundario
SNC	Sistema Nervioso Central
BZ	Benzodiazepinas
DZ	Diazepam
PB	Pentobarbital
EHTE	Extracto hidroalcohólico a temperatura de ebullición
EHTA	Extracto hidroalcohólico a temperatura ambiente
EHTEM	Extracto hidroalcohólico a temperatura de ebullición de metanol
EHTAM	Extracto hidroalcohólico a temperatura ambiente de metanol
EHTED	Extracto hidroalcohólico a temperatura de ebullición de diclorometano
EHTAD	Extracto hidroalcohólico a temperatura ambiente de diclorometano
UV	Ultravioleta
IR	Infrarrojo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹³ C	Carbono 13
EM	Espectrometría de masas
CLAR	Cromatografía Líquida de Alto Resolución
SSI	Solución salina isotónica
Pg	Polipropilenglicol
Ip	Intraperitoneal
PTE	Producto de Temperatura de ebullición

2. RESUMÉN

Por su creciente importancia en áreas como la medicina, la agricultura o la contaminación ambiental, el estudio de los productos naturales de origen vegetal ha sido objeto de un renovado interés por diversos grupos internacionales de investigación. Uno de los resultados de estos estudios es eliminar aquellas sustancias que resulten tóxicas o cuyos efectos colaterales las hagan inapropiadas para su uso (Lara, 1996). Por otro lado, es indudable que el efecto terapéutico de las llamadas plantas medicinales está dado por sus constituyentes químicos, los cuales generalmente son metabolitos secundarios que producen efectos fisiológicos (Balandrin et al, 1985; Argueta et al, 1994). Entre las plantas medicinales usadas por ciertos sectores de la sociedad mexicana esta *Casimiroa edulis*, conocida popularmente como zapote blanco. En la medicina tradicional mexicana esta especie se recomienda para el tratamiento de hipertensión arterial, así como anticonvulsionante e inductor de sueño, entre otros (Argueta et al, 1994; Capistrán et al, 2004).

Por otro lado, hoy en día, como consecuencia del incesante ajeteo de la vida diaria, la ansiedad, las perturbaciones de sueño, la depresión y otros trastornos del Sistema Nervioso Central, se han convertido en problemas de salud pública y generalmente su tratamiento consiste en la prescripción de medicamentos ansiolíticos y/o sedantes (Capistrán et al, 2004; Medina-Mora et al, 2003). En el presente estudio se evaluó, en un modelo animal de inducción de sueño por pentobarbital sódico, el efecto sedante de seis extractos de diferente polaridad de las hojas de *C. edulis*. Los resultados indicaron que los extractos probados presentaron diferentes efectos biológicos. Por ejemplo, el extracto hidroalcohólico de las hojas, obtenido a temperatura ambiente durante 24 horas, aumentó significativamente, comparado con el grupo control, el tiempo de sueño inducido con pentobarbital, en dosis de 500 y 1000 mg/kg de peso. Sin embargo, el extracto hidroalcohólico obtenido a temperatura de ebullición provocó, después de la administración del pentobarbital, la muerte de un 75% de los animales de prueba, a una dosis de 1000 mg/kg. Por otro lado, los extractos de diclorometano obtenidos mediante una partición de los respectivos extractos hidroalcoholicos resultaron ser tóxicos, provocando la muerte del 100%

de los animales de prueba. La separación cromatográfica del extracto hidroalcohólico obtenido a temperatura de ebullición, permitió el aislamiento de la rutina y la N-metil prolina.

3. INTRODUCCIÓN

El hombre desde sus inicios ha recurrido a la naturaleza en busca de su alimento y de procuración de su salud. Por medio de errores y aciertos aprendió a conocer las plantas que podían curarlo, y así este conocimiento fue transmitido por generaciones y fue enriqueciéndose con la experiencia y conocimientos aportados a través del tiempo (Díaz et al, 1998; Gurib-Fakim et al, 2006).

El uso de las plantas para fines terapéuticos se pone de manifiesto por la existencia de herbarios desde la época de los sumerios, los asirios, los babilonios o los fenicios. El papiro de Ebers (1700 a.C.), con más de 20 m de longitud, encontrado en las ruinas de Luxor, almacena, el uso medicinal de 700 plantas, como el ajo o la adormidera (Enciclopedia Encarta, 2007).

En China y el resto de Asia el uso de plantas para tratar enfermedades se remonta a más de 10.000 años. Sin embargo, fueron griegos y romanos los primeros en sistematizar en Occidente, a través de sus escritos, el estudio de las plantas medicinales. Así, Dioscórides, en su obra *De materia Medica*, describe más de 600 plantas de uso medicinal (Enciclopedia Encarta, 2007).

Philippus Theophrastus Bombastus (1493-1541), mejor conocido como Paracelso, enriqueció el tratamiento con plantas medicinales de maneja particular, estableció la signatura de cada planta y sus aplicaciones según su color o su aspecto. Alejandro Magno introdujo en Europa un sinnúmero de plantas con propiedades curativas gracias a sus expediciones por África, Persia y la India (Díaz et al, 1998).

En el siglo XVI en la Nueva España se almacena y escribe el conocimiento medico herbolario indígena en obras como el Códice de la Cruz y Badiano, el cual fue escrito en 1552. Otro documento es el Códice Florentino, escrito por Fray Bernardino de Sahagún entre los años 1558 y 1578 (Díaz et al, 1998).

Otra obra similar es la “Historia Natural de la Nueva España” del médico naturalista Francisco Hernández, cuyo escrito contiene información de 3076 plantas. Todas estas obras muestran la fusión de conocimientos, resultado de la Conquista, en donde la herbolaria mexicana se complementa con especies medicinales traídas por los españoles como la manzanilla, el albahaca y la hierbabuena, por mencionar algunas (Martínez, 1969).

En los siglos XVI y XVII hay obras importantes como las de Gregorio López (1674), las obras de Vicente Cervantes (1789-1832), las farmacopeas (1895), los documentos del Instituto Médico Nacional (1889-1914) y la obra de Maximino Martínez (1933) con su libro “Las plantas medicinales de México”, que reunió la información que el IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) había recabado en los dos últimas décadas del siglo XIX (Díaz et al, 1998).

En la actualidad, las plantas medicinales constituyen un importante recurso natural, siendo la primera y casi la única opción de procuración de salud de los segmentos de la sociedad más pobres, particularmente en los países del tercer mundo. Además, existe una cantidad notable de medicamentos patentados cuya base lo constituye ya sea un metabolito secundario de origen vegetal o alguna sustancia derivada de un principio activo aislado de especies vegetales (Lechuga et al, 2000).

Los principios activos de las plantas son de diversa estructura química así se encuentran alcaloides, terpenoides, flavonoides, lípidos, cumarinas, entre otras que pueden estar en forma libre o unidos a moléculas de diferentes azúcares, a estos últimos compuestos genéricamente se les conoce como glicósidos (Balandrin et al, 1985; Enciclopedia Encarta 2007).

Se estima que en México se cuenta con alrededor de 4 000 especies de angiospermas (aproximadamente 15% de la flora total en el país) que tienen antecedentes etnobotánicos como plantas medicinales. Es decir que una de cada siete especies poseen alguna propiedad curativa (Osegueda et al, 2005). Por otro lado, probablemente se ha estudiado entre un 5 y un 15% de la diversidad vegetal existente en el mundo con relación a su composición química y su actividad biológica (Peña, 1990). La evaluación de 1 000 de estas especies, bajo diseños experimentales específicos, detectó actividad biológica en 524 (Mata et al, 194). Estos resultados indican la riqueza de fármacos potenciales que están en las llamadas plantas medicinales.

4. ANTECEDENTES

4.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Casimiroa edulis* Llave & Lex.

Existen marcadas diferencias dentro de los distintos grupos de organismos unicelulares. En la actualidad, la clasificación de los seres vivos se fundamenta en las relaciones evolutivas entre las distintas especies de organismos, a lo que se le da el nombre de filogenia (Gama, 1997).

Se han propuesto diversos sistemas de clasificación para el mundo vegetal a lo largo de la historia. El método actual se basa en los taxa, que son grupos de vegetales, que comparten caracteres comunes. Estos grupos taxonómicos se ordenan de mayor a menor, siendo el primero el reino y el último y básico la especie (Nueva enciclopedia, 2002).

La mayoría de los zapotes actualmente cultivados o silvestres, se han clasificado como pertenecientes al género *Casimiroa*. El zapote blanco en particular se ha clasificado como *Casimiroa edulis* y su clasificación taxonómica es la siguiente:

Nombre común: Zapote blanco.

Reino: **Plantae**

Filo: **Magnoliophyta**

Clase: **Magnoliopsida**

Orden: **Rutales**

Familia: **Rutaceae**

Género: **Casimiroa**

Especie: ***Casimiroa edulis* Llave y Lex**

(De la llave, 1825)



- El reino Plantae, las plantas son organismos pluricelulares eucariontes, en general se caracterizan por contener clorofila, que es el principal pigmento fotosintético que permite a las plantas ser autótrofas, están organizadas en tejidos y tienen pared celular. Incluye musgos, helechos, coníferas y plantas con flores. Este reino está formado por cuatro grupos principales: Briófitas, Pteridofitas (helechos), Gimnospermas y Angiospermas (Gama, 1997).
- Magnoliophyta, filo que pertenece a las angiospermas; entre las principales características de las angiospermas está la de producir flores en la que se encuentran los órganos reproductores y la de que sus semillas se forman dentro del ovario quedando de ese modo protegidas de la depredación anticipada de los animales. Se dividen en monocotiledonias y dicotiledonias (Gama, 1997; Nueva Enciclopedia 2002).
- La clase Magnoliopsida, los miembros de esta clase son conocidas como dicotiledóneas. A este grupo se les denomina así por tener durante las primeras etapas del desarrollo dos cotiledones, se han adaptado a casi todos los medios, y tienen una gran variedad en morfología, tamaño y hábito (Nueva enciclopedia, 2002).
- La familia **Rutaceae** pertenece al orden de los Rutales, y está integrada por alrededor de 150 géneros y más de 1500 especies, algunas de ellas de relevancia económica. La familia es de importancia debido a los frutos (cítricos) de muchas de sus especies, así como a la producción de aceites esenciales y medicinales. Numerosas especies son de interés ornamental. La mayoría árboles y arbustos, generalmente con hojas persistentes simples o pinnadas, con cavidades translúcidas que contienen aceites volátiles. Fruto en cápsula, esquizocarpo, baya carnosa (hesperidio), sámara o drupa. Debido a la importancia comercial de algunas especies, estas se han estudiado desde el punto de vista químico. Por otro lado también se han realizado trabajos quimiotaxonómicos con el objeto de relacionar la presencia de algunos metabolitos secundarios característicos dentro de diferentes grupos de taxa de la familia. En las Rutaceas, se han utilizado como marcadores quimio-taxonómicos a los aceites esenciales, los alcaloides, las cumarinas, los flavonoides, los limonoides así como a las ceras. El uso específico de estos compuestos ha permitido apoyar exitosamente propuestas de clasificaciones preexistentes (Chiang et al, 1961).

- El género **Casimiroa** fue establecido por los botánicos mexicanos Pablo de Llave y Juan Martínez Lexarza en su obra *Novorum Vegetabilium Descriptiones*, publicada en México en 1825. 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 folíolos, rara vez 1 ó 7 hojuelas lanceoladas, subelípticas, ovales u obovadas, con peciolulos cortos o largos, glabras o 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 ovales, 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).

4.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE *Casimiroa edulis*.



Figura 1. Árbol de *Casimiroa edulis* (Tomado de Revista Conafor, 2008).

La nomenclatura del género y la especie fueron establecidos por los botánicos mexicanos Pablo de la Llave y Juan Martínez Lexarza, cuyas descripciones originales se encuentran en el fascículo II p.9 del *Novorum Vegetabilium Descriptiones* de 1825. **Casimiro edulis** es un árbol ramoso de 2 a 10 m de altura (Figura 1) de hojas alternas compuestas de 3 a 5 folíolos oblongos u ovado-oblongos, coriáceos, lustrosos y verdes, pubescentes. Sus flores son hermafroditas, pequeñas, blanco-verdosas distribuidas en pequeños racimos axilares o terminales. Su fruto es globoso, mide de 8 a 10 cm de ancho, son amarillentos con una pulpa blanca y dulce. Las semillas son oblongas de 3 a 5 cm de largo con 2.5 cm de ancho, sin albumen, con el hilo alargado y central, los cotiledones gruesos amigdalinos y la radícula corta.

Florece de enero a febrero (Argueta **et al**, 1994; De la Llave 1825).

4.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Especie originaria de México y Centroamérica. Es una especie de fácil adaptación a todo tipo de suelo, incluso suelos pedregosos o pesados, resistente a la sequía y es uno de los árboles frutales que mejor soportan el frío. Habita en climas cálido, semicálido y templado desde los 500 y los 2 600 m. Cultivada en huertos familiares, asociadas a bosques caducifolios y subcaducifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, mesófilo de montaña y mixto de pino-encino. Su distribución abarca el Distrito Federal y los estados de Chiapas, México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Puebla, San Luis Potosí, Tlaxcala Veracruz, Yucatan y Chihuahua (Figura 2). Al parecer también se ha introducido en California, Florida, Argentina, Brasil, el Mediterráneo y la India (Vegetación de México, 2008).



Figura 2. Mapa de la distribución de *Casimiroa edulis* en México.

4.4. ETNOBOTÁNICA DE *Casimiroa edulis*

En México *Casimiroa edulis* es conocida comúnmente como Chapote, iztactzapotl (zapote blanco), zapote blanco, urata-urapite, cochitzapotl (zapote dormilón), cacchique y zapote dormilón; siendo zapote blanco el más utilizado (Argueta *et al*, 1994).

Casimiroa edulis es citada desde el siglo XVI en el código florentino como somnífera y este uso se ha mantenido hasta hoy en día. Por su parte, Hernández relata que las hojas machacadas y aplicadas a las nodrizas, curan las diarreas de los infantes. También se informaba que atenuaba los dolores de vientre de los niños, tanto si provienen de frío como de flatulencia. En el siglo XVI se señalaba su uso contra inflamaciones (Argueta *et al*, 1994).

En las investigaciones realizadas por entonces llamado Instituto Médico Nacional, a finales del siglo XIX, se relata que al utilizar extractos acuosos de esta especie, como hipnótico, o anticonvulsivante, o antipirético se obtuvieron en la mayoría de los casos resultados positivos. También fue exitoso como remedio contra el dolor, la agitación, el delirio e inductor del sueño (Argueta *et al*, 1994).

En el siglo XX, Maximino Martínez lo consigna como: anticonvulsivo, antipirético, antirreumático, antiséptico, hipnótico, hipotensor, para irritaciones gastrointestinales, provoca parálisis de la respiración sedante, vasodilatador, y analgésico. Por su parte, Luis Cabrera al igual que la Sociedad Farmacéutica de México, lo citan como remedio para la arterioesclerosis, así como diaforético, diurético e hipnótico (Argueta *et al*, 1994).

En la medicina tradicional mexicana se menciona frecuentemente el uso de la *Casimiroa edulis*, para el tratamiento de la hipertensión arterial. Para tal efecto, se recomienda tomar la infusión de las hojas de esta planta cada tercer día en ayunas o comer un fruto después de cada comida, hasta obtener una presión arterial normal. (Argueta *et al*, 1994) Las hojas y semillas de *C. edulis* se han usado durante siglos en la medicina tradicional mexicana como sedantes e hipnóticos. También suele emplearse contra insomnio o como regulador del sueño. Para tal efecto, se indica tomar el té por las noches, una o dos horas antes de irse a dormir, después de haber ingerido el último alimento. Se menciona que beber la cocción de hojas o semillas, antes de acostarse y comer un fruto, basta para

poder dormir toda la noche (Argueta *et al*, 1994). También se recomienda el beber el cocimiento de las hojas para el tratamiento de la diabetes. Mientras que por vía tópica o local se recomienda para dar baños en la “quemazón” o “baños de mujer” después del parto (Avilés *et al*, 1985).

Los otomíes se toman el cocimiento de las hojas como paliativo contra la anemia. Un baño general con el cocimiento de las hojas se recomienda como analgésico (dolor del cuerpo) y antipirético. Para los dolores artríticos se puede ocupar el cocimiento de la corteza, hoja o semilla y para quitar los cólicos, la infusión de la semilla (Argueta *et al*, 1994).

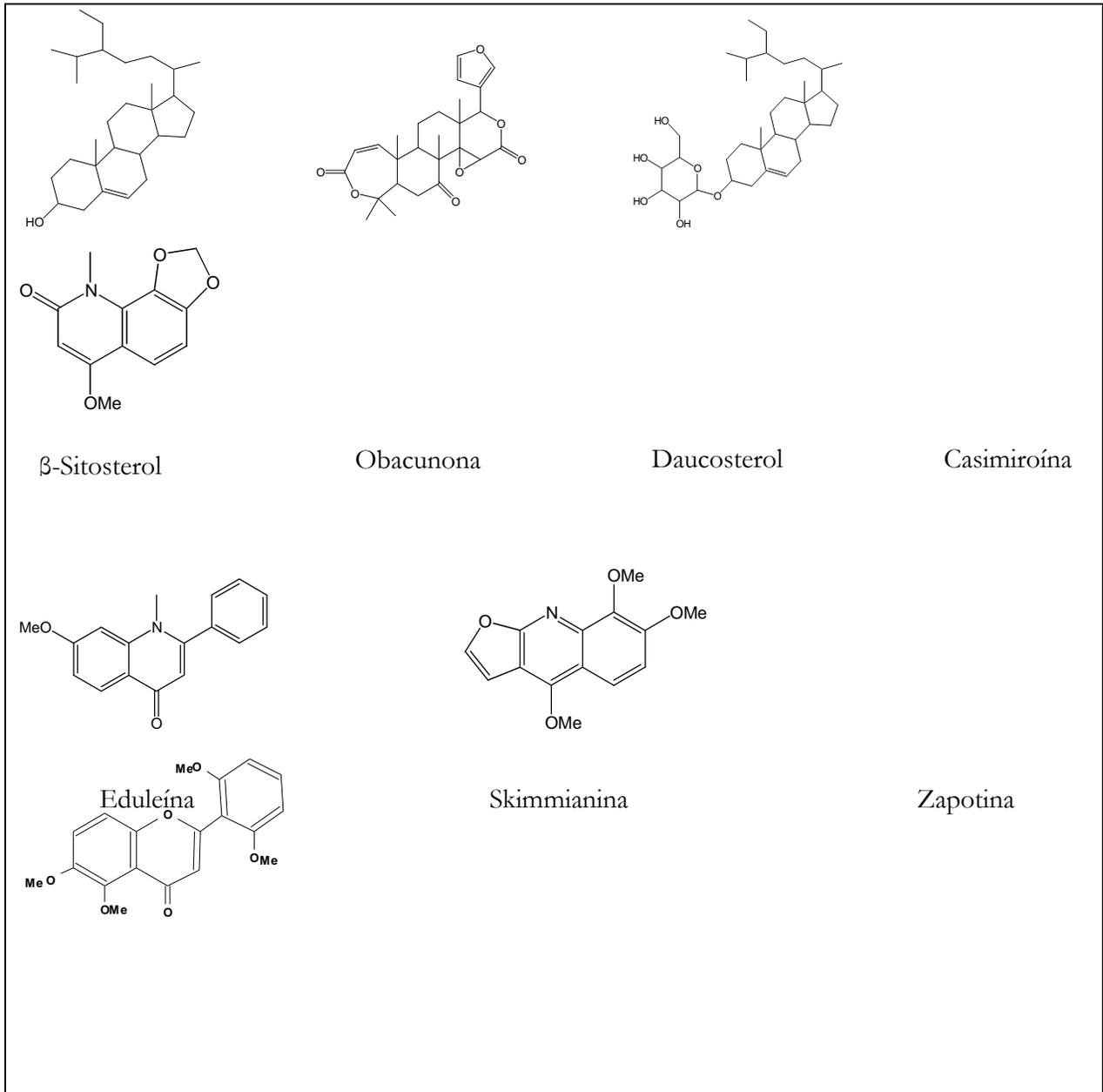
Otros padecimientos en los que se usa el zapote blanco son: reumas, dolores de riñón, afecciones del corazón, nervios, dolor de cabeza y de muelas, fiebre, mareos. Incluso se emplea como diurético (Argueta *et al*, 1994).

4.5. ESTUDIOS QUÍMICOS DE *Casimiroa edulis*

Se han realizado diversos estudios químicos para conocer los principales metabolitos secundarios sintetizados por esta especie. Por ejemplo, en la semilla se han identificado principalmente alcaloides como la edulina, la histamina así como sus derivados metil y dimetilado. También se han aislado la palmitamida y la zapotidina así como los alcaloides quinolinicos, casimiroina y edulitina. Entre los metabolitos secundarios que caracterizan a esta especie se encuentran las cumarinas. Así se ha logrado aislar e identificar a la 9-hidoxi-4-metoxi-furano-benzopiranona, la felopterina, así como el 5 y el 8 geraniol-oxi-psoralen, entre otras. También se han aislado flavonoides, como la zapotina y la zapotinina, triterpenos, como la obacunona y el zapoterin, y los esteroides, daucosterol y β -sitosterol, y algunas sales: oxalato de calcio, sulfato y cloruro de potasio (Figura 3). De la semilla se extrajo un aceite en la que se identificaron los ácidos grasos, estearico, linoleico y oleico, el alcano ipuranol, la ubanona, la casimiroidina, y casimiroina el β -sitosterol (Argueta *et al*, 1994; Dreyer *et al*, 1968; Khaleel *et al*, 2002).

En la corteza del tronco y la raíz se ha detectado los alcaloides casimiroina, casimiroidina, eduleina, edulinina, edulitina, γ -fagarina y dictamina. También se han aislado los flavonoides 5-6 dimetroxi flavona, y sapotina (Argueta *et al*, 1994; Martínez, 1969).

En las ramas se han encontrado edulen, y metil-fenilquinolona, además la cumarina; metil-eter de la escopoletina. En las hojas se ha identificado la metil y dimetil-histamina, así como casimiroina, skimmianina, eduleina, rutina y el ester metilico del N-hetriacontano (Argueta 1994; Khaleel, 2002).



Zapotinina

Felopterinina

Dictamina

Palmitamida

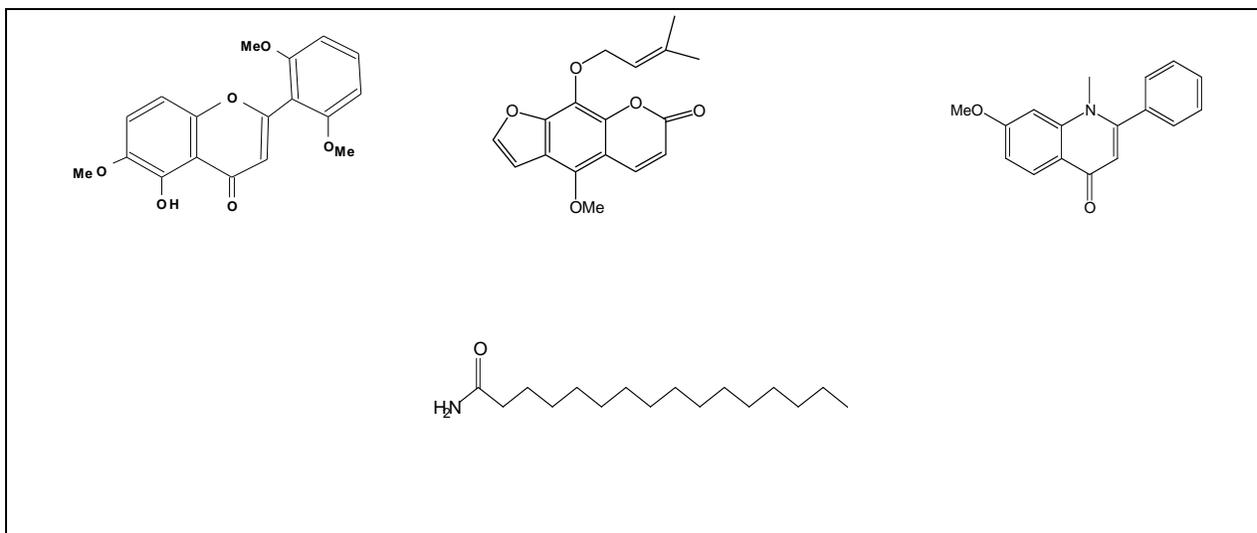


Figura 3. Estructuras químicas de algunos compuestos aislados de *Casimiroa edulis*.

4.0. ANTECEDENTES DE EFECTOS FARMACOLOGICOS DE *Casimiroa edulis*.

Una de las actividades mejor evaluadas y comprobadas de *C. edulis* es la actividad hipotensora, se ha observado que diferentes extractos preparados a partir de varias partes de la planta presentan éste efecto hipotensor, sin embargo son preferidos aquellos preparados con las semillas. Estudios recientes han demostrado que los efectos hipotensores de los extractos pueden tener una importante aplicación en la medicina, puesto que produce vasodilatación periférica acompañada de un ligero efecto sedante sobre el SNC (Argueta *et al*, 1994; Magos *et al*, 1999).

También, se ha descrito la actividad miorelajante en varias especies animales (cobayo, conejo, y gato) de extractos etanólicos de la semilla de *C edulis*. (Argueta *et al*, 1994) Así como, actividad analgésica, depresora del SNC e hipodérmica de extractos etanólicos-acuosos obtenidos de los frutos. Asimismo, se ha informado que los extractos etanólicos-acuoso obtenidos de hojas de esta especie presentan actividad antiinflamatoria y diurética en ratas. Además, se ha informado que el extracto metanólico-etanólico de semilla presenta actividad hipertensiva y un efecto cronotrópico negativo en ratas (Argueta *et al*, 1994).

Otros estudios, señalan el efecto estimulante del útero observado con extractos acuosos y etanólicos de *C. edulis*, en tejido aislado de útero de gato, cobayo, conejo y adulto humano; y la actividad emética de extractos etanólicos, observados en perros.

Recientemente Mora y colaboradores (2004); evaluaron la actividad sedante del extracto hidroalcohólico a temperatura de ebullición de las hojas de *C. edulis*. Los resultados revelaron que este extracto, prolonga significativamente el tiempo de sueño inducido por pentobarbital (Mora *et al*, 2005).

4.7. CONCEPTO E IMPORTANCIA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

El aislamiento de los diversos compuestos químicos sintetizados por las plantas se inició a partir del estudio de las especies medicinales. La diferencia de las plantas en órganos especializados y tejidos esta íntimamente asociados con el rasgo de procesos biológicos especializados, que son fundamentales para sus roles biológicos y ecológicos. Estas funciones biológicas son reguladas por procesos bioquímicos, que se dividen en dos grupos: metabolitos primarios y metabolitos secundarios (Cotton, 1996).

Las sustancias naturales suelen clasificarse como primarias cuando son necesarias para el individuo, y esta presente en todos los organismos. Por otra parte se conoce como metabolitos secundarios (MS) a aquellas sustancias que aparentemente no tienen un papel fundamental en el desarrollo de la planta (como grasas, esteroides, alcaloides), y que presentan una distribución restringida (Holm *et al*, 1988).

De acuerdo con Vanhaelen y colaboradores, los metabolitos secundarios pueden definirse como productos naturales que no funcionan directamente en actividades bioquímicas primarias. Sin embargo, estos metabolitos desempeñan roles importantes en la ecología vegetal, por ejemplo algunos compuestos fenólicos y terpenoides, funcionan como insecticidas o repelentes de organismos herbívoros, así como hormonas de insectos, fitoalexinas, agentes alelopáticos,

reguladores del crecimiento vegetal, también poseen actividad fungicida o afectan en varios modos a organismos patógenos como los nematodos (Fuller *et al*, 1987).

Son numerosos los metabolitos secundarios útiles para el hombre en diferentes formas entre estos están: alcaloides, aminoácidos, glicósidos cardiacos, flavonoides, péptidos, fenoles, saponinas, taninos, terpenoides, etc. (Nickell *et al*, 1980) Son estos metabolitos secundarios, generalmente presentes en concentraciones bajas, los que ejercen un efecto biológico o farmacológico en los seres humanos (Summer *et al*, 2000).

Los diversos tipos de metabolitos secundarios, son formados por diversas rutas metabólicas conocidas como rutas biosintéticas (Figura 4).

En estas se presentan la síntesis de los metabolitos secundarios a partir de cambios simples en la molécula de los precursores, por ejemplo, la remoción de un radical activo, la oxidación, reducción, metilación, introducción de un grupo hidroxilo, ciclización de una cadena, etc. En algunos casos es fácil detectar en los MS, rasgos estructurales característicos que sugieren un precursor químico particular (Anaya, 2003).

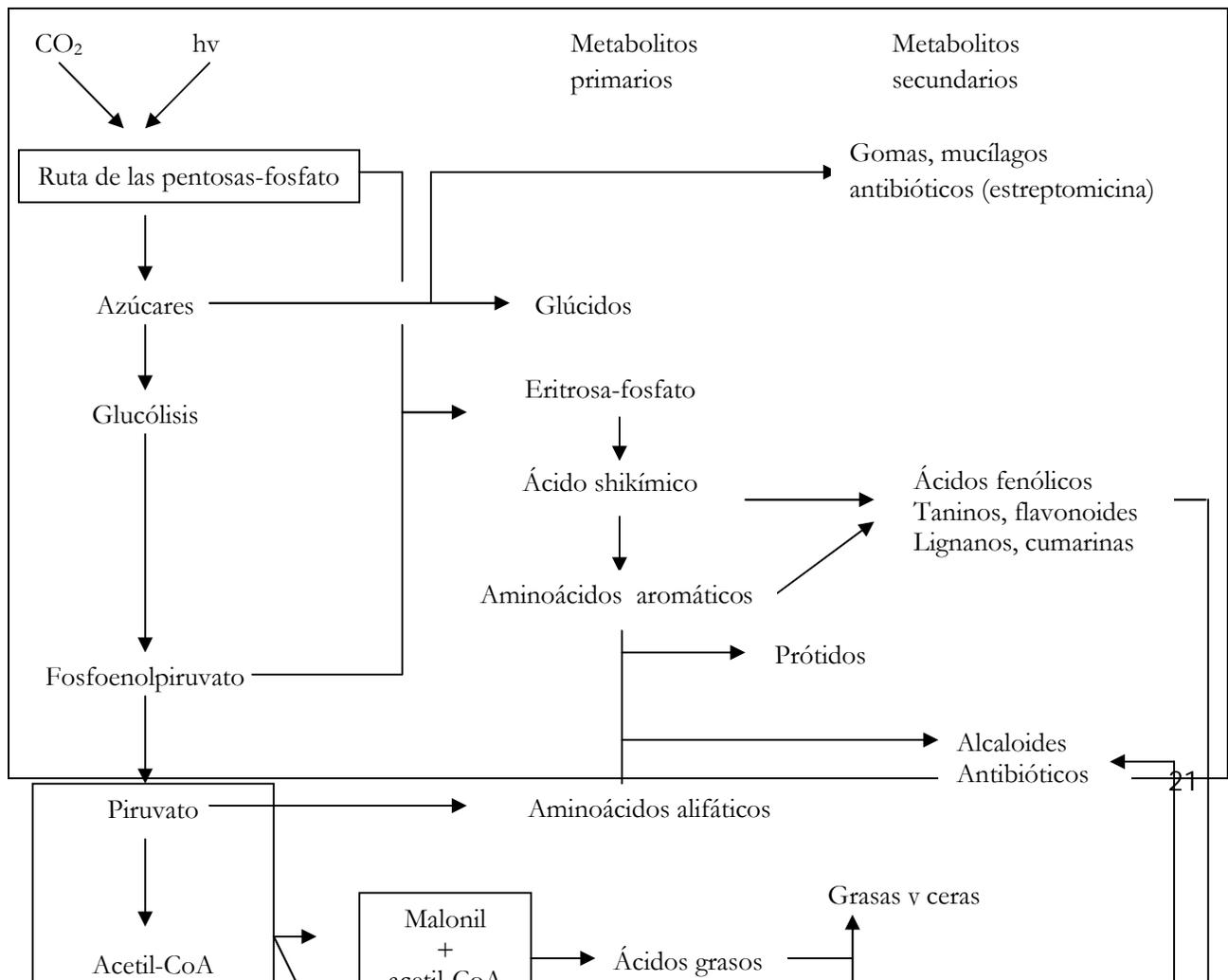




Figura 4. Rutas biosintéticas. (Tomado de Kuklinski, 2000.)

En un principio se postuló que la síntesis de MS estaba limitada a las plantas superiores, pero estudios posteriores señalaron que los MS también estaban presentes en cultivos de microorganismos y en animales (Luckner **et al**, 1984)

En los años 70 se comprobó que los MS eran una expresión de la especialización celular y que está constituía la base de su heterogeneidad química, lo cual explicaba también la distribución restringida de algunos de ellos (Anaya, 2003).

La especificidad en su producción puede incluso determinar que en los diferentes órganos de una sola planta, se encuentre una variación en el contenido de un tipo MS o tipos similares. Esto hace suponer que los compuestos secundarios tienen de una manera general, un origen similar en toda la materia viva (Anaya, 2003; Luckner **et al**, 1984).

Actualmente, con el advenimiento de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), la espectrometría de masas y la cristalografía de rayos X, la identificación estructural de los compuestos aislados es menos compleja y más rápida (Anaya, 2003).

4.7.1. FLAVONOIDES

Los flavonoides y los compuestos relacionados (antocianinas, catequinas y leucoantocianidinas) proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos (Figura 5) (Kuklinski, 2000).

Los flavonoides constituyen un extenso grupo de metabolitos secundarios que se encuentran distribuidos en la naturaleza en forma de glicosidos o agliconas. Hasta la fecha se han identificado más de 4 000 flavonoides en plantas vasculares y se encuentran sobre todo, en partes aéreas: hojas, flores y frutos. Entre las principales familias que sintetizan flavonoides están la Rutácea, la Poligonácea, la Compuestas y la Umbeléfera (Kuklinski, 2000; Barberán, 1986). La diversidad en sus estructuras químicas les confieren una amplia gama de actividades biológicas (Fernández *et al*, 2003).

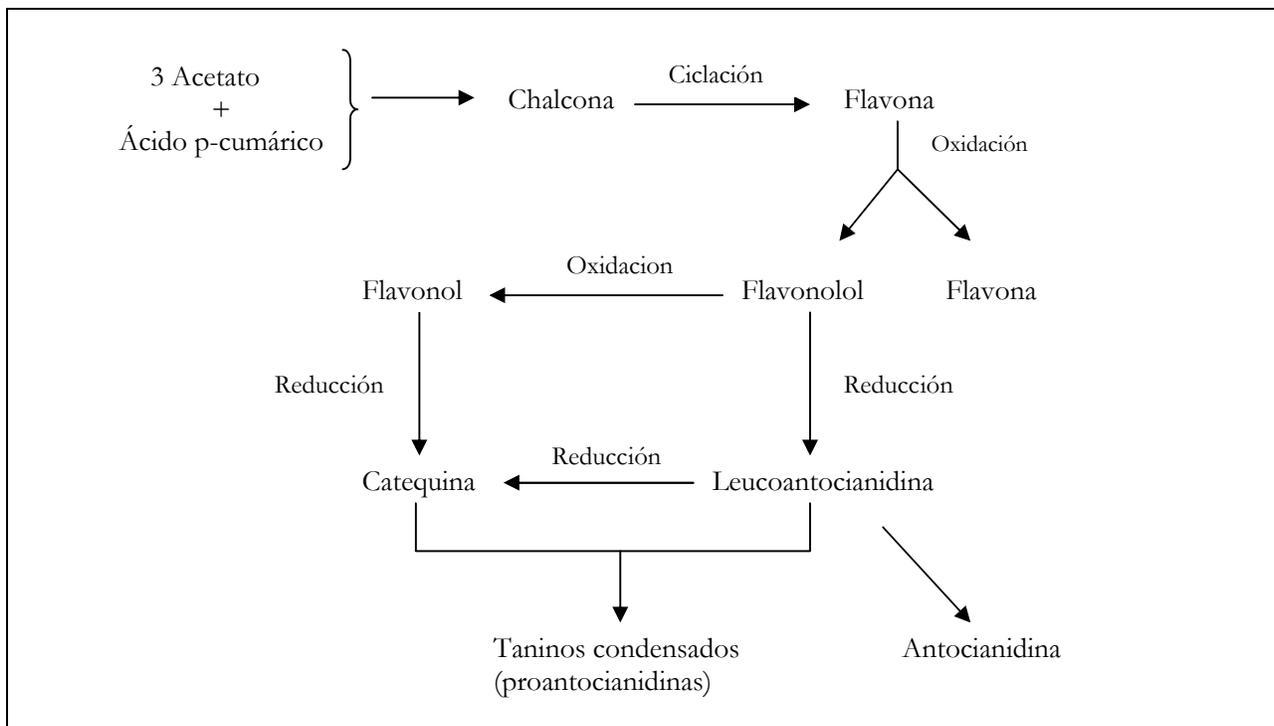


Figura 5. Origen biosintético de los Flavonoides (Tomado de Kuklinski, 2000).

Los flavonoides son metabolitos fenólicos de bajo peso molecular, constituidos por un núcleo principal de 15 átomos de carbono. Su estructura base se caracteriza por tener dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres átomos de carbono ciclada a través de un oxígeno, por lo tanto se les caracteriza por la fórmula general $C_6C_3C_6$ (Kuklinski, 2000; Martínez-Flores, 2002).

Se considera que su estructura deriva de la γ -cromona (o benzo- γ -pirona) con un residuo fenilo en posición 2. Así pues, son 2-fenil- γ -cromonas. Casi todos los flavonoides poseen un carbonilo en la posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C3 y en el anillo B. Son estructuras hidroxiladas (OH) en el anillo aromático y, por lo tanto, son polifenólicas. Se pueden sintetizar como aglicones libres o en forma de O-heterósidos o C-heterósidos, unidos generalmente a glucosa, que es el azúcar más frecuente. De los tres anillos, el anillo A se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos y el anillo B y la unidad C3 (que forma el anillo C) proceden de la ruta del ácido shikímico (Kuklinski, 2000; Martínez-Flores, 2002). En la figura 6 se muestra la estructura general de los flavonoides.

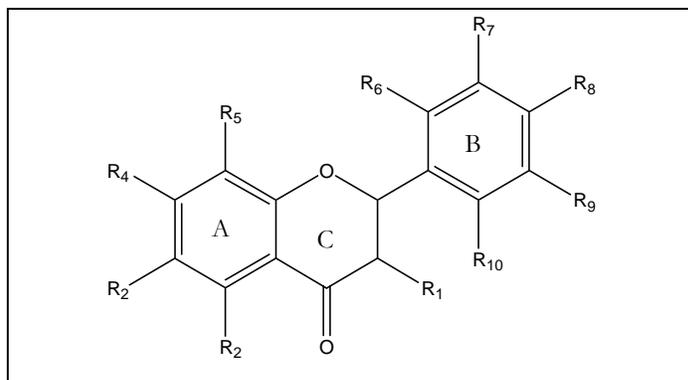


Figura 6. Estructura general de los flavonoides

Dependiendo de la variación en su estructura base, estos metabolitos se pueden clasificar en flavonoles, flavonas, flavononas, flavonoles, isoflavonas, dishidroflavonoles, antocianinas y chalconas (Figura 7) (Kunkliski, 2000).

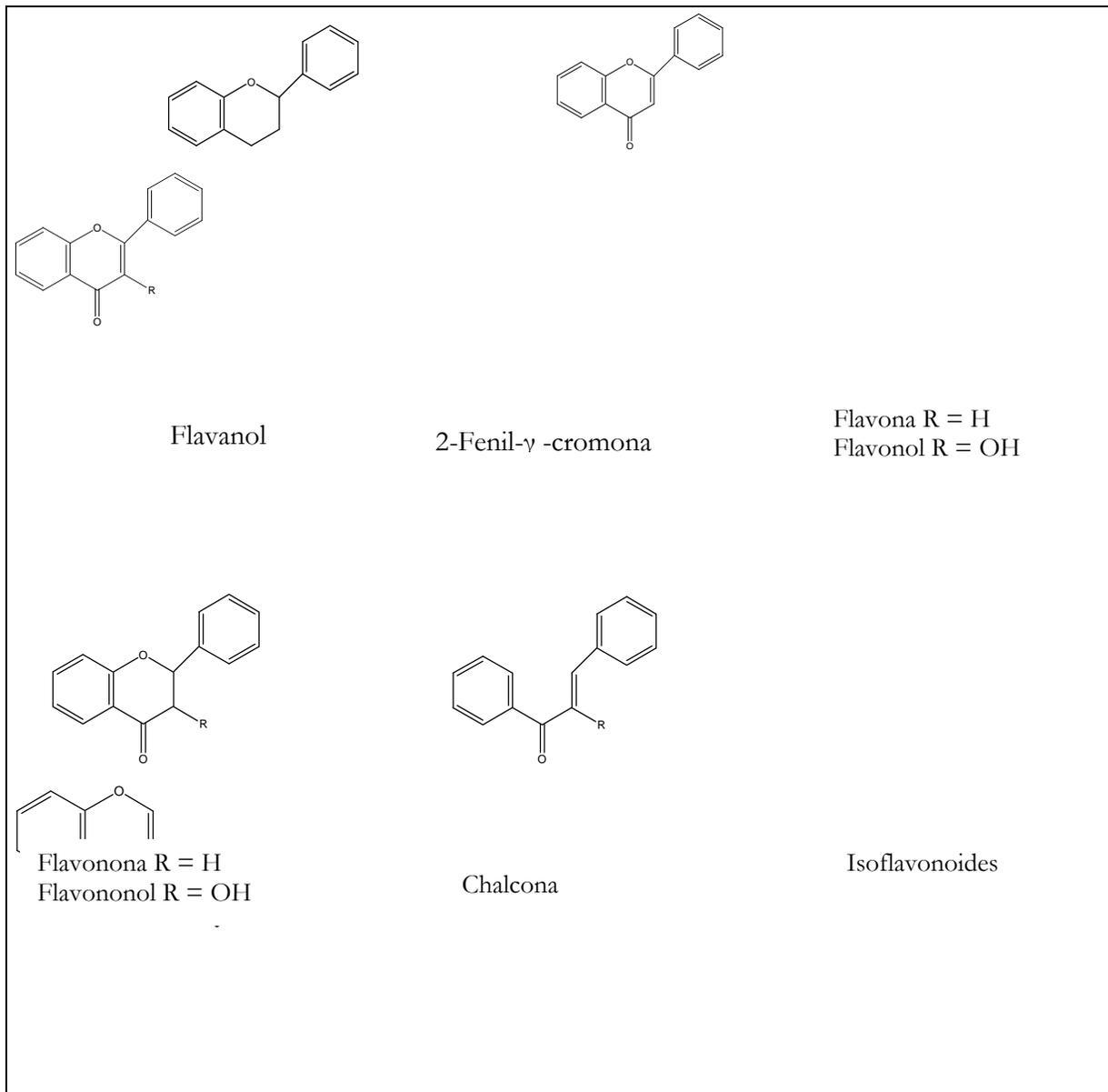


FIGURA 7. Clasificación estructural de los Flavonoides

4.7.2 IMPORTANCIA ECOLÓGICA DE LOS FLAVONOIDES

En las especies que los sintetizan, los flavonoides desempeñan varios roles. Su función parece ser vinculada a la protección contra la radiación ultravioleta, la agresión de hongos, parásitos y herbívoros, también originan estímulos que favorecen la polinización por insectos y el cambio de follaje de diversos árboles en el periodo otoñal (Fernández *et al*, 2003).

Además, pueden participar en los mecanismos de defensa y dependiendo de sus grupos funcionales y grado de oxidación, los flavonoides proporcionan a numerosas flores y algunos frutos su variedad de colores (Anaya 2003). Por ejemplo, las abejas prefieren los colores que ante los ojos humanos parecen azules y amarillos. Estos insectos son sensibles a las flavonas y flavonoles que absorben intensamente la luz UV, y que están presentes en casi todas las flores, o co-pigmentos en las flores azul-violeta. Los flavonoides constituyen el grupo de pigmentos florales más importantes de las plantas; contribuyen a los colores rojo, anaranjado y azulados, así como el amarillo y el blanco (Anaya, 2003; Dewick, 2001).

La base química de los colores cianicos, es simple; existen tres pigmentos, todos flavonoides, conocidos como antocianidinas: pelargonidina (Pg) (anaranjado-rojo), cianidina (Ci) (magenta) y delphinidina (Df) (malva); sus estructuras difieren solo en el número (1, 2 o 3) de grupos hidroxilo en el anillo B. Estos tres pigmentos, se presentan ocasionalmente mezclados (Goodwin, 1976).

Las diferentes actividades halladas para algunos flavonoides y las evidencias experimentales de que aumentan la resistencia de ciertas plantas contra diferentes infecciones y enfermedades vegetales, sugieren que estas sustancias son un mecanismo químico de defensa vegetal. Tal como los exudados de raíces de leguminosas que pueden simultáneamente actuar como supresores de ciertos hongos fitopatógenos (Anaya, 2003; Martínez, 2005).

4.7.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS FLAVONOIDES

Los flavonoides ejercen diversas acciones bioquímicas y farmacológicas, algunas de ellas sugieren que pueden alterar significativamente la función de múltiples sistemas celulares en mamíferos, de hecho se ha descrito que algunos flavonoides son particularmente beneficiosos como antioxidantes, por sus propiedades como atrapadores de radicales libres y quelantantes de iones divalente (Hollman *et al*, 1997).

Los flavonoides poseen acciones farmacológicas muy variadas entre ellas podemos enlistar:

- a) Antiescorbútico (acción similar a la vitamina P)
- b) Antihemorrágicos
- c) Antiarrítmicos
- d) Protectores de la pared vascular o capilar
- e) Antiinflamatorios
- f) Antihepatotóxicos
- g) Antibacterianos, antivíricos y antifúngicos
- h) Diuréticos y antiurémicos
- i) Antiespasmódicos
- j) Anticancerígenos (Kuklinski, 2000)

El número de estudios clínicos que evalúan los flavonoides, en la terapia humana son limitados, quizás los datos más relevantes vienen de su empleo al tratamiento de enfermedades vasculares y cáncer (Fernández **et al**, 2003)

Por otro lado, se ha descrito que las flavonas como la crisina y la apigenina, así como sus derivados semisintéticos ejercen un efecto ansiolítico sin acción sedante en ratones, y los flavonoles como la quercetina e isoquercetina aislados de las flores de *Albizzia julibrissin* ejercen efectos depresores sobre el Sistema Nervioso Central (Fernández **et al**, 2003; Viola **et al**, 1995; Barnes, 2001).

4.8. PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS EN ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

Hoy en día, la ansiedad, la depresión y otros trastornos del Sistema Nervioso Central, se han convertido en problemas de salud pública y generalmente su tratamiento consiste en la prescripción de medicamentos ansiolíticos y/o sedantes (Capistrán, 2004; Medina-Mora, 2003).

En México y en otros países se utilizan, para el tratamiento de estos trastornos, algunas plantas medicinales tales como la **Ternstroemia sylvatica** (té de tila), el **Agastache mexicana** subsp **mexicana** (toronjil morado), **Lavandula sp**, **Hypericum perforatum** (flor de San Juan o hierba de San Juan), **Matricaria chamomila** (té de manzanilla) **Salvia sp**, y **Citrus sinensis** (flor de azahar), **Valeriana officinalis** (valeriana), entre otras (Capistrán, 2004).

La hierba de San Juan es utilizada en el tratamiento de trastornos depresivos leves y moderados, sus propiedades farmacológicas pueden ser atribuidas a un compuesto llamado hipericina y a los distintos flavonoides que la componen (Barnes, 2001). Otra planta utilizada en la actualidad es el **Ginkgo biloba** el cual se emplea para el tratamiento del alzheimer (Sierpina **et al**, 2003).

Muchas de las plantas medicinales recomendadas en la actualidad contra el “nerviosismo” y los trastornos del sueño ya eran conocidas con anterioridad, sin embargo en la mayoría de los casos se utilizaban para otras trastornos. La valeriana, por ejemplo, se usaba como tranquilizante desde comienzos del siglo XIX, y en la Edad Media y durante los siglos XVI y XVII, se usaban contra el dolor de cabeza, la tos y las enfermedades de la vista (Douglas, 2001).

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

4.9. FÁRMACOS CON ACTIVIDAD SEDANTE

Un fármaco sedante es una sustancia química que deprime la actividad del SNC. Actúa disminuyendo la actividad motora, retrasa la actividad eléctrica de despolarización y fisiológicamente, causa un estado de tranquilidad en el estado de ánimo de la persona que lo recibe.

Estos compuestos son de utilidad terapéutica puesto que pueden producir efectos fisiológicos y psicológicos específicos. Los fármacos que afectan al SNC actúan de manera selectiva mediante

mecanismos mediados por receptores, para aliviar el dolor; reducir la fiebre, suprimir los trastornos del movimiento, el sueño o el estado de vigilia, reducir el deseo de comer o aliviar el impulso del vómito. Los fármacos de acción selectiva se emplean para tratar ansiedad, manía, depresión o esquizofrenia, y lo hacen sin alterar el estado de conciencia (Floyd, 1996).

Algunos fármacos sedantes deprimen al SNC de una manera dependiente de la dosis, con producción progresiva de sedación, sueño, pérdida del conocimiento, anestesia quirúrgica, coma y, por último, depresión letal de la respiración y la regulación cardiovascular (Hobbs *et al*, 1996).

Desde la antigüedad se han empleado bebidas alcohólicas y pociones que contienen láudano y diversas hierbas para inducir el sueño. El primer agente que se introdujo, a mediados del siglo XIX, de manera específica como sedante, y poco después como hipnótico, fue el bromuro. Los fármacos hidrato de cloral, paraldehído, uretano y sulfonal empezaron a usarse antes de la aparición del barbitál, en 1903, y el del fenobarbital en 1921. Su eficacia dio impulso a la síntesis y ensayos de más de 2 500 barbitúricos, de los cuales se comercializaron cerca de 50 (Hobbs *et al*, 1996; Brailowsky, 1995).

La separación parcial de las propiedades sedantes, hipnóticas y anestésicas y las propiedades anticonvulsivas que caracterizaban al fenobarbital motivó la búsqueda de agentes con efectos más selectivos en las funciones del SNC. El advenimiento de la clorpromazina y el meprobamato a principios del decenio de 1950, con sus efectos tranquilizantes en animales, y el desarrollo de métodos especializados para valorar los efectos de estos fármacos en la conducta, prepararon la escena para la síntesis del clordiazepóxido por Sternbach en 1957.

La introducción del clordiazepóxido en la medicina clínica, en 1961, abrió la era de las benzodiazepinas; se han sintetizado más de 3 000 de estos compuestos, de las cuales se ha sometido a prueba la actividad biológica de más de 120 de ellos, y cerca de 35 se encuentran en aplicación clínica en diversas regiones del mundo. (Hobbs *et al*, 1996)

4.9.1. BENZODIAZEPINAS

Las benzodiazepinas (BZ) son fármacos que poseen propiedades terapéuticas, para el tratamiento de la ansiedad y el insomnio. Dos características importantes de las BZ son que aparentemente no presenta efectos secundarios significativos y poseen una baja toxicidad, factores que han contribuido a su amplio uso terapéutico (Lawrence **et al**, 1982; Neumeyer **et al**, 1995).

La primera benzodiazepina que dio buenos resultados, fue el clordiazepóxido, el cual fue desarrollada por el grupo Sternbach en los laboratorios Roche a finales del decenio de 1950. A partir de su introducción en la clínica la investigación de los mecanismos de acción celular de las BZ se ha incrementado de manera paralela al uso de estos agentes (Lawrence **et al**, 1982; Neumeyer **et al**, 1995).

Las benzodiazepinas son bases orgánicas que comparten una estructura compuesta por un anillo de benceno, el cual esta unido a un anillo de diazepina de siete miembros. Cada benzodiazepina específica, se forma por la sustitución de diversos radicales, en diferentes posiciones de la estructura, entre ellos están el clobazam, brotizolam, prazepam, oxazepam, etc (Hobbs **et al**, 1996).

Actualmente, las benzodiazepinas se encuentran entre los fármacos prescritos con mayor frecuencia en todo el mundo, producen cuatro efectos:

- 1) Ansiolítico
- 2) Hipnótico
- 3) Relajante muscular
- 4) Anticonvulsivo (Charles, 1996).

El efecto más importante lo ejercen en el sistema límbico e hipocampo del lóbulo temporal. Bloquean la estimulación del sistema nervioso que se origina en el sistema reticular, y disminuyen la actividad en las áreas asociadas con la emoción, tales como la región septal, amígdala, hipocampo e hipotálamo, alcanzando el umbral convulsivo al incrementar la frecuencia y actividad de las ondas cerebrales (Martínez 1996).

4.9.1.1. DIAZEPAM

El diazepam (valium) es un fármaco derivado de la 1,4-benzodiazepina. En 1966 se utilizó como anestésico endovenoso. Desde entonces ha tenido aceptación universal en diferentes ramas de la medicina. Presenta propiedades ansiolíticas, miorrelajantes, anticonvulsivantes y sedantes; es usado para tratar estados de ansiedad, tensión, estado epiléptico, premedicación anestésica y es la benzodiazepina más efectiva para el tratamiento de espasmos musculares (Figura 8) (Hobbs **et al**, 1996).

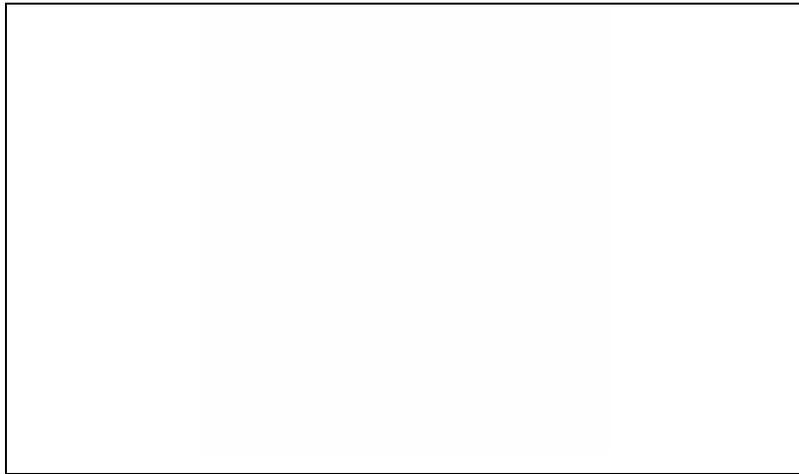


Figura 8. Estructura química del Diazepam

4.9.2. BARBITÚRICOS

Los barbitúricos son una familia de fármacos sedantes sintetizados por primera vez en Alemania en 1882 (McKim, 1991). Los barbitúricos deprimen con carácter reversible la actividad de todos los tejidos excitables, el SNC es particularmente sensible. Estos fármacos tienen acción depresora mínima sobre la respiración y la circulación, y rara vez causan náusea y vómito (Sean **et al**, 1996).

Todos los barbitúricos son derivados del ácido barbitúrico (2,4,6-trioxohexahidropirimidina). Este compuesto carece de actividad depresiva central, pero la presencia de grupos alquilo o arilo en lo posición 5 le confieren actividades sedantes y, en ocasiones de otros tipos (Hobbs **et al**, 1996) Se han postulado diversas clasificaciones para los barbitúricos, según la duración de su acción:

- Acción Prolongada: Fenobarbital.
- Acción Intermedia: Amobarbital.
- Acción Media-corta: Secobarbital, pentobarbital.
- Acción Ultracorta: Tiopental, metohexital.

Los barbitúricos de acción ultracorta son muy liposolubles, distribuyéndose rápidamente por el SNC y posteriormente al resto de los tejidos. Administrados por vía parenteral, su efecto comienza inmediatamente y tiene una duración inferior a una hora; por lo que tienen un papel predominante en anestesia. Los barbitúricos de acción corta, tienen una liposolubilidad intermedia y se usan como ansiolíticos y sedantes. Los de acción larga, son relativamente poco liposolubles y se usan principalmente como anticonvulsiantes. Dado que solo ciertos agentes específicos son utilizados hoy en día, esta clasificación tiene poca importancia clínica actual (Riggs **et al**, 1991).

4.9.2.1. PENTOBARBITAL

El pentobarbital (Nembutal) es un barbitúrico de acción media, derivado del ácido barbitúrico, tiene aspecto de un polvo blanco o gránulos cristalinos. Es soluble en agua y alcohol (Plumb, 1995; Hilbery **et al**, 1992). Deprime de diferentes formas al SNC, desde sedación ligera hasta estado de coma, también deprime la corteza cerebral y al tálamo y las áreas motoras y sensoriales del cerebro. Produce acción sobre el sistema reticular activador incapacitando a los animales para

levantarse o mantenerse en estado de alerta, además de que carece de capacidad de amortiguar el dolor.

El pentobarbital tiene propiedades sedantes e hipnóticas. Algunas de sus aplicaciones terapéuticas son para insomnio, sedación preoperatoria, tratamiento de urgencia de las convulsiones (Figura 9) (Sumano **et al**, 1997, Meyer **et al**, 1982).

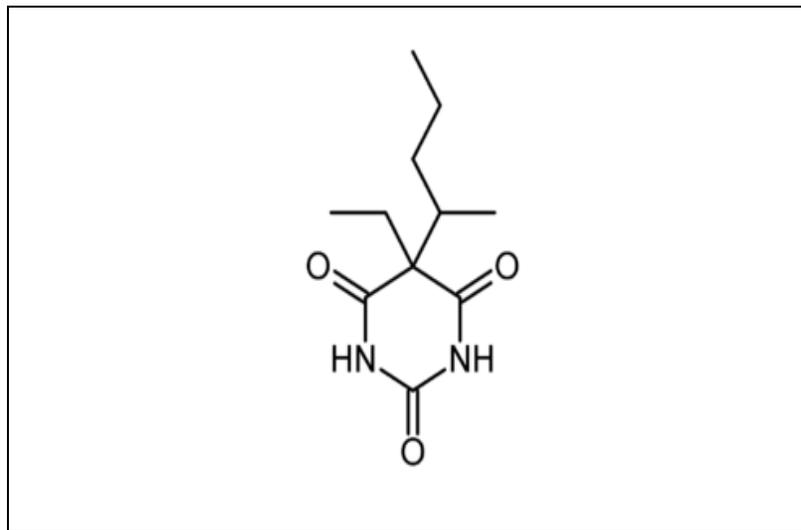


Figura 9. Estructura química del Pentobarbital

4.9.3. SUEÑO

Siempre ha existido un gran interés en los procesos del sueño, principalmente con el descubrimiento de la actividad eléctrica del cerebro, de los mecanismos que inducen los procesos de sueño-vigilia, de los procesos circadianos y del conocimiento de la existencia de los movimientos oculares rápidos. En particular, existen trastornos del sueño que generan un impacto en la salud

pública mental, tanto en México como en otros países, y que generalmente no son detectados, ni tratados (Kleitman, 1939)

El sueño se considera un estado de inconsciencia, durante el cual, hay una disminución de la actividad motora y capacidad de respuesta al medio (Kleitman, 1939; Peraita-Adrados, 2005). Se cree que la función fundamental del sueño es restablecer el equilibrio natural de las diferentes partes del SNC. El sueño es esencial y universal, necesario para la supervivencia, se reconocen tres características básicas:

- a) El sueño es un proceso cerebral
- b) Es un proceso activo
- c) No es un proceso simple, tiene características propias y factores que lo regulan (Hirkowitz et al, 2002).

El sueño tiene múltiples funciones, aunque ellas pueden manifestarse en los diferentes niveles de organización, por ejemplo, social, conductual, celular, sub-celular (Ramos, 1996). Existen diversos trastornos que pueden afectar el curso normal del sueño, factores como el estrés, la elevada activación del organismo o la depresión. Debe destacarse que el insomnio es una de los más comunes motivos de consulta en Atención Primaria, pues su prevalencia como afección transitoria puede ser de 18 a 27 %, mientras que se acerca al 10 % como entidad crónica (Páez, 2000).

5. HIPÓTESIS

Se ha informado que un extracto hidroalcohólico de hojas de *Casimiroa edulis* obtenido a temperatura de ebullición, presenta efecto sedante, por lo tanto es posible suponer que los metabolitos secundarios mayoritarios aislados de este extracto posean actividades sedantes.

6. JUSTIFICACIÓN

Casimiroa edulis es una especie que se usa, desde tiempos de la colonia, en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de trastornos del sueño. En la actualidad, debido a sus supuestas actividades ansiolíticas y sedantes, el uso de esta especie, se ha visto incrementado por grandes sectores de la sociedad mexicana. Este empleo masivo ha suscitado el interés de estudiar las propiedades biológicas de esta especie. Así, evaluaciones farmacológicas han demostrado que extractos del fruto y las semillas poseen actividad sedante. Aún más, recientemente se ha informado de las propiedades sedantes de un extracto hidroalcohólico, de las hojas, obtenido a la temperatura de ebullición de una mezcla de disolventes. Tomando en cuenta lo anterior y con el fin de aportar mayor información acerca de las propiedades sedantes, así como de la composición química de estos extractos se decidió estudiar la actividad sedante así como la composición química de varios extractos obtenidos utilizando disolventes de diferente polaridad.

7. OBJETIVOS

General:

Evaluación de las propiedades sedantes, de extractos de diferente polaridad obtenidos de las hojas de *C. edulis*, en un modelo de sueño inducido por pentobarbital sódico.

Particulares:

- a) Obtención de extractos hidroalcohólicos a temperatura ambiente (EHTA) y a temperatura de ebullición (EHTE) de hojas de *C. edulis*.
- b) Determinar los efectos sedantes, en un modelo de sueño inducido por pentobarbital, de los extractos hidroalcohólicos EHTE y EHTA.
- c) Obtención de extractos metanólicos (EHTEM, EHTAM) y diclorometanos (EHTED y EHTAD), a partir de los extractos hidroalcohólicos EHTE y EHTA.
- d) Determinar los efectos sedantes, en un modelo de sueño inducido por pentobarbital, de los extractos metanólicos (EHTEM, EHTAM) y diclorometanos (EHTED, EHTAD), obtenidos de los extractos EHTE y EHTA.
- e) Aislamiento y elucidación estructural de los principales metabolitos secundarios presentes en el extracto EHTE.
- f) Determinar los efectos sedantes de los metabolitos secundarios aislados del extracto EHTE en la prueba de potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico.

8. METODOLOGÍA

8.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO

8.1.1. Colecta del material biológico

El material biológico empleado para este estudio fue colectado en los alrededores del pueblo Milpa Alta, Delegación Milpa Alta, México D.F. Se recolectaron hojas verdes sanas (sin mostrar evidencia de plagas o ataques de microorganismos) y de color uniforme. El material se colocó en bolsas de plástico para su transporte al laboratorio. Se colectaron también ejemplares que fueron depositados en el Herbario Nacional de México, (MEXU516675).

8.1.2. Preparación del extracto hidroalcohólico a temperatura de ebullición (EHTE)

Hojas secas y molidas (500 g) de *C. edulis*, se colocaron en un matraz redondo con 4 000 mL de una mezcla etanol-agua destilada (6:4). La mezcla se mantuvo en ebullición durante 30 min. Pasado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró con papel Watman No.1. De esta manera se obtuvo una solución y un residuo vegetal, el cual fue tratado de la misma forma por tres veces consecutivas. Se reunieron todas las soluciones y el disolvente fue evaporado a presión reducida en un rotavapor Büchi B-480. Se calculó el rendimiento a partir del material vegetal inicial.

8.1.3. Preparación del extracto hidroalcohólico a temperatura ambiente (EHTA)

Para la obtención del EHTA el material vegetal (500 g) se dejó en maceración con la mezcla de disolventes durante 24 horas a temperatura ambiente. El proceso se repitió tres veces. Se reunieron todas las soluciones y el disolvente fue evaporado a presión reducida en un rotavapor Büchi B-480. Se calculó el rendimiento a partir del material vegetal inicial.

8.1.4. Obtención de los extractos metanólicos y de diclorometano a partir de EHTE

Una alícuota del extracto EHTE (50 g) se disolvió completamente con una mezcla metanol-agua y se extrajo con diclorometano (5 X 250 mL). Cabe señalar que durante el proceso de separación se precipitó un sólido verde-amarillento (78%).

Las dos fases fueron separadas por medio de un embudo de separación. La evaporación de los disolventes a presión reducida proporcionó los extractos de metanol (EHTEM) y de diclorometano (EHTED), respectivamente.

8.1.5. Obtención de los extractos metanólicos y diclorometanos del EHTA

De manera similar (vide supra) se obtuvieron los extractos de metanol (EHTAM) y de diclorometano (EHTAD) a partir del extracto EHTA.

8.1.6. Cromatografía del extracto hidroalcohólico a temperatura de ebullición EHTE

El extracto EHTE (31 g) fue sometido a cromatografía en columna abierta (CC), empleando como fase estacionaria gel de sílice (MN-KieSelgel G), en una proporción de 1:3 con respecto al peso del extracto. Como fase móvil se utilizaron mezclas de polaridades ascendentes de hexano, hexano-acetato de etilo (9:1, 8:2, 7:3, 1:1, 3:7), acetato de etilo, acetato de etilo-metanol (7:3, 1:1, 3:7) y metanol. Se colectaron 186 fracciones de 250 mL. Se reunieron las fracciones que presentaron patrones semejantes en cromatografía de capa fina (CCF). Las placas de CCF se realizaron en cromatofolios de aluminio cubiertos de gel de sílice con un espesor de 0.2 mm. Como reveladores se emplearon Sulfato cérico (Ce_2SO_4) y una lámpara de luz UV.

8.1.7. Purificación e identificación de los compuestos aislados

Los compuestos aislados mediante la columna cromatográfica del extracto EHTE fueron purificados por repetidos procesos de cristalización. La identificación de estos compuestos se llevó a cabo a través de espectrometría de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H , y carbono 13 (^{13}C), espectrometría de masas (EM), y difracción de rayos X.

Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Nicolet FT-5X en pastilla con KBr y solo se describen bandas en cm^{-1} . Los espectros de masa (EM) se determinaron en un espectrómetro JEOL AX505HA, mediante técnicas de impacto electrónico a 70 eV o por ionización química utilizando metano para producir iones. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se obtuvieron en un equipo Varian Gemini 200 MHz y Eclipse 300 MHz Jeol. La difracción de monocristales de rayos X se determinaron en un difractorómetro Bruker Smart APEX AXS CCD. El punto de fusión se determinó en un aparato Fisher-Johnes.

8.1.8. Cromatografía Líquida de Alto Resolución (CLAR)

Se realizó un estudio comparativo de los seis extractos (EHTE, EHTEM, EHTED, EHTA, EHTAM y EHTAD) de las hojas de *Casimiroa edulis* y la rutina, por cromatografía líquida de alto desempeño (CLAR). La determinación se realizó en un cromatógrafo Waters Modelo 600, con un detector de diodos Waters modelo 996. Se utilizó una columna Nucleosil 100-5C8HD 5 μ m x 250 mm x 4 mm. La velocidad de flujo fue de 1.0 mL/min. El tiempo de análisis fue de 25 min; se utilizó un detector UV a 254 nm. Como solvente de elución se empleó acetonitrilo (CH₃CN) y agua.

8.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEDANTE

La evaluación de la actividad sedante de los extractos se realizó en el laboratorio de fitofarmacología del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, bajo la dirección de la M. en C. Rosa Estrada Reyes.

8.2.1. Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa Swiss Webster de 6 a 10 semanas de edad, de aproximadamente 32-40 g de peso. Se alojaron en grupos de 7-8 animales en cajas de polipropileno de 44 x 21 x 21 cm, en condiciones de ciclo invertido de luz-oscuridad (12:12 h) de manera artificial, en un cuarto con temperatura de 22 \pm 2°C y con agua y alimento ad libitum. Todos los animales fueron proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”. Los animales fueron tratados de acuerdo a los protocolos de manejo de animales de laboratorio.

8.2.2. Prueba de potenciación de sueño inducido con pentobarbital (pb)

La prueba de potenciación de sueño inducido con pentobarbital sódico se empleó para evaluar la actividad sedante de los extractos (EHTE, EHTEM, EHTED, EHTA, EHTAM y EHTAD) y los metabolitos aislados. Las disoluciones se prepararon disolviendo cada uno de los extractos en solución salina isotónica (SSI) NaCl 0.9% y Tween 80 Sigma al 10% como vehículo. Las disoluciones de pentobarbital sódico Sigma se prepararon disolviéndolo en SSI NaCl 0.9% y Tween al 1%. En esta prueba se emplea como control positivo al diazepam (DZ), el cual se disuelve en polipropilenglicol (Pg) al 1% en solución salina. Todas las disoluciones se prepararon antes de iniciar la prueba.

8.2.3. Administración de los extractos de *Casimiroa edulis*.

Para el diseño experimental, la población de ratones utilizada se dividió al azar en dos grupos: el control y el de tratamiento; con número de 7-8 ratones cada uno. La prueba consiste en dos etapas experimentales; en la primera se administró por vía intraperitoneal (ip) los extractos o compuestos, a diferentes dosis (Cuadro 1). Después de 60 min de la administración del extracto o compuestos se administró el pentobarbital sódico por la misma vía a una dosis de 34 mg/kg de peso. Inmediatamente después, el ratón se colocó en una caja de polipropileno 30 x 21 x 21 con aserrín y se observó cuidadosamente el tiempo de latencia de sedación, tiempo de sueño y muerte en caso de presentarse. Los grupos control recibieron el mismo tratamiento, a diferencia de que únicamente se le administro el vehículo (Tween 80 al 1% en SSI) y después de 60 min de la administración se dosificó el PB.

Extracto y compuestos	Dosis (mg/kg)
EHTE	500 y 1000
EHTEM	500 y 1000
EHTED	500 y 1000
EHTA	500 y 1000
EHTAM	500 y 1000
EHTAD	500 y 1000
N-Metilprolina	100

Cuadro 1. Dosis administradas

8.2.4. Administración del diazepam (DZ)

Para la administración del DZ se utilizaron seis ratones. Primero se administró por vía intraperitoneal 1.0 mg/kg de diazepam, después de una latencia de 30 min se administró el pentobarbital sódico por la misma vía a una dosis de 34 mg/kg de peso. Inmediatamente después, el animal se colocó en una caja de polipropileno con aserrín y se observó cuidadosamente el tiempo de latencia de sedación y tiempo de latencia de sueño. Debido a que el DZ es un fármaco utilizado como agente sedante se tomó como control positivo. El tiempo de latencia de sedación se consideró como el tiempo que transcurrió desde la administración del PB y la pérdida de coordinación locomotriz; el tiempo de sueño, es el tiempo que transcurrió desde la pérdida del reflejo de enderezamiento y su recuperación.

2.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en todos los experimentos de actividad sedante fueron analizados estadísticamente y expresados como la media \pm el error estándar medio. Para determinar si existen diferencias significativas entre el control y los grupos experimentales, se utilizó un análisis de varianza de Kruskal Wallis en rangos, seguido de la prueba pareada de Mann-Whitney ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ y $p^{***} < 0.001$). Valores de $P < 0.05$ se consideraron como significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Sigmastat 2.0.

9. RESULTADOS

9.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO

9.1.1. Rendimiento

El rendimiento del extracto hidroalcohólico obtenido a temperatura de ebullición (EHTE) y a temperatura ambiente (EHTA) de hojas de *C. edulis*, se cuantificaron a partir del material vegetal extraído (Cuadro 2).

Extractos	Peso de material vegetal (g)	Rendimiento (g)	Rendimiento (%)
EHTE	500	135.45	27.09
EHTA	500	112.95	22.59

Cuadro 2. Rendimiento de los extractos EHTE y EHTA de *Casimiroa edulis*

De acuerdo a los resultados previamente publicados (Mora, S. et al 2005), donde se empleó el mismo método de preparación del extracto EHTE, se informó de un rendimiento de 12.98%, sin embargo en la presente investigación el rendimiento fue de 27.09%.

Por otro lado, cabe señalar que los extractos EHTA y EHTE fueron disueltos con una mezcla de agua y metanol, posteriormente estas soluciones fueron extraídas con CH_2Cl_2 . Sin embargo, durante el proceso de partición del EHTE se precipitó un sólido de color verde-amarillento (PTE) que representó un 78 % del total del extracto inicial. En contraste el tratamiento del extracto EHTA, no formó ningún precipitado. El espectro de IR de PTE mostró bandas para grupos OH y dobles ligaduras (Espectro 8). La separación e identificación de los compuestos presentes en PTE, están más allá de los objetivos del presente trabajo.

Para los extractos EHTEM y EHTED el rendimiento se calculo a partir de 11 g. Mientras que los extractos EHTAM y EHTAD el rendimiento se calculo a partir de 50 g del extracto (Cuadro 3).

Extractos	Rendimiento en (g)	Rendimiento (%)
EHTEM	7.81	74.5614
EHTED	2.75	25.4386
EHTAM	31.52	63.0506
EHTAD	18.47	36.9494

Cuadro 3. Rendimiento de los extractos EHTEM, EHTED, EHTAM y EHTAD.

El rendimiento de la N-metilprolina y la rutina se calculo como un porcentaje del total de extracto separado por columna (31 g) (Cuadro 4).

Compuestos	Rendimiento (%)
N-Metilprolina	0.05161
Rutina	0.04354

Cuadro 4. Rendimiento de los metabolitos secundarios aislados del EHTE de *Casimiroa edulis*.

9.2. Evaluación de la actividad sedante

Para la evaluación de la actividad sedante de los diferentes extractos se determinaron los siguientes parámetros:

- Latencia de sedación, considerada como el tiempo en minutos que transcurrió entre la administración de PB y la pérdida de coordinación locomotriz.
- Tiempo de sueño, definido como el tiempo que transcurre entre la pérdida de reflejo de enderezamiento y su recuperación. (Mora 2005)

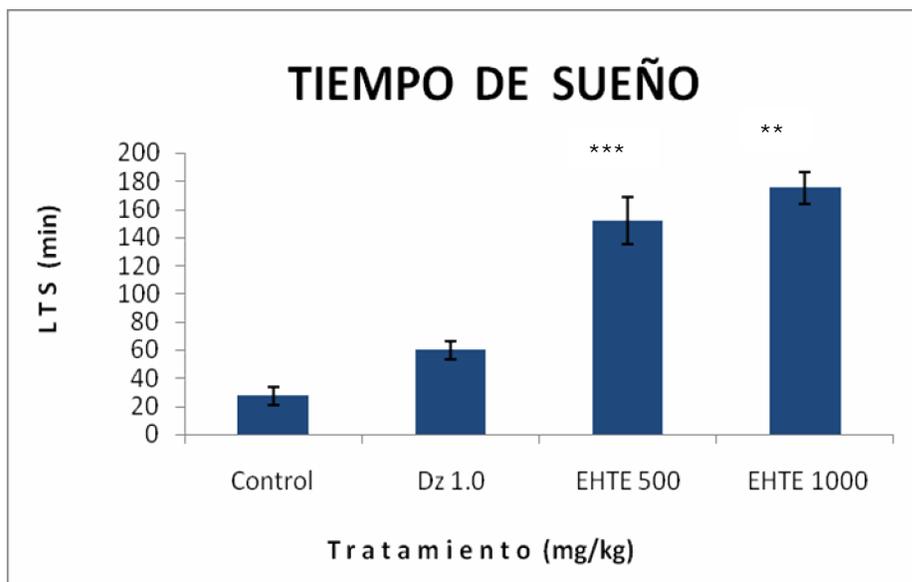
9.2.1. Determinación de latencia de sedación.

Los resultados de la latencia de sedación, inducida con PB (42 mg/kg), de los extractos EHTE, EHTEM, EHTA y EHTAM indican que no hay diferencia significativa con respecto al control, para ninguna de las dosis probadas (Cuadros 5 y 6).

9.2.2 Determinación de tiempo de sueño.

Los resultados del tiempo de sueño indican que los extractos EHTE, EHTEM, EHTA y EHTAM aumentan de manera significativa el tiempo de sueño inducido con PB (42 mg/kg), con respecto al control (Gráficas 1-4 y cuadros 5 y 6).

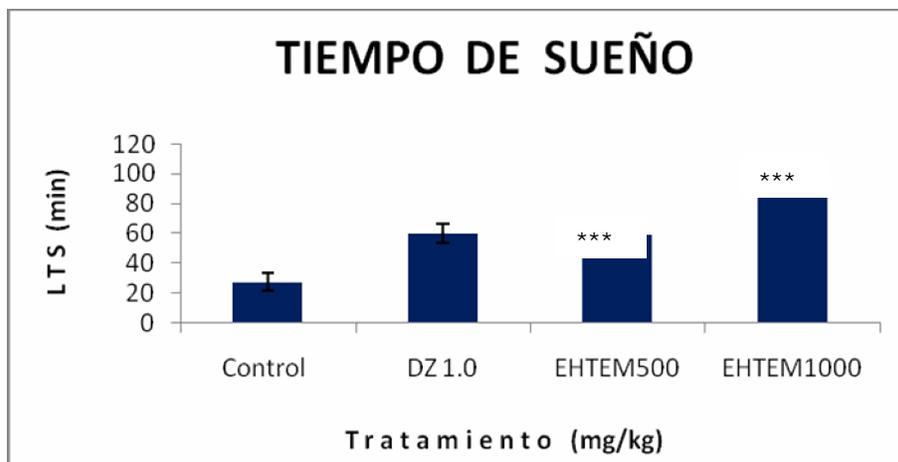
Es importante señalar que a la dosis de 1000 mg/kg del EHTE y posterior a la administración del PB el 75% de los animales de prueba fallecieron (Cuadro 5).



Grafica 1. Tiempo de sueño del EHTE inducida con PB (42 mg/kg).

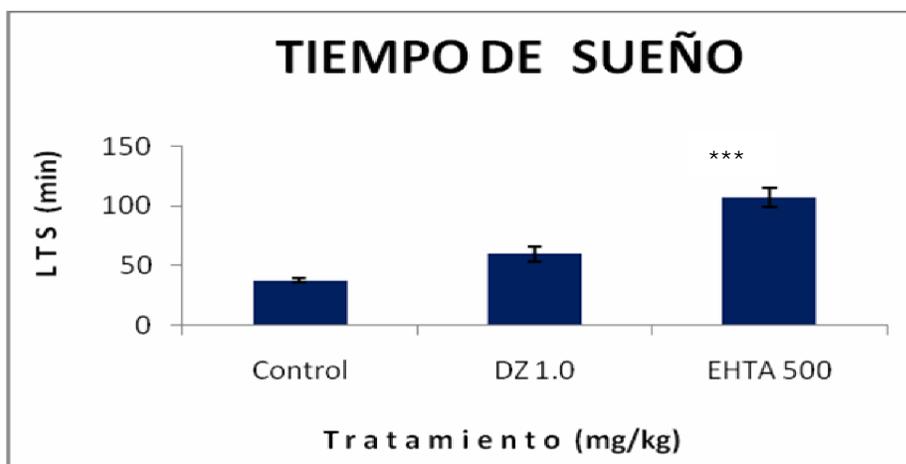
Mora, S. y colaboradores (2005), emplearon el mismo método de inducción de sueño con PB a una dosis de 1000 mg/kg de peso, informando que el extracto EHTE aumento significativamente la duración de tiempo de sueño inducido con PB, sin embargo, Mora no reporta alguna muerte de los animales de prueba, esto quizá, se deba a que a la administración de los extractos, en el estudio previo fue por vía oral, y en la presente investigación se hizo por vía intraperitoneal.

De la misma forma que el extracto EHTE, el extracto EHTEM incrementa significativamente el tiempo de sueño inducido por PB, como se puede ver en la grafica 2. Es importante hacer notar que a diferencia del extracto EHTE, este extracto no provoca la muerte de ninguno de los animales de prueba (cuadro 5).



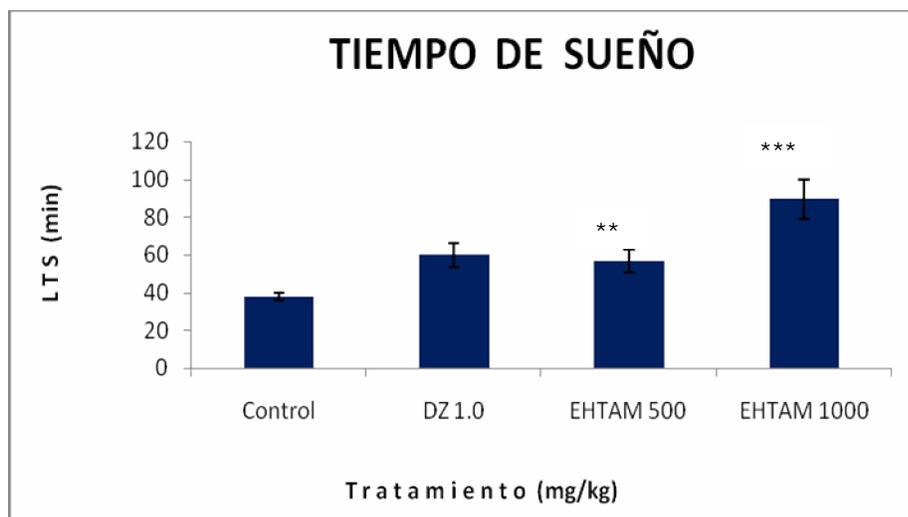
Grafica 2. Tiempo de sueño del EHTEM inducida con PB (42 mg/kg). Los valores marcados con * son estadísticamente significativos con respecto al control.

Por otro lado, el extracto EHTA produjo un incremento muy significativo en el tiempo de sueño en ambas dosis (500 y 1000 mg/kg). Cabe señalar que a la dosis de 1000 mg/kg los animales de prueba durmieron más de 24 horas y no produjeron ninguna muerte en los animales de prueba (gráfica 3).



Gráfica 3. Tiempo de sueño del EHTA inducida con PB (42 mg/kg). Los valores marcados con * son estadísticamente significativos con respecto al control.

Los animales administrados con el extracto EHTAM en la prueba de pentobarbital, mostraron un aumento en el tiempo de sueño a ambas dosis 500 y 1000 mg/kg de peso (gráfica 4).



Grafica 4. Tiempo de sueño del EHTAM inducida con PB (42 mg/kg). Los valores marcados con * son estadísticamente significativos con respecto al control.

9.2.3. Resultados de la actividad sedante de los extractos EHTED y EHTAD

A diferencia de los extractos EHTA, EHTAM, EHTE y EHTEM, los extractos EHTED y EHTAD mostraron ser tóxicos a los animales de prueba. La administración de 1000 mg/kg de EHTED ó EHTAD produjo la muerte, aproximadamente en 8 minutos, de todos los animales tratados. Por otro lado, la administración de 500 mg/kg de cualquiera de los dos extractos también produjo la muerte de todos los animales tratados, pero en aproximadamente 16 minutos. La muerte de los animales de prueba se caracterizo por fallas respiratorias, además de repetidas crisis convulsivas.

Los resultados de la prueba de actividad sedante inducida con PB indican que los extractos EHTA, EHTAM, EHTE y EHTEM de *Casimiroa edulis* incrementan de forma significativa el tiempo de sueño, tanto a dosis de 500 como de 1000 mg/kg. Mientras que no se observo diferencia significativa en el tiempo de latencia. En el Cuadro 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos al administrar los diferentes extractos a los ratones.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de sedación (min.)	Tiempo de sueño (min.)	Muerte (%)
Control	0	1.760 ± 0.105	27.367 ± 5.987	—
Diazepam	1.0	2.227 ± 0.379	59.860 ± 6.638	—
EHTE	500	1.463 ± 0.211	***152.180 ± 16.896	—
	1000	1.320 ± 0.116	**175.100 ± 11.065	75
EHTEM	500	1.441 ± 0.203	***59.149 ± 6.853	—
	1000	1.953 ± 0.208	***97.973 ± 5.828	—
EHTED	500	—	—	100
	1000	—	—	100

Cuadro 5. Resultados de la prueba de actividad sedante. Los valores que se muestran en la tabla representan el valor promedio ± el error estándar de grupos de 7-8 animales. *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de sedación (min.)	Tiempo de sueño (min.)	% muerte
Control	0	1.529 ± 0.125	37.989 ± 1.960	—
Diazepam	1.0	2.227 ± 0.379	59.860 ± 6.638	—
EHTA	500	1.356 ± 0.138	***106.859 ± 8.034	—
	1000	1.693 ± 0.0985	>24 horas	—
EHTAM	500	3.103 ± 0.907	**56.889 ± 6.094	—
	1000	2.203 ± 0.480	***89.399 ± 10.485	—
EHTAD	500	—	—	100
	1000	—	—	100

Cuadro 6. Resultados de la prueba de actividad sedante. Los valores que se muestran en la tabla representan el valor promedio ± el error estándar de grupos de 7-8. *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001

9.2.4. Aislamiento, separación y purificación de metabolitos presentes en el extracto EHTE de hojas de *C. edulis*.

El extracto hidroalcohólico obtenido a temperatura de ebullición (EHTE) de las hojas de *Casimiroa edulis* se separó por cromatografía en columna, en total se colectaron 186 fracciones de 250 mL (Cuadro 7).

Eluyente	Proporción (%)	No. Fracciones
Hexano	100	1-10
Hex-AcOEt	90/10	11-28
Hex-AcOEt	80/20	29-44
Hex-AcOEt	70/30	45-60
Hex-AcOEt	50/50	61-80
Hex-AcOEt	30/70	81-88
AcOEt	100	89-99
AcOEt-MeOH	70/30	100-119
AcOEt-MeOH	50/50	120-139
AcOEt-MeOH	30/70	140-159
MeOH	100	160-186

Cuadro 7. Fracciones colectadas de la columna del EHTE

De las fracciones 105-107 eluidas con una mezcla de AcOEt:MeOH (7:3) se aisló la rutina (Fig.10) 135 mg, como un sólido de color amarillo, con p. f. 180 - 188 °C. Fórmula molecular: $C_{27}H_{30}O_{16}$ y peso molecular, determinado por espectrometría de masas, de 606 g/mol. La identificación de este compuesto se logro por comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con aquellas informadas en la literatura (Espectro 1). (Wenkert et al, 1997; Lallemand et al, 1977)

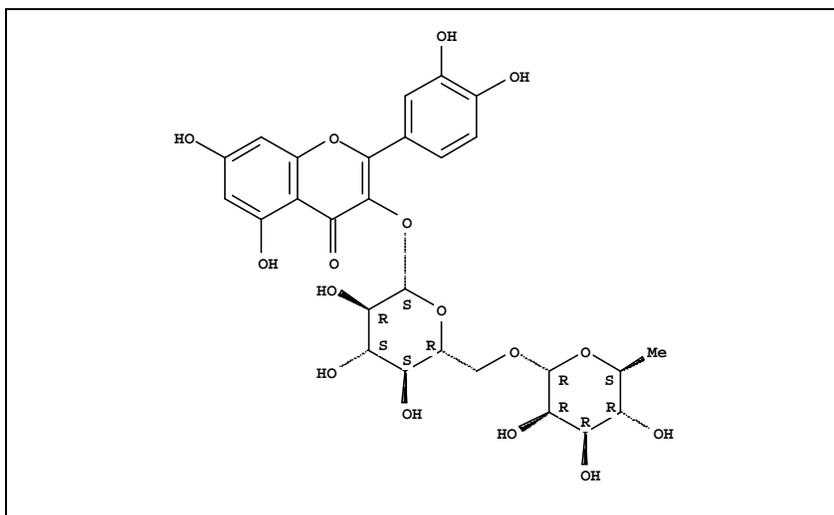


Figura 10. Estructura química de la Rutina

De las fracciones 121-122 eluidas con una mezcla de AcOEt:MeOH (1:1) se aisló la N-metilprolina (Fig.11) 160 mg, como un sólido cristalino, de color blanco con punto de fusión de 140 - 145 °C. Fórmula molecular: $C_6 H_{11} NO_2$ y peso molecular de 129 g/mol. La identificación de este compuesto se logro por métodos espectroscópicos y difracción de rayos X (Espectro 4). (Magos et al, 1999)

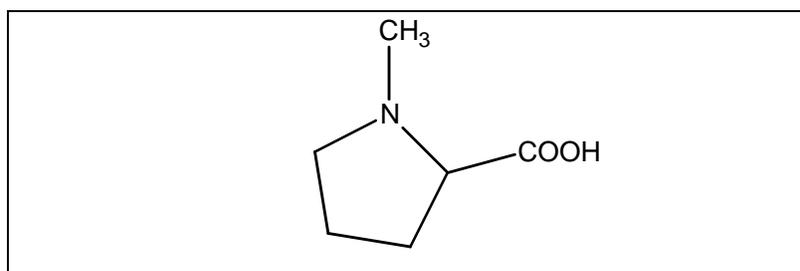


Figura 11. Estructura química de la N-metilprolina

9.3. Análisis de CLAR

Los resultados del análisis de los extractos por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) se muestran en el Cuadro 8. Como se puede observar la rutina (tiempo de retención: 10.5 min) esta presente en los extractos EHTE, EHTA, EHTEM, EHTAM.

Extracto y Compuesto	Tiempo de retención (min)	% área	Figura
EHTE	10.8	23.89	14
EHTEM	10.9	15.63	
EHTA	10.5	26.47	13
EHTAM	10.8	19.89	
Rutina	10.5	95.83	12

Cuadro 8. Resultados del CLAR de los extractos EHTE, EHTEM, EHTA, EHTAM y de la Rutina

Los resultados del análisis CLAR de EHTED y EHTAD indicaron que la rutina no esta presente en estos extractos. Sin embargo, se observo la presencia en EHTED de un componente mayoritario que tiene un tiempo de retención de 16 minutos, mientras que en EHTAD se observo un producto mayoritario con un tiempo de retención de 17 minutos (Cuadro 9). Es probable que dichos compuestos sean los responsables de la toxicidad que mostraron estos extractos en las pruebas de actividad sedante.

Extracto y Compuesto	Tiempo de retención (min)	% área	Cromatograma
EHTED	16.8	28.98	16
EHTAD	17.2	36.85	15

Cuadro 9. Análisis de los resultados del CLAR de los extractos EHTED, EHTAD

10. **D**ISCUSIÓN

En un estudio previo se dio a conocer las propiedades sedantes y posiblemente ansiolíticas de un extracto hidroalcohólico de *Casimiroa edulis*, en el mismo artículo se planteaba la necesidad de continuar estos estudios para una mayor comprensión del fenómeno. (Mora et al, 2005) Es en este contexto que se planteó el estudio fitoquímico de un extracto hidroalcohólico de *C. edulis* con actividad sedante.

Para cumplir el objetivo planteado se propuso el estudio de un extracto hidroalcohólico de la especie *Casimiroa edulis* obtenido a temperatura ambiente (EHTA) y como es conocido que la temperatura es un parámetro importante en la obtención de extractos, se decidió estudiar también un extracto hidroalcohólico obtenido a temperatura de ebullición (EHTE). Utilizando como guía de actividad sedante el ensayo de potenciación de sueño inducido por pentobarbital.

Los parámetros utilizados para la determinación sedante fueron la latencia de sedación, considerada como el tiempo en minutos que transcurrió entre la administración de PB y la pérdida de coordinación locomotriz; y el tiempo de sueño, definido como el tiempo que transcurre entre la pérdida de reflejo de enderezamiento y su recuperación. (Mora et al, 2005)

Los resultados indicaron que EHTA y EHTE no alteran el tiempo de latencia de sedación al compararlos con el grupo control. Sin embargo, ambos extractos modificaron el tiempo de sueño, así el EHTA a la dosis de 500 mg/kg aumentó el tiempo de sueño cerca de tres veces con respecto al grupo control, mientras que a la misma dosis el EHTE aumentó el tiempo de sueño en más de cinco veces. Por otro lado, a la dosis de 1000 mg/kg el EHTA indujo un tiempo de sueño, en los animales tratados, de más de 24 horas, muy superior al del grupo control de tan solo 37.98 minutos, mientras que el EHTE, a la misma dosis y posterior a la administración del PB provocó la muerte del 75 % de los animales de prueba (Cuadro 5 y 6). Estos resultados indican que aunque ambos extractos modifican el

tiempo de sueño, el EHTE fue tóxico a la dosis de 1000 mg/kg, resultado que señala la importancia de la temperatura en la obtención de los extractos.

Con el fin de investigar si los componentes polares de estos extractos eran los responsables de la actividad sedante, se decidió realizar una partición del extracto EHTA y EHTE entre metanol y diclorometano.

De esta forma, del extracto EHTA, se obtuvieron el extracto metanólico (EHTAM) y el extracto de diclorometano (EHTAD), mientras que del EHTE se obtuvieron el extracto metanólico (EHTEM) y el extracto de diclorometano (EHTED). Cabe señalar que durante el proceso de partición de este extracto se precipito un sólido verde-amarillento, el cual constituyo el 78 % del extracto original. El aislamiento e identificación de los componentes de este sólido están más allá de los objetivos de este estudio.

Al igual que los extractos originales, los extractos EHTAM y EHTEM no modificaron el tiempo de latencia de sedación. Por otro lado, a la dosis de 500 mg/kg los extractos EHTAM y EHTEM incrementaron el tiempo de sueño por 18.9 y 31.7 minutos, respectivamente con respecto al grupo control. Mientras que a la dosis de 1000 mg/kg, el EHTAM incremento el tiempo de sueño en 51.41 minutos y el EHTEM lo incremento en 70.60 minutos con respecto al control. Cabe señalar que a diferencia del EHTE, el EHTEM no produjo ninguna muerte en los animales de prueba.

Por otro lado los extractos EHTED y EHTAD, resultaron ser tóxicos a las dosis de 500 y 1000 mg/kg de peso. En ambas dosis se observó falla respiratoria, repetidas crisis convulsivas y posteriormente la muerte del animal. A la dosis de 500 mg/kg la muerte del animal fue en un promedio de 16 minutos, a diferencia de la dosis de 1000 mg/kg que fue de 8 minutos. Es importante señalar que, los animales murieron después de la administración del extracto, en contraste con las muertes provocadas por EHATE que ocurrieron después de la administración de PB.

Se decidió realizar la separación cromatográfica del extracto hidroalcohólico obtenido a temperatura de ebullición (EHTE), con el fin de obtener algunos metabolitos secundarios que sirvieran como estándares para el análisis cromatográficos de todos los extractos. De esta forma se aislaron la rutina y la N-metilprolina.

La rutina es el ramnoglicósido de la quercetina, de amplia distribución en el reino vegetal. Esta flavona ejerce varias actividades biológicas que son beneficiosas para la salud, como es el efecto antioxidante (Gao Z et al, 2003), protección contra la hepatotoxicidad (Janbaz KH et al, 2002), efecto antiinflamatorio (Cruz T. et al, 1998; Guardia T. et al, 2001; Kim H. et al, 2005; y Morikawa K. et al, 2003). La Casa et al (2000), demostró que el efecto gastroprotector de la rutina se puede observar a través de su efecto antilipoperoxidante mejorando la actividad antioxidante de la glutatión peroxidasa. Kamalakkannan y Prince informaron que el uso de la rutina, en animales diabéticos, aumenta la actividad de la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa en diabetes inducida por estreptozotocina. Pu et al, reporta que la rutina mejora significativamente la memoria espacial deteriorada y disminuye la muerte de neuronas en ratas en condiciones de isquemia.

Por otro lado, Silva y colaboradores (2008), informaron que la rutina induce la actividad de astrocitos y microglías así como la regulación del TNF alfa y liberación de óxido nítrico en cultivos celulares de glial primarios. En el sistema nervioso central (SNC) los astrocitos y microglías son células de la familia glial y juegan un papel importante en la homeostasis del cerebro. Los estudios de Nöldner et al, (2002), demostraron que la rutina es esencial para la actividad antidepresiva de extractos de *Hypericum perforatum* en la prueba de nado forzado. Por otro lado, Kaczmarek et al (1964) informaron que la rutina suprime la excitación de cocaína en ratones, mientras que los estudios de Machado et al (2008), demostraron que la rutina produce un efecto antidepresivo en modelos animales, con la posible participación de los sistemas serotoninérgicos, noradrenérgicos y dopaminérgicos.

Para determinar una posible relación entre la presencia de la rutina en los extractos y su efecto sedante, se decidió realizar un análisis por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) de los extractos EHTE, EHTA, EHTEM, EHTAM, EHTED y EHTAD, debido a que rutina es un compuesto con probada actividad sedante. (Fernández et al, 2006)

En el cromatograma de la rutina (Fig. 12), se observa el resultado del análisis CLAR de esta flavona. El tiempo de retención fue de 10.55 minutos y el espectro de UV mostró la absorbancia de la rutina a 257.0 nm y 356.6 nm. (Buitrago et al, 2001) Los resultados de los análisis, indicaron que la rutina está presente en los extractos EHTE, EHTA, EHTEM, EHTAM.

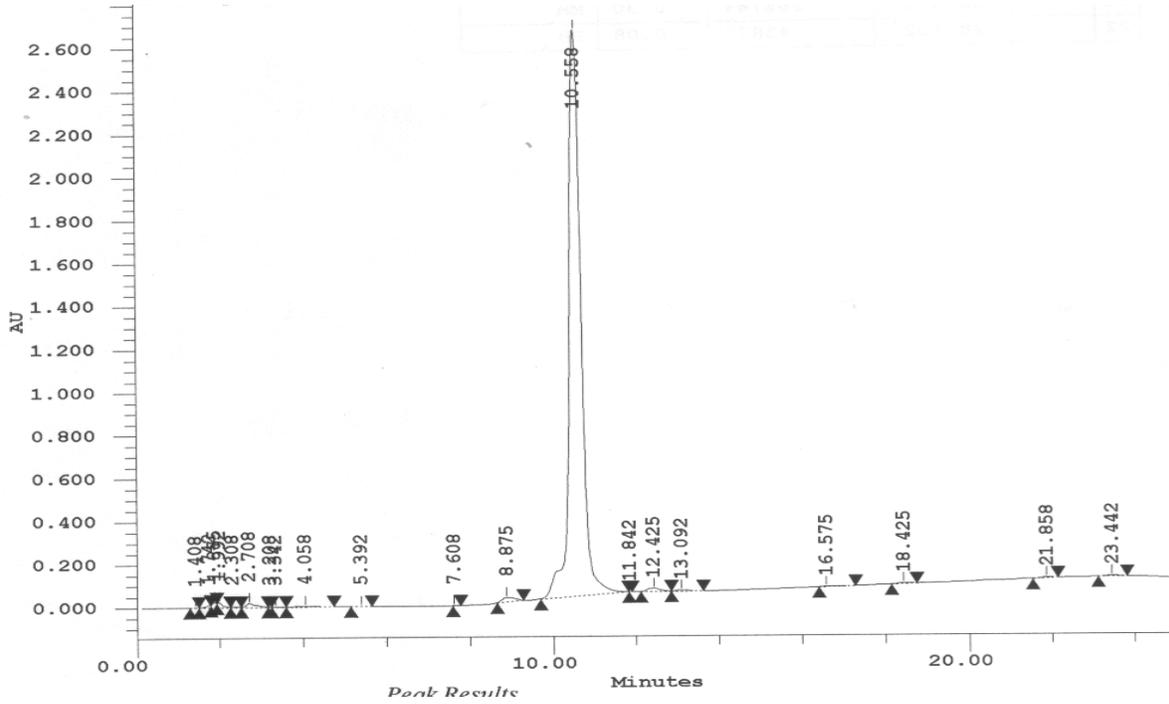


Figura 12. Cromatógrama de la Rutina

En el extracto EHTA, además de la presencia de la rutina con 26.47%, se encuentran tres compuestos de menor abundancia a tiempos de retención 11.10, 12.00 y 16.77 minutos (Fig. 13). Sin embargo, los espectros de UV de estos compuestos no corresponden a compuestos flavonoides.

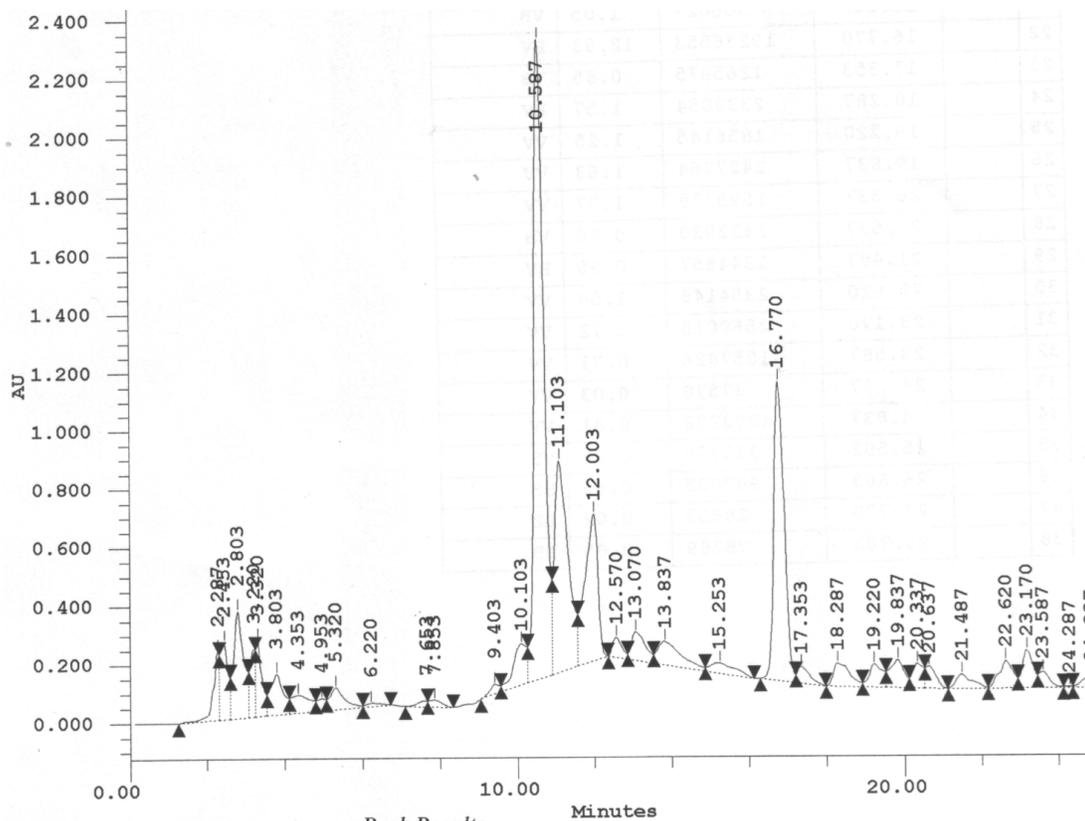


Figura 13. Cromatograma del EHTA

De igual manera en el extracto EHTE se encuentra la rutina con un 23.39%, y tres compuestos de menor abundancia a 2.74, el 4.61 y el 16.99 minutos respectivamente (Fig.14). Sin embargo, los espectros de UV de estos compuestos no corresponden a compuestos flavonoides.

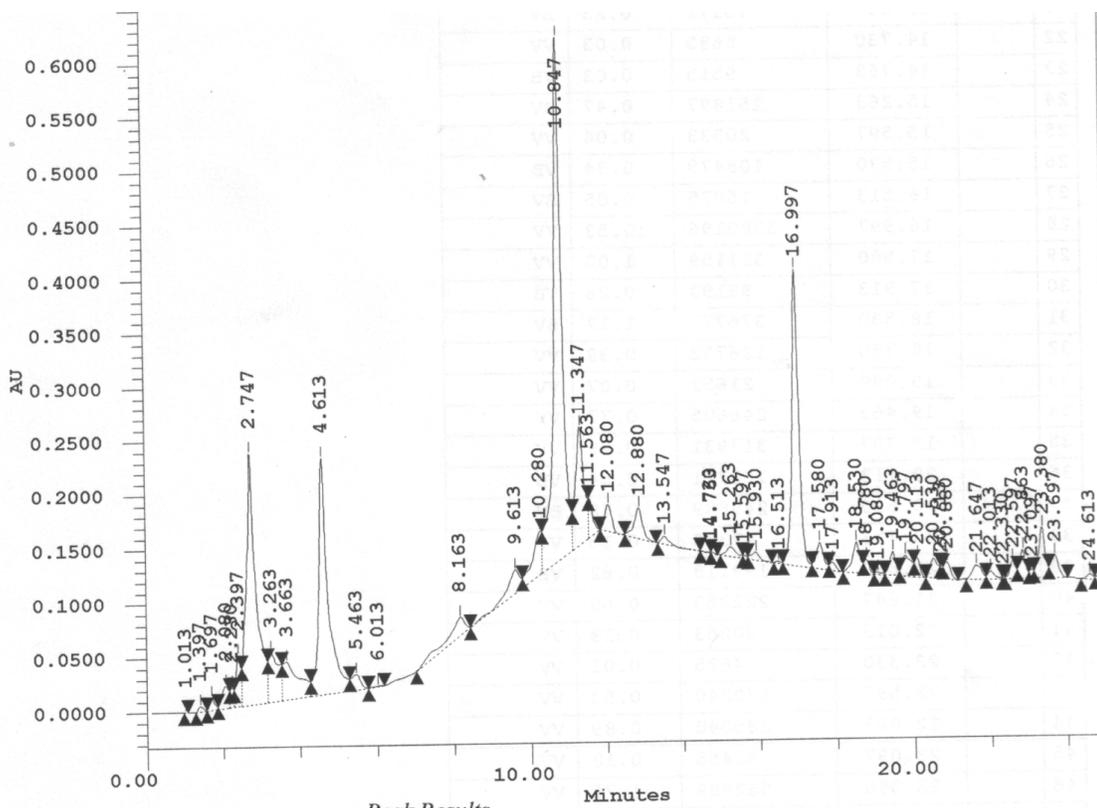


Figura 14. Cromatograma del EHTE

En el extracto EHTAM se observo el pico de la rutina con 19.89% y dos señales el 8.41 y el 15.07. En el extracto EHTEM la rutina tiene un 15.63% y se observaron tres picos de mayor y menor proporción; el 12.39, el 12.69 y el 14.69. Los picos 12.39 y 12.69 presentaron una absorbancia con perfil flavonoide. En cambio en los EHTAD y EHTED no se observo la rutina, pero se presentaron otros compuestos mayoritarios con tiempos de 17.263 minutos (36.85%) y 16.888 minutos (28.98%) respectivamente (Fig.15 y 16).

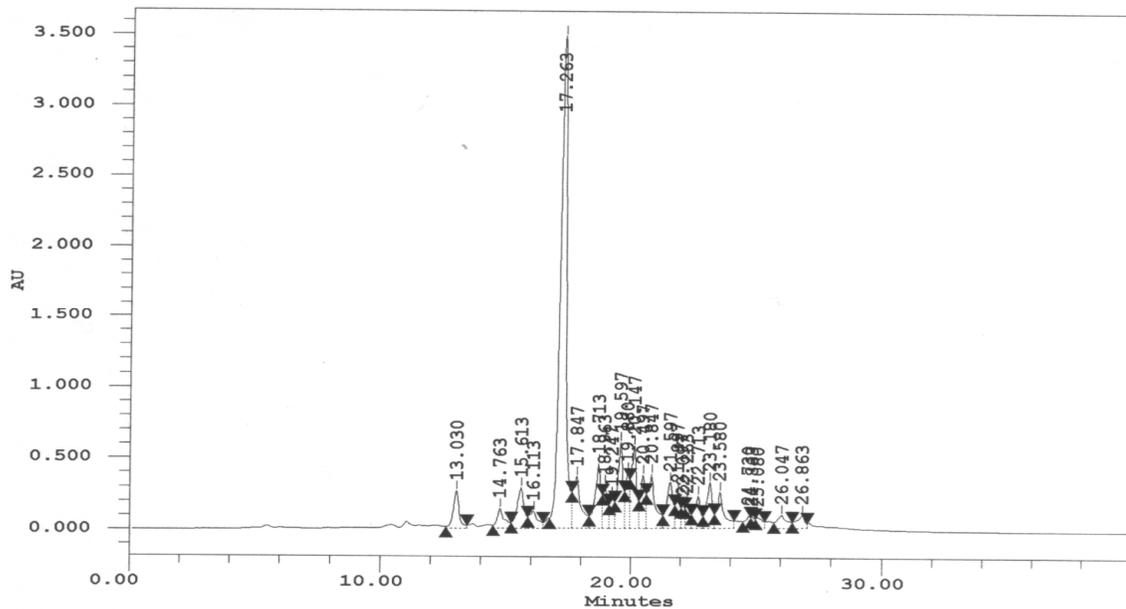


Figura 15. Cromatograma del EHTAD

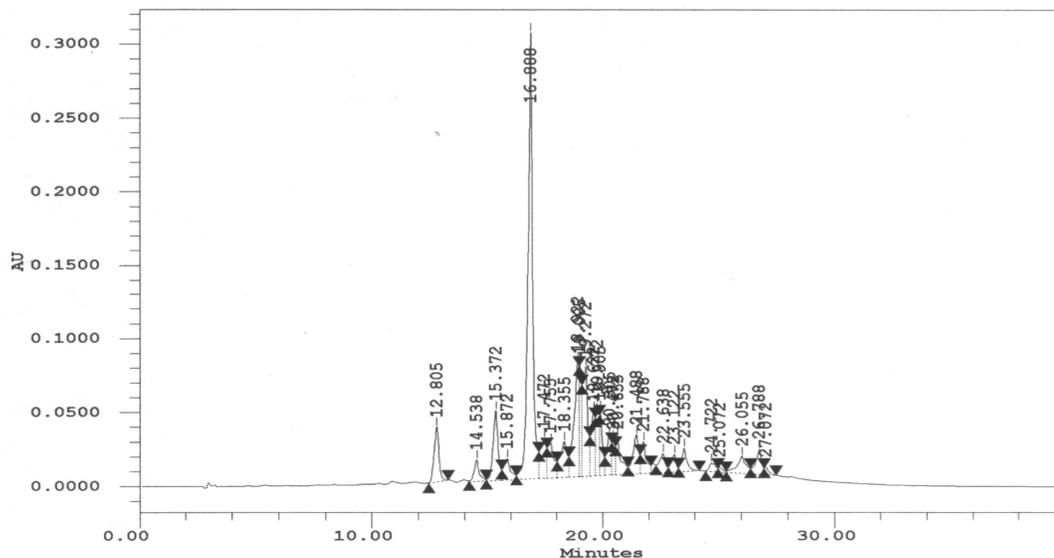


Figura 16. Cromatograma del EHTED

Nuestros resultados indican una relación entre la cantidad de rutina y el tiempo de sueño. Esto es a mayor rutina, mayor el tiempo de sueño. Fernández et al., (2006), demostraron que la rutina, posee actividad depresora sobre el sistema nervioso en ratones. Así como también que ejerce una acción significativa en la prolongación del sueño. (Cuadro 10)

Extracto	% área de rutina	Tiempo de sueño (min) en dosis de 500 mg/kg	Tiempo de sueño (min) en dosis de 1000 mg/kg
EHATE	23.89	124.81	147.73
EHATA	26.47	68.87	+ de 24 horas
EHATAM	19.89	18.9	51.41
EHATEM	15.63	31.7	70.60

Cuadro 10. Análisis de los resultados del tiempo de sueño con respecto a la dosis administrada y la presencia de rutina.

Sin embargo, no podemos descartar la acción de otros compuestos presentes en los extractos que pueden potenciar o hacer una sinergia con la rutina.

Por otro lado, los resultados del análisis CLAR de EHTED y EHTAD indicaron que la rutina no esta presente en estos extractos, no obstante se observo la presencia en el extracto EHTED de un componente mayoritario que tiene un tiempo de retención de 16 minutos mientras que en el EHTA se observó un componente mayoritario a 17 minutos. Es probable que dichos compuestos sean los responsables de la toxicidad que mostraron estos extractos en las pruebas de actividad sedante.

11. CONCLUSIONES

Nuestros resultados mostraron que los extractos presentan actividades sedantes diferentes. Aún más la partición de estos extractos mostraron diferentes actividades sedantes. Cabe señalar que los extractos de diclorometano fueron tóxicos.

De acuerdo con nuestros hallazgos la temperatura de extracción es un parámetro importante en la preparación de extractos, al menos para esta especie. Así se observó que el extracto a temperatura ambiente fue más activo en la actividad sedante, mientras que el extracto a temperatura de ebullición mostró ser tóxico a los animales de prueba. Además, en el proceso de partición a partir de este extracto se formó un precipitado que posiblemente este involucrado en la toxicidad de este extracto.

No obstante, es importante señalar que el tiempo de sueño de los extractos aumenta de manera dosis dependiente, posiblemente por la acción depresora del extracto sobre el sistema nervioso en los roedores. Estos efectos son similares o superior al diazepam que es un fármaco de uso clínico. Sin embargo, es necesario continuar otros estudios para comprender mejor este fenómeno.

Del extracto hidroalcohólico a temperatura de ebullición se aislaron e identificaron a la rutina y la N-metilprolina. Hasta el momento nuestros resultados indican una relación entre el tiempo de sueño y la rutina, sin embargo se requieren de otros estudios para una mejor comprensión del papel de la rutina en el efecto sedante.

También es importante señalar que las fracciones de diclorometano de los extractos originales mostraron ser muy tóxicos a los animales de prueba. Finalmente la precipitación del sólido a partir del tratamiento del EHTE es un factor que debe tomarse en cuenta para futuras investigaciones farmacológicas y químicas.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Anaya, M. L. 2003. Ecología Química. Plaza y Valdez. México. pp 35-42.
2. Argueta A, L.M. Cano y M. E. Rodarte, 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana II. Instituto Nacional Indigenista. pp. 1413-1414
3. Avilés, M. 1985: Medicina tradicional: plantas empleadas por parteras empíricas del Estado de Morelos. Tesis de Licenciatura, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de México, p.p. 88
4. Balandrin, M. F., J. A. Klocke, E. S. Wurtele, W. H. Bollinger. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medical herbs. *Sci.* 228: 1154-1160.
5. Barberán F.A, C.A. Williams and M.I. Gil, 1986. Chemistry and natural distribution of flavonoides in the Labiatae, in: *Advances in Labiatae*, R. M. Harley and T. Reynolds (ed.), London: Royal Botanic Gardens, Kew. p.p 299-305
6. Barnes, J., Anderson, L. A., Phillipson, J. D. 2001. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties *J of Pharmacy and Pharmacol*: 53:583-600
7. Brailowsky, Simón: Las sustancias de los sueños: neuropsicofarmacología, FCE-CONACYT, México, 1995. pp. 121-126
8. Buitrago Diolimar y Antonio Morales M. 2001. Flavonoides del *Pseudognaphalium moritzianum* (Klatt) Badillo. *Rev Facultad Farma*. Vol. 42 pp. 40-42
9. Capistrán G. Ma. E. 2004. Plantas medicinales: el jardín de la salud. CD-R interactivo.
10. Cotton C.M. 1996. *Ethnobotany: principles and applications*. John Wiley & Sons. p.p. 33-36
11. Cruz T, Galvez J, Ocete MA, Crespo ME, Sanchez de Medina LHF, Zarzuelo A. 1998. Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Life Sci*;62:687-95.
12. Charles P. O'brien, 1996. Adicción y abuso de sustancias tóxicas. En: Goodman & Gilman (ed.). *Las bases farmacológicas de la terapeutica*. 9° McGraw-Hill. Interamericana. Vol. 1 pp. 283-313
13. Chiang, F. y González-Medrano, 1961. Nueva Especie de *Casimiroa* (Rutaceae) de la zona árida oaxaqueño-poblana. *Bol. Soc. Bot. México*. 41, 23-26.
14. De la Llave, P. y L. Martínez, 1825: *Novorum Vegetabilium Discriptiones*, México, pp.9

15. Dewick, M.P. 2001. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. John Wiley and Sons., Inc., 605 Third Avenue, New York. NY 10158-0012, USA. p.p. 135-142
16. Díaz R. N. A., 1998. Libro – Herbario de Plantas Medicinales. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Artes Plásticas, UNAM. México, D.F. pp. 46-57
17. Douglas J. 2001. Valerian *Valeriana officinalis*. L. Ruakura Agricultural Research Centre. Crop & Food Research homepage 34: 1-4
18. Dreyer, D.L., 1968. Citrus Bitter Principles. IX. Extractives of *Casimiroa edulis* Llave et. Lex. The structure of zapoterin. J Org Chem, 33: 3577-3582
19. Enciclopedia Microsoft® Encarta, 2007, “Plantas medicinales”
20. Fernandez S., Cristina Wasowski, L. Loscalzo, R. E. Granger, G. Johnston, A. C. Paladini, M. Marder. 2006. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. Journal of Pharmacology 539: 168-176
21. Fernández S., Cristina Wasowski C., Paladin A and Marder M. 2003. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. Pharm Biochem and Behav. Volume 77. 399-404
22. Floyd E. Bloon, Neurotransmission y SNC. En: Goodman & Gilman (ed.) 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9° McGraw-Hill. Interamericana. Vol. 1 pp. 283-313
23. Fuller, G y W.D. Nes. 1987. Plant lipids and their interactions, in Ecology and Metabolism of plant lipids. Fuller, G and Nes, W.D., Eds., Am Chem Soc, Washington, D.C., 1987 p.p. 2-9
24. Gama Fuertes Ma. A. 1997. Biología. Ed. Pearson Educación, México. pp. 11-23
25. Gao Z, Xu H, Chen X, Chen H. 2003. Antioxidant status and mineral contents in tissues of rutin and baicalin fed rats. Life Sci;73:1599-607.
26. Goodwin T.W. 1976. Chemistry and biochemistry of the plant pigments. Academic Press London. Vols. 1 and 2, 2nd Ed. pp. 225-261
27. Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE, 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. Farmaco;56:683-7.
28. Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol A. of Med, 27 (2006) 2-18
29. Hilbery A.D.R., A.E. Waterman, G.J. Bruuwer. 1992. Manual de anestesia de los pequeños animales. Zaragoza: Acribia, 1992. pp. 52-59

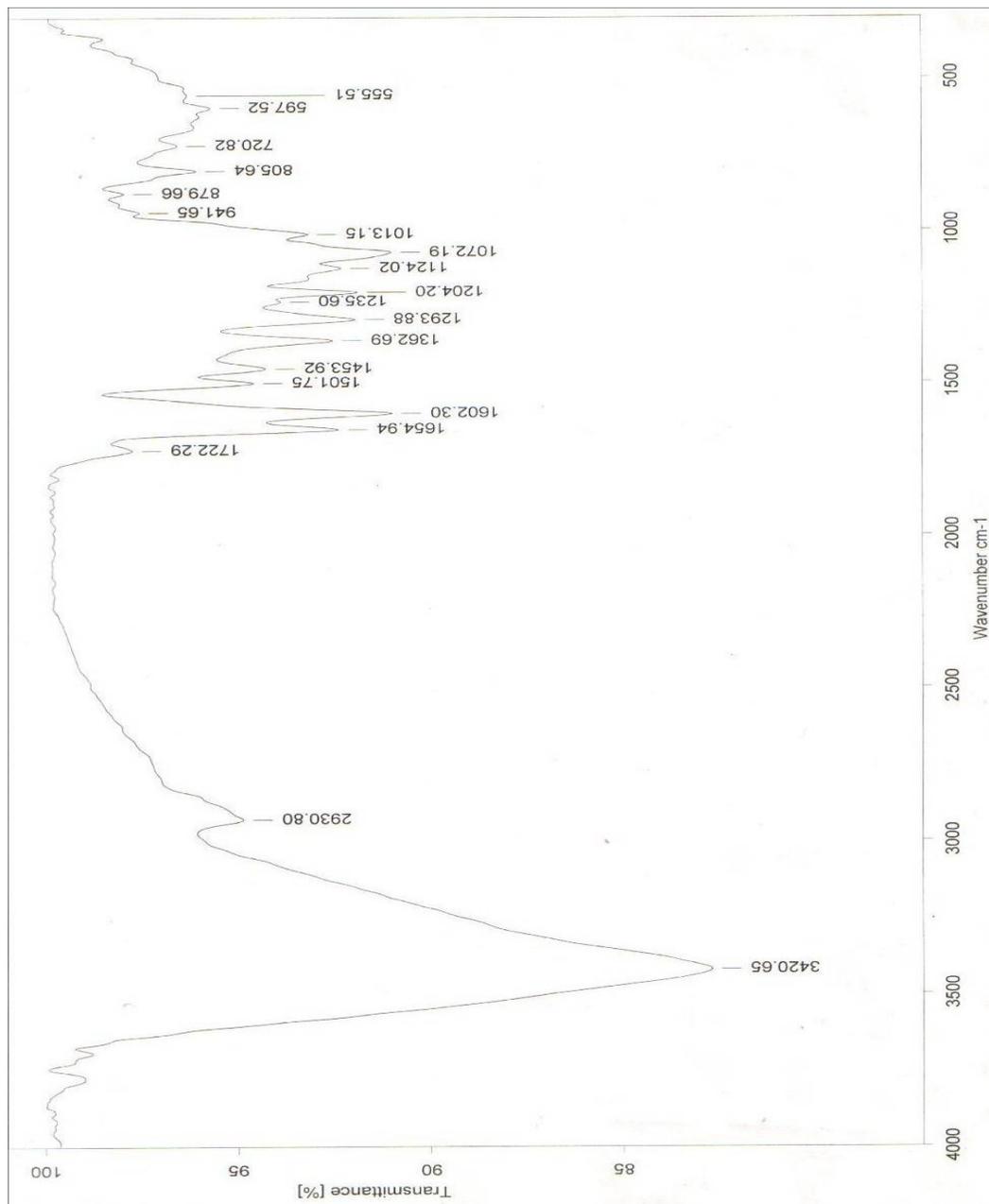
30. Hirkowitz M, C. Moore C, G. Minhoto. 2002. The Basics of sleep. Understanding Sleep The evaluation and treatment of sleep disorders. Washington, DC. Ed. American Psychological Association. pp. 11-33
31. Hobbs W.R., T. W. Rall y T. A. Verdoorn. Hipnóticos y sedantes; etanol. En: Goodman & Gilman (ed.) 1996. Las bases farmacológicas de la terpeutica. 9° McGraw-Hill. Interamericana. Vol. 1 pp.385-423
32. Holm, Y., R. Hiltunen, y I. Nykaenen. 1988. Capillary gas chromatographic-mass spectrometric determination of the flavour composition of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). *Flav. and Frang. J.* 3 (3): 109-112.
33. Hollman P.C.H. y Katan M.B. 1997. Absortion, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biom and Pharmacoterap*; 51:305-310
34. Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. 2002. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl4-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*;73:557-63.
35. Kaczmarek, Feliks, Szpunar, Krystyna.1964. Effect of some flavonoids on cocaine excitation in mice. *J.* 10 (1) 1-5.
36. Kamalakkannan N, Prince PSM. 2006. Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Mol Cell Biochem*; 293:211-9.
37. Khaleel, A.E. 2002. 2-Phenyl-4-quinoline alkaloids from *Casimiroa edulis* Llave et Lex. (Rutaceae). *Monatshefte für Chemie.* 133: 183-187
38. Kim H, Kong H, Choi B, Yang Y, Kim Y, Lim MJ. 2005. Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. *Pharm Res*;22: 1499-509.
39. Kleitman N. 1939. *Seek and Wakefulness*, Chicago, University of Chicago Press, pp. 12-21
40. Kuklinski, C. 2000. *Farmacognosis*, Omega S.A. pp. 51-53
41. La Casa C, Villegas I, Alarcon de la Lastra C, Motilva V, Martin Calero MJ. 2000.
42. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, anatural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol*;71:45-53.
43. Lallemand J. Y. and M. Duteil. 1977. ¹³C N.m.r. Spectra of Quercetin and rutin. *Organic Magnetic Resonance*, 9: 1-2
44. Lara O. F. y C. Márquez, 1996. *Plantas medicinales de México: composición, usos y actividad biológica.* UNAM, México. p.p. 5-127
45. Lawrence D. y Grouse N. D., 1982. Cellular Mechanism of Benzodiazepines Action, *JAMA*, 247, 16, 2147-2151

46. Lechuga, C. J. A., Meraz, V. S., Orozco, V. J., García, S. m. d. y Cruz, S. F. 2000. Algunos aspectos de la micropropagación de plana medicinales. DINTEL. 6: 67-80
47. Luckner, M. 1984. Secondary metabolism in microorganisms, plants, and animals. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 256-263
48. Machado G., L. Bettio, M. Cunha, A. Santos, M. Pizzolatti, I. Brighente, A. L. Rodrigues, 2008. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *J. Pharmacol.* 587: 163-168
49. Magos, G.A., H. Vidrio, W.F. Reynolds, R.G. Enríquez. 1999. Pharmacology of *Casimiroa edulis* IV. Hypotensive effects of compounds isolated from methanolic extracts in rats and guinea pigs. *J Ethnopharmac*, 64: 35-44
50. Martínez Alonso R. Sedantes, hipnoticos y ansiolíticos. En: Goodman & Gilman (ed.). 1996. Las bases farmacológicas de la terpeutica. 9° McGraw-Hill. Interamericana. Vol. 1 pp. 386-412
51. Martínez M. 1969. Las plantas Medicinales de México, 5^{ta} Botas. México p.p. 589-595
52. Martínez M. A., 2005. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquía. pp. 49-60
53. Martínez, M. 1951. Las Casimiroas de México y Centroamérica. *Anal. Instit. Biol.* 22 (1) 25-181.
54. Martínez-Flores S., J. González-Gallego, J. M. Culebras y Ma. J. Tuñon., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr.Hosp.* (2002) XVII (6) 271-278
55. Mata P., D. Méndez G. y M. Zurita. 1994. Diccionario Enciclopédico de la medicina tradicional. INI. México. Tomos I y II. pp. 31-38
56. McKim W. A. 1991. *Drugs and behavior: An introduction to behavioral pharmacology.* (2a). Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. Cap.11 pp. 39-52
57. Medina-Mora, M.E., G. Borges, M.C. Lara, C. Benjet,, J.J. Blanco, B.C. Fleiz, V.J. Villatoro, G.E. Rojas, R.J. Zambrano, R.L. Casanova y S. Aguilar-Gaxiola, 2003. Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultado de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental*, 26 (4):1-16.
58. Meyer J.L. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria.* México: Unión Tipográfica Editorial Hispano Americana, S.A de CV, 1982. pp. 36-42
59. Mora S., Díaz-Veliz, H. Lungenstrass, M. Garcia-González, T. Coto-Morales, C. Poletti, T.C.M. De Lima, M. Herrera-Ruiz, J. Tortoriello, 2005. Central nervous system activity of the hydroalcoholic extract of *Casimiroa edulis* in rats and mice. *J Ethnopharmac*, 97: 191-197

60. Morikawa K, Nonaka M, Narahara M, Torii I, Kawaguchi Yoshikawa T, 2003. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci*;74:709-21.
61. Neumeyer, J. L., and Booth, R. G. Neuroleptics and anxiolytic agents. In, *Principles of Medical Chemistry*, 4th ed. (Foye, W.O., Williams, D.A., and Lemke, T.L., eds.) William, Baltimore, 1995. pp. 256-259
62. Nickell, L.G. 1980. Products. In *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. (EJ Staba, ed). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 235-269.
63. Nöldner M. y Karl Schötz, 2002. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hipericum perforatum* extracts in the forced swimming test. *Plant Med*: 68: 577-580
64. Nueva Enciclopedia Autodidáctica de Zoología. 2002. Ed. Lexus México, pp.250-269
65. Osegueda, S., E. Moreno, P. Koleff. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas* 62: 12-15
66. Páez S. 2000. Impacto de los Trastornos del Sueño. En: Osuna E, ed.: *Enfoque del Paciente con Trastornos del Sueño*, Asociación Colombiana de Medicina del Sueño (ACMES). pp. 11-16.
67. Peña, L. M. 1990. Some examples of economically important plant secondary metabolites. In: *Production of secondary metabolites from plant Tissue Culture and its Biotechnological Perspectives* Loyola- Vargas, V.M. y CICY. Yucatán, México. pp. 225-241
68. Peraita-Adrados R. 2005. Metodología del Estudio del Sueño. *Rev Neurol*; 40 (8): 485-91
69. Plumb D.C. 1995. *Veterinary Drug Handbook*, (2a) Iowa: Iowa State University Press. 1995. pp. 102-106
70. Pu F, Mishima K, Irie K, Motohashi K, Tanaka Y, Orito K, 2007. Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Sci*;104:329-35.
71. Ramos P.M. 1996. El sueño normal. Sueño y procesos cognitivos. Buenos Aires. Ed. Manual Moderno. pp.161-170
72. Riggs D, R E Weibley. 1991. Acute hemorrhagic diarrhea and cardiovascular collapse in a young child owing to environmentally acquired cocaine. *Pediatr Emerg Care*; 7:154-155.
73. Rocha L. 2005. La enfermedad que alguna vez fue sagrada. *Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias* 56:6-13.
74. Sean K. Kennedy y David E. Longnecker. Historia y principios de la anestesiología. En: Goodman & Gilman (ed.) 1996. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9° McGraw-Hill. Interamericana. Vol. 1 pp. 313-327

75. Sierpina, V., Wollschlaeger, B., Blumenthal, M., 2003. *Gingko biloba* Complementary and alternative medicine. *Americ Family Physician* 68:923-929.
76. Silva A. R., A. Pinheiro, C. Souza, B. Freitas, V. Vasconcellos, M. Freire, S. Velozo, M. Tardy, S. Elbachd, D. Costa, L. Costa. 2008. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary grial cell cultures. *Cell Biol Toxicol* :24: 75-86
77. Sumano L.H. y C.L. Ocampo. 1997. *Farmacología Veterinaria* (2) México: Mac Graw Hill-Interamericana, 1997. pp. 62-66
78. Vanhaelen, M., J. Lejoly, M. Hanocq, L. Molle, 1991. Cümatic and geographical aspects of medicinal plant constituents. In *The medicinal plañi industry*. De. By R.O.B. Wijesekera. Florida, CRC press. p. 59-76.
79. *Vegetación de México*, 2008. El zapote blanco y la medicina indígena. *Revista electrónica de la Comisión Nacional Forestal*. No.87.
80. Viola H., Wasowski C., Levi de Stein, Wolfman, Silveira R., F. Dajas, J. H. Medina, A.C. Paladini, 1995, Apigenin, a Component of *Matricaria recutita* Flowers, is a Central Benzodiazepine Receptor-Ligand with Anxiolytic Effects. *Plant Medic*; 61:213216
81. Wenkert E. and Hugo E. Gottlieb. 1977. Carbon-13 Nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoid and isoflavonoid compounds. *Phytochem* 16: 1811-1816

13. ANEXO



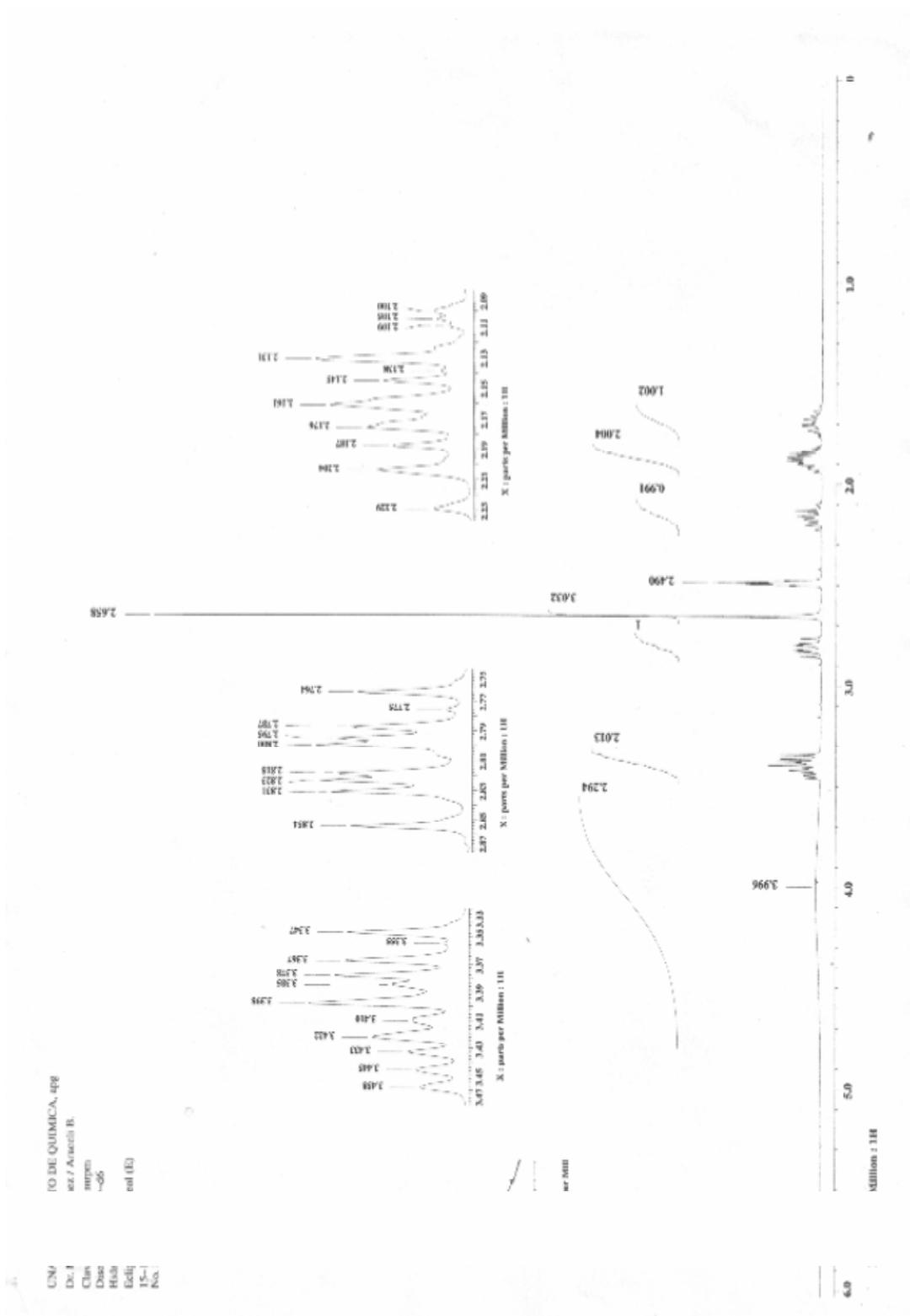
Espectro 1. Espectro de Infrarojo de Rutina

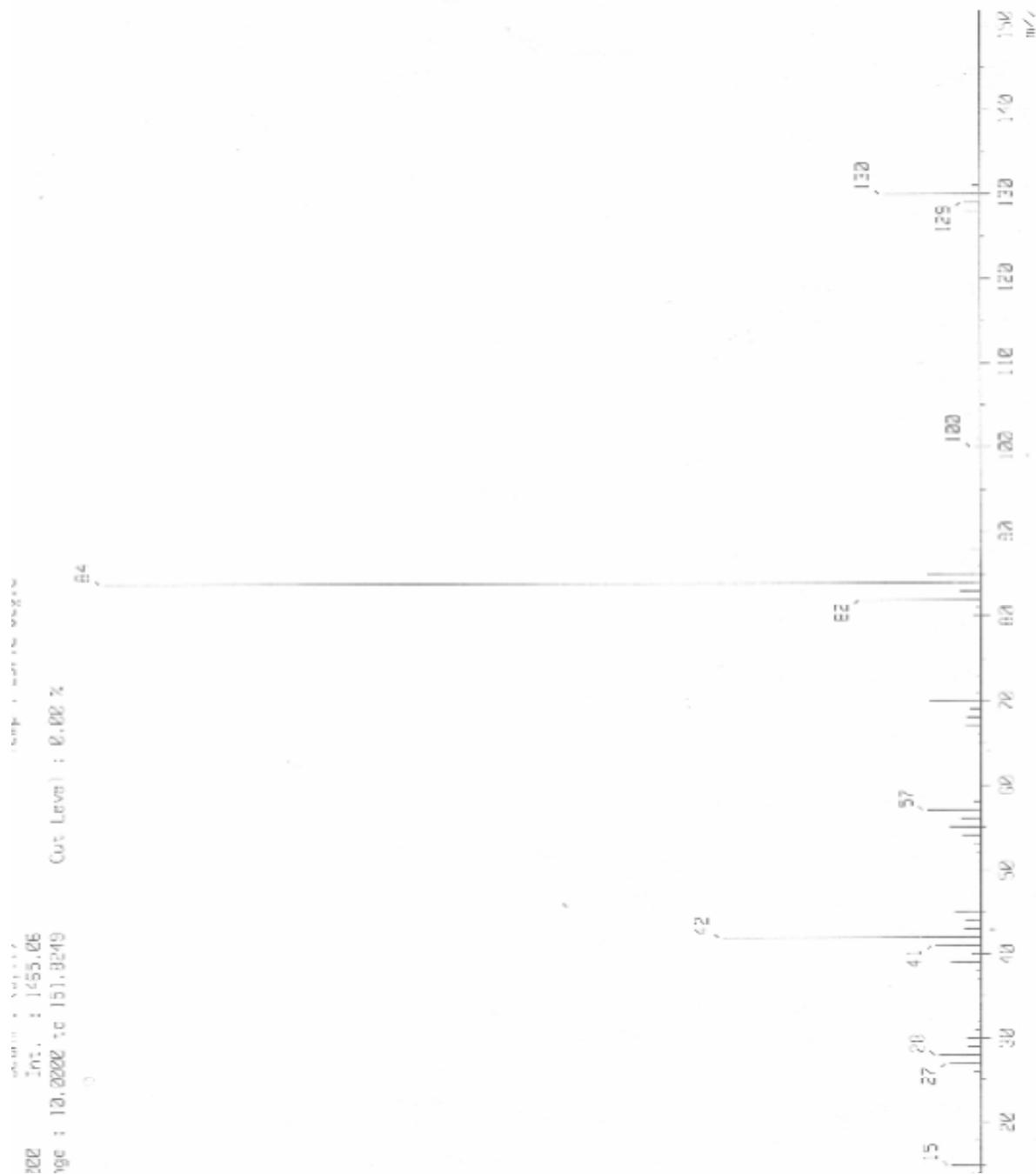
Espectro 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ^1H a 300 MHz de Rutina

Espectro 3. Espectro de masas de Rutina

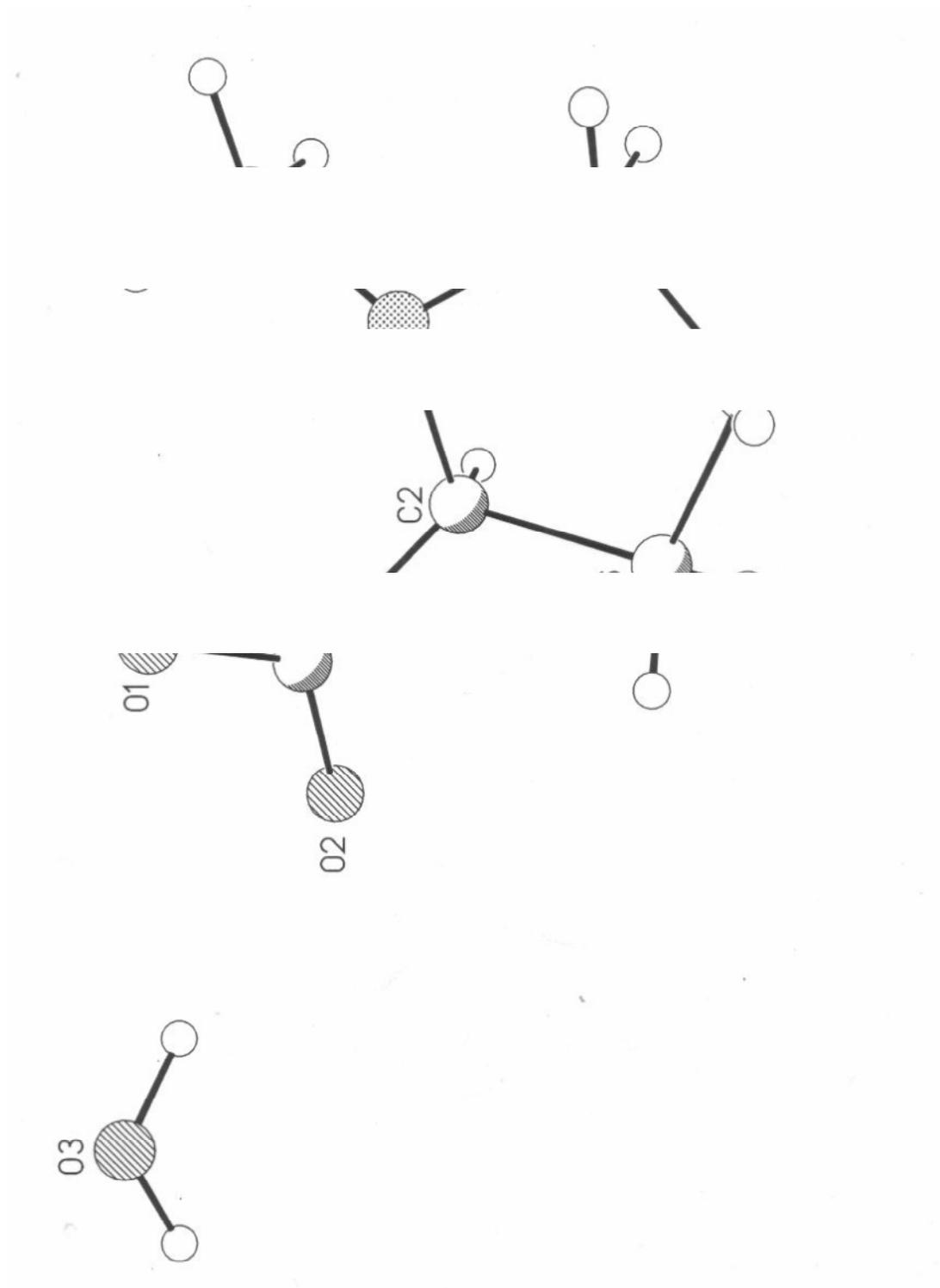


Espectro 4. Infrarrojo de N-metilprolina





Espectro 6. MS de N-metilprolina



Espectro 7. Difracción de monocristales de rayos X de N-metilprolina

Espectro 8. Inflarajo del PTE