



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Farmacologia delle Tossicodipendenze

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO-15

TITOLO TESI

**Indagine etnofarmacologica su *Casimiroa edulis* Llave
et Lex.**

Presentata da: Cinzia Sanna

Coordinatore Dottorato: Prof. Gaetano Di Chiara

Relatore: Prof. Mauro Ballero

Esame finale a.a. 2007/2008

INDICE

1. INTRODUZIONE	p. 1
2. ETNOFARMACOLOGIA	5
2.1 Proprietà farmacologiche di <i>Casimiroa edulis</i>	5
2.2 Metaboliti secondari di <i>Casimiroa edulis</i>	8
3. <i>Casimiroa edulis</i> Llave et Lex.....	14
3.1 Inquadramento tassonomico	14
3.2 Famiglia Rutaceae	15
3.3 Distribuzione geografica e caratteristiche botaniche.....	16
4. METODICHE DI LABORATORIO	20
4.1 Strumenti	20
4.1.1 Soxhlet	20
4.1.2 Rotavapor	22
4.2 Tecniche estrattive	24
4.2.1 Estrazione del fitocomplesso dalle foglie fresche.....	24
4.2.2 Estrazione del fitocomplesso dalle foglie secche	25
4.2.3 Estrazione del fitocomplesso dai semi	26
4.2.4 Estrazione del fitocomplesso dalla corteccia.....	28
5. INDAGINE FARMACOLOGICA	29
5.1 Valutazione degli effetti degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> sull'attività motoria, mediante l'uso del test cage	29
5.1.1 Animali	29

5.1.2 Strumenti	30
5.1.3 Procedura sperimentale	32
5.2 Valutazione degli effetti degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> sull'attività motoria, mediante l'apparato open- field	34
5.2.1 Animali	34
5.2.2 Strumenti	34
5.2.3 Procedura sperimentale	34
5.3 Valutazione dell'azione antidepressiva degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> attraverso il Test del nuoto forzato	35
5.3.1 Animali	35
5.3.2 Procedura sperimentale	35
5.4 Valutazione dell'effetto sedativo-ipnotico degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> , determinata con il test del potenziamento dell'ipnosi indotta da Pentobarbital	9
5.4.1 Animali	40
5.4.2 Procedura sperimentale	40
5.5 Valutazione dell'effetto ansiolitico degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> , determinata con il test del labirinto a croce elevato (elevated plus maze)	41
5.5.1 Animali	41
5.5.2 Strumenti	41
5.5.3 Procedura sperimentale	42
5.6 Valutazione dell'effetto degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> sulla catalessi indotta dall'aloiperidolo	43
5.6.1 Animali	43
5.6.2 Procedura sperimentale	43

5.7	Valutazione dell'effetto degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> sulla catalessi indotta dall'aloiperidolo, nei topi trattati per 6 giorni con la caffeina e con gli estratti	45
5.7.1	Animali	45
5.7.2	Procedura sperimentale	45
5.8	Valutazione dell'effetto anticonvulsivante degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> , mediante il metodo delle convulsioni indotte dal PTZ (Pentilenetetrazolo): un modello animale di "Crisi di assenza" (Piccolo Male)	46
5.8.1	Animali	46
5.8.2	Procedura sperimentale	46
5.9	Valutazione dell'effetto anticonvulsivante degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> , mediante il modello degli stati epilettici indotti dal Litio-Pilocarpina	48
5.9.1	Animali	48
5.9.2	Procedura sperimentale	48
5.10	Valutazione dell'effetto antinocicettivo: contrazioni addominali (writhing) indotte dall'acido acetico	49
5.10.1	Animali	49
5.10.2	Procedura sperimentale	49
5.11	Valutazione dell'effetto antinfiammatorio: edema della zampa del ratto indotto dalla carragenina	50
5.11.1	Animali	50
5.11.2	Procedura sperimentale	50
6.	RISULTATI TESTS FARMACOLOGICI	53
6.1	Effetti degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> sull'attività motoria e sul rearing	53

6.2	Effetti dell'estratto di foglie fresche di <i>Casimiroa edulis</i> sull'attività motoria, mediante l'apparato open- field	55
6.3	Valutazione dell'azione antidepressiva degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> attraverso il Test del nuoto forzato	56
6.4	Effetto sedativo-ipnotico degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> , determinato con il test del potenziamento dell'ipnosi indotta da Pentobarbital	57
6.5	Valutazione dell'effetto ansiolitico dell'estratto di foglie secche di <i>Casimiroa edulis</i> , determinata con il test del labirinto a croce elevato (elevated plus maze)	58
6.6	Effetto degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> sulla catalessi indotta dall'aloiperidolo	59
6.7	Effetto degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> sulla catalessi indotta dall'aloiperidolo, nei topi trattati per 6 giorni con la caffeina e con gli estratti	61
6.8	Effetto antiepilettico degli estratti di <i>Casimiroa edulis</i> , mediante il metodo delle convulsioni indotte dal PTZ (Pentilenetetrazolo): un modello animale di "Crisi di assenza" (Piccolo Male)	63
6.9	Effetto anticonvulsivante dell'estratto di <i>Casimiroa edulis</i> , mediante il modello degli stati epilettici indotti dal Litio-Pilocarpina	64
6.10	Effetto antinocicettivo: contrazioni addominali (writhing) indotte dall'acido acetico	65
6.11	Effetto antinfiammatorio: edema della zampa del ratto indotto dalla carragenina	66
7.	CONCLUSIONI	67
8.	BIBLIOGRAFIA	73

1. INTRODUZIONE

Scopo di questa Tesi di Dottorato è quello di ampliare le conoscenze farmacologiche su *Casimiroa edulis* Llave et Lex., una pianta appartenente alla famiglia delle Rutaceae, originaria del Messico e dell'America centrale, attualmente coltivata in diversi paesi della fascia subtropicale.

Nella maggior parte di questi territori a questo albero vengono attribuite diverse proprietà farmacologiche, in quanto le sue foglie e i suoi semi sono impiegati, nella medicina popolare, per preparare bevande assunte nella cura dell'ansia, dell'insonnia e dei problemi di ipertensione (Sahagùn, 1571; Ximénez, 1615; Robin et Coyon, 1909; De Lille, 1937; Martinez, 1951; Lozoya et al., 1977; Rizvi et al., 1985; Estrada, 1989; Magos e Vidrio, 1991; Vidrio e Magos, 1991; Hernández, 1993; Garzon-De la Mora et al., 1999).

In particolare, il tè preparato con le foglie è impiegato per curare i disturbi del sonno e per regolare e stimolare le visioni oniriche (Argueta et al., 1994), mentre i semi, ridotti in cenere, venivano ingeriti dagli Aztechi per facilitare il sonno (Navarro, 1992).

La pianta è conosciuta con i nomi di “zapote blanco”, “matasano”, “abaché”, “zapote dormilòn” (Martinez, 1951). L'antica denominazione Nahuatl (nahuatl è la lingua indigena del Messico centrale) con la quale vengono indicati i frutti, “cochitzàpotl”, può essere tradotta in “zapote soporifero” o “zapote che produce sonno” (Lozoya ed Enríquez, 1981).

La Farmacopea del Messico riporta sia il frutto che i semi di *Casimiroa edulis*, questi ultimi utilizzati come antielmintici e vulnerari. In Costa Rica il decotto delle foglie veniva utilizzato nella cura del diabete e nel trattamento delle artriti.

In Messico e nei Paesi a clima subtropicale i frutti di *Casimiroa edulis* sono disponibili sulle bancarelle dei mercati locali (Figura 1) e gli estratti sono facilmente reperibili nelle zone d'origine; al contrario, in Italia la pianta è ancora poco conosciuta. Il Ministero della Salute Italiano ha, comunque, inserito i semi di *Casimiroa edulis* nell'elenco delle droghe non ammesse negli integratori alimentari (Provvedimento 15 febbraio 2007, G.U. n. 57 del 09/03/2007, allegato 2); i frutti e i loro estratti sono, invece, liberamente utilizzabili.



Figura 1. Frutti di *Casimiroa edulis* in un mercato

In questo lavoro si è voluto verificare se gli estratti ricavati dai semi, dalle foglie e dalla corteccia, prelevati da piante coltivate in Sardegna, avessero le stesse proprietà farmacologiche messe in evidenza negli studi relativi a materiale proveniente da piante spontanee.

In particolare l'attività di ricerca è stata articolata nelle seguenti fasi:

- a. **Ricerca bibliografica:** finalizzata alla raccolta di informazioni circa l'utilizzo della pianta nella medicina

popolare, le proprietà farmacologiche ad essa riconosciute a seguito di rigorosi studi scientifici, l'individuazione e l'isolamento di metaboliti attivi da semi, foglie e corteccia. Tutte queste notizie sono state utili per mettere in luce le potenzialità farmacologiche di una pianta ancora poco conosciuta nei paesi occidentali.

- b. **Inquadramento tassonomico e corologico:** si sono raccolte informazioni utili al fine di ricostruire l'attuale areale di distribuzione della specie; questo aspetto è stato particolarmente difficile per la presenza di numerose cultivar diffuse in aree diverse del mondo.
- c. **Indagine estrattiva:** le diverse droghe (semi, foglie e corteccia), prelevate in diversi periodi dell'anno da piante coltivate nei pressi di Capoterra (in località Santa Lucia), sono state sottoposte a diverse metodiche estrattive, al fine di ottenere un fitocomplesso da sottoporre ad un accurato screening farmacologico.
- d. **Indagine farmacologica:** i saggi farmacologici sono stati effettuati in collaborazione con il Dipartimento di Tossicologia dell'Università di Cagliari e con l'MGV's Pharmacy College di Nashik, nell'ambito di una collaborazione Italia-India, al fine di valutare gli effetti prodotti dai diversi estratti (foglie, semi e corteccia) in animali da laboratorio. Questi risultati sono stati poi messi a confronto con le informazioni relative a studi eseguiti da altri Autori su materiale proveniente da piante spontanee, al fine di verificare la possibilità di ottenere dei prodotti farmacologicamente attivi anche da piante coltivate in paesi diversi da quelli di origine.

In particolare, si è scelto di eseguire dei tests farmacologici che consentissero di valutare le seguenti proprietà degli estratti:

1. effetti sull'attività motoria spontanea (*test cage e open field test*);
2. attività antidepressiva (*test del nuoto forzato*);
3. effetto sedativo-ipnotico (*test del potenziamento dell'ipnosi indotta da Pentobarbital*);
4. effetto ansiolitico (*test del labirinto a croce elevato*);
5. effetto anticatalettico (*test della catalessi indotta da aloperidolo*);
6. effetto anticonvulsivante (*test delle convulsioni indotte da PTZ e test degli stati epilettici indotti dal Litio-Pilocarpina*).
7. attività antinocicettiva (*writhings indotti dall'acido acetico*).
8. attività antinfiammatoria (*test dell'edema alla zampa indotto da carragenina*).

2. ETNOFARMACOLOGIA

In virtù del suo ampio impiego nell'etno-medicina, *Casimiroa edulis* è stata oggetto di numerosi studi di tipo farmacologico e fitochimico volti, nel primo caso, a validare le informazioni reperite dalle indagini di tipo etnobotanico, nel secondo caso ad analizzarne la composizione chimica attraverso l'isolamento e la successiva analisi della struttura dei diversi metaboliti da essa prodotti.

2.1 Proprietà farmacologiche di *Casimiroa edulis*

Già alla fine dell'800 è stata descritta dettagliatamente l'azione ipotensiva della pianta, successivamente studiata prima in modelli animali (De Lille, 1934; Magos e Vidrio, 1991) e poi nell'uomo (Cruz y Corro, 1939). Magos et al. (1995) hanno riportato l'azione vasorilasciante esercitata, in opportuni modelli animali, dall'estratto dei semi di *C. edulis*. Quest'azione è probabilmente dovuta ad una prima risposta, rapida ma transitoria, causata dalla stimolazione dei recettori istaminici H₁ da parte di *alcaloidi imidazolici* (Magos et al., 1999; Magos et al., 1995; Magos e Vidrio, 1991), seguita da una seconda fase, ritardata, sempre di tipo vasorilasciante, dovuta all'attivazione dei recettori H₃ da parte della *casimiroidina* (Magos et al., 1999). Oltre a questi composti con attività vasorilasciante, nei semi è stata evidenziata la presenza di un composto amminico simile alle catecolammine, la *fenetilamina acetone*, la quale può agire da agonista ai recettori α -adrenergici, causando perciò vasocostrizione. L'azione ipotensiva dell'estratto di semi sarebbe quindi legata al fitocomplesso; essa è, infatti, il risultato della sinergia tra molecole con attività vasodilatatrice (alcaloidi imidazolici e casimiroidina) e altre con attività opposta, le quali modulano l'effetto vasorilasciante

finale. Recentemente sono stati isolati nuovi *alcaloidi chinolonici* con attività ipotensiva (Awaad et al., 2007).

Casimiroa edulis è stata studiata anche per l'azione ansiolitica e antidepressiva, anche se, al momento, non si è giunti a risultati definitivi. In particolare, si è osservato che gli estratti idroalcolici producono un'azione sedativa generale negli animali da laboratorio, solo se somministrati per via parenterale, mentre non generano alcuna variazione comportamentale se assunti per via orale (Mora et al., 2005). In questi studi è stato messo in evidenza un effetto degli estratti di *C. edulis* paragonabile a quello indotto dalla fluoxetina, farmaco ben noto per il suo utilizzo nella terapia della depressione. Secondo alcuni Autori gli estratti di *C. edulis* eserciterebbero un'azione antidepressiva con meccanismi simili a quelli della desipramina (Detke et al., 1995), collegabili all'inibizione del *re-uptake* delle catecolammine (Mora et al., 2005).

L'estratto dei semi ha evidenziato anche un'attività anticonvulsivante e sedativa in modelli sperimentali di epilessia, come il *maximal electroshock seizures* (MES) e le crisi indotte da Pentilenetetrazolo (PTZ), facendo ipotizzare la presenza di principi potenzialmente attivi nell'epilessia (Garzon-De la Mora et al., 1999). Precedentemente, Navarro-Ruiz et al. (1995) hanno riportato l'effetto anticonvulsivante dell'estratto acquoso delle foglie, sulle crisi indotte chimicamente ed elettricamente in animali da laboratorio.

Negli ultimi anni dai semi di *Casimiroa edulis* sono stati isolati dei composti ad azione antimutagena, potenzialmente utili nel trattamento preventivo o di supporto alla chemioterapia tumorale: tali principi sono, in particolare, il *5,6,2'-trimetossiflavone*, la *casimiroina* (Ito et al., 1998) e la *zapotina*, la quale esercita sia un'attività chemio preventiva, sia un'azione antitumorale in cellule

HT-29 di cancro del colon, mostrando una buona azione inibitoria sulla proliferazione cellulare (Mata-Greenwood et al., 2001; Murillo et al., 2007).

Di recente sono state anche evidenziate le proprietà afrodisiache dell'estratto di semi (Tabrez e Nabeeh, 2008).

Pochi studi sono disponibili sull'efficacia terapeutica e sulla tossicità di *C. edulis*: Lozoya-Legorreta et al. (1978) hanno osservato come gli estratti ottenuti dai semi, alla dose di 0,2 g/kg di peso, siano tossici nei cani causando la comparsa di analgesia, depressione del sistema nervoso centrale e morte; alla dose di 1 g/kg si verifica ipotermia, depressione motoria, paralisi e morte per depressione respiratoria; la somministrazione dell'estratto dei frutti ha suggerito, invece, una buona tollerabilità per l'uomo.

2.2 Metaboliti secondari di *Casimiroa edulis* Llave et Lex.

I primi composti ad essere stati individuati furono gli alcaloidi *casimiroina* e *casimiroidina* (Power e Callan, 1911) (Figure 2 e 3), contenuti nei semi; negli stessi anni venne estratto, sempre dai semi, un olio, il *casimirolo* (Esch e Kochmann, 1912).

Nel 1956 Aebi perfezionò l'isolamento della *casimiroidina*, mentre 17 anni dopo la molecola fu completamente sintetizzata in laboratorio (Panzcia e Townsend, 1973).

La struttura della *casimiroina* fu chiarita nel 1957 (Meisels e Sondheimer), mentre la scoperta dei meccanismi attraverso i quali avviene la sintesi di questa molecola furono illustrati nel 1964 da Weinstein e Hylton.

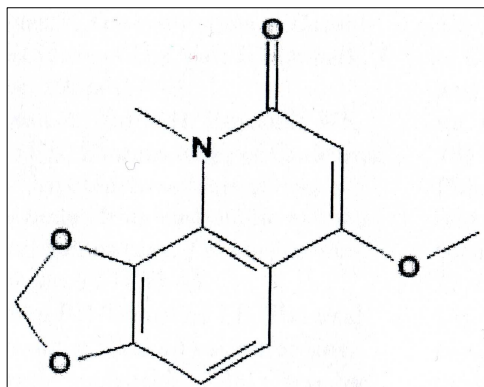


Figura 2. Casimiroina

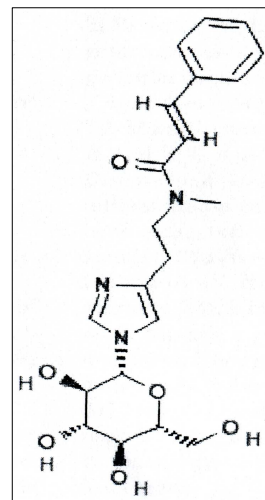


Figura 3. Casimiroidina

Dai semi sono stati, successivamente, isolati altri metaboliti, quali: *palmitamide*, *zapotina*, *N-benzoyltyramine*, *dimethylzapotina*, *casimiroinolo*, *9-hydroxy-4-methoxyfurano[3,2-g]benzopyran-7-*

one, zapotinina, isopimpinellina, bergaptenquinone, zapoterina, zapotidina, edulina, casimirolide (Kincl et al., 1956).

Secondo Aebi (1956) *casimiroina*, *casimiroidina* e *casimirolide* potrebbero essere dei prodotti di degradazione di uno stesso alcaloide.

Le strutture della *zapotina* (Figura 4) e della *zapotinina* vennero scoperte nel 1967 ad opera di Garratt et al.; la relazione tra struttura e attività della *zapotina* venne studiata da Hirschelman et al. (2002); nel 2007 questa molecola è stata sintetizzata in laboratorio ed è stata messa in evidenza la sua attività chemio preventiva (Murillo et al., 2007; Maiti et al., 2007).

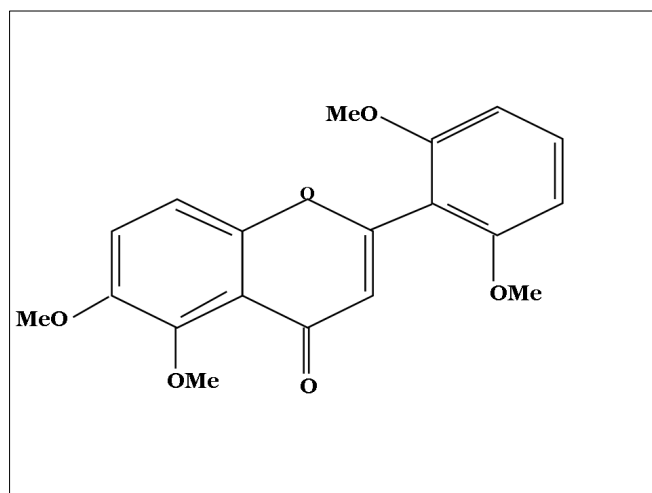


Figura 4. Zapotina

La *zapoterina* venne isolata e studiata, sotto il profilo strutturale, da Dreyer (1968), da Murphy et al. (1968) e da Garcia Argaez et al. (2001).

Dalle foglie e dai semi sono stati isolati numerosi derivati imidazolici e glicosidi flavonoidi come la *rutina* (Romero et al, 1983; Magos e Vidrio, 1991) (Figura 5).

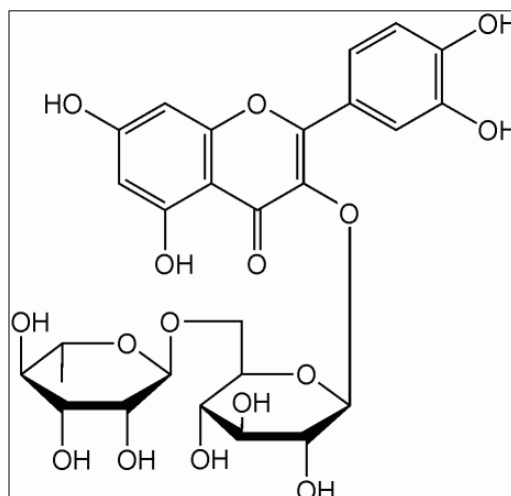


Figura 5. Rutina

Nel 1984 Enriquez et al. isolarono, dai semi di *C. edulis*, 4 furocumarine: la *fellopterina*, l'*8-geranyloxypsoralene*, il *5-geranyloxypsoralene* e il *5-methoxy-8-geranyloxypsoralene*.

Rizvi et al. (1985) isolarono alcuni *alcaloidi furochinolinici*; Awaad e Soliman (2004) individuarono altre *cumarine* [esculetina, scopoletina (Figure 6 e 7) e xanthotoxol], 3 *flavonoidi* (quercetina, rutina e hyperosoide) e un olio essenziale composto da circa 60 diverse molecole. La quercetina e la rutina hanno mostrato una buona attività antiossidante (Awaad et al., 2006).

Nel 2003 Garcia-Argaez et al. aggiunsero alla lista delle cumarine presenti in *Casimiroa edulis* anche l'*eraclenolo* e l'*eraclenina*.

Magos et al. (1999) isolarono dai semi di *C. edulis* alcuni composti amminici, quali la *fenetilamina acetone*, l'*N-metilistamina*, l'*N,N-dimetilistamina* (Major e Dursch, 1958) la *prolina*, l'*N-metilprolina*, l'*acido γ -aminobutirrico (GABA)*.

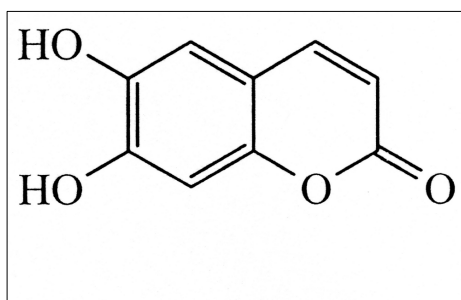


Figura 6. Esculetina

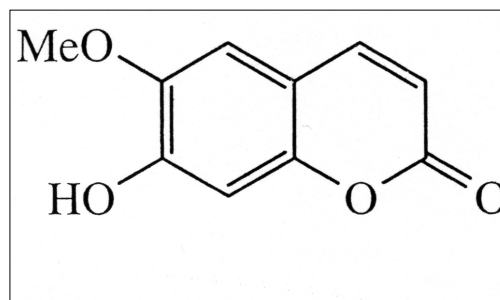


Figura 7. Scopoletina

I costituenti isolati dalla corteccia sono: *5,6-dimethoxyflavone*, *5,6-dihydroxy-flavone*, *bergaptene* (Figura 8), *isopimpinellina* (Figura 9), *edulina*, *edulitina*, *scopoletina*, *dictamnina*, γ -*fagarina* (Figura 10), *skimmianina*, *edulinina* (Iriarte et al., 1956).

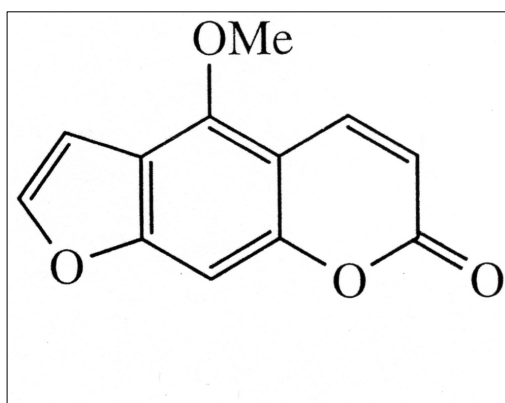


Figura 8. Bergaptene

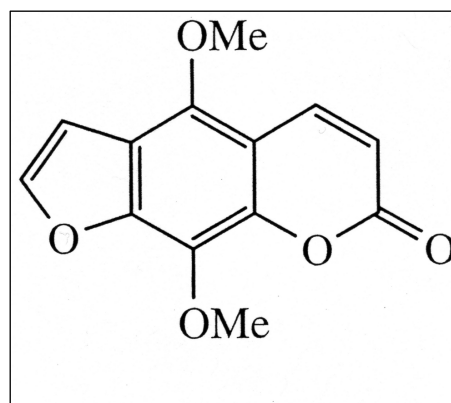


Figura 9. Isopimpinellina

La struttura dell'edulina fu chiarita da Sondheimer e Meisels (1958); la sintesi della molecola venne scoperta da Beyerman e Rooda (1960). L'edulitina e l'edulinina (Figura 11) vennero studiate, attraverso N.M.R. e spettrofotometria di massa, da Toube et al. (1967).

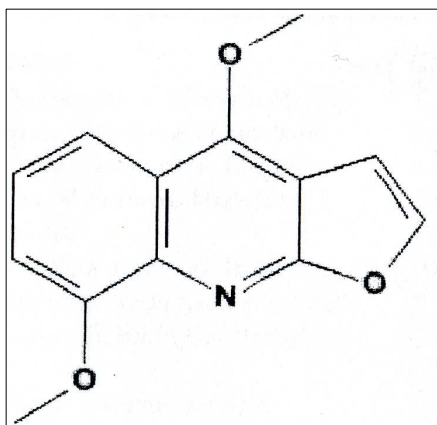


Figura 10. γ-Fagarina

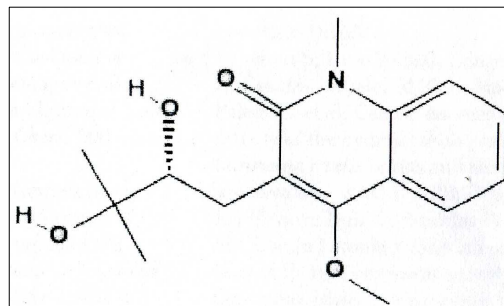


Figura 11. Edulinina

Di recente, sono stati identificati nuovi alcaloidi, quali il *2-(2'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)-5,8-dimethoxy-3-propyl-1H-quinolin-4-one*, il *5,8-dimethoxy-2-(3'-methoxyphenyl)-3-propyl-1H-quinolin-4-one*, il *5,8-dimethoxy-2-(3',4'-dimethoxyphenyl)-3-propyl-1H-quinolin-4-one*, e il *5,6-dimethoxy-2-(2',5',6'-trimethoxyphenyl)-1H-quinolin-4-one*.

Tutti e 4 i composti hanno mostrato una buona azione antiipertensiva (Awaad et al., 2007).

Le informazioni sopra riportate, frutto di un'accurata ricerca bibliografica, aiutano a comprendere il perché dell'interesse, sempre crescente, nei riguardi di questa pianta: sono innumerevoli, infatti, le possibili applicazioni terapeutiche degli estratti di *Casimiroa edulis* nella cura di disturbi molto diffusi in Italia e nei Paesi occidentali.

In Figura 12 è riportato un grafico che mostra l'ingente mole di lavori, inerenti le proprietà farmacologiche e fitochimiche della pianta, prodotti e pubblicati su riviste scientifiche dal 1926 al 2006.

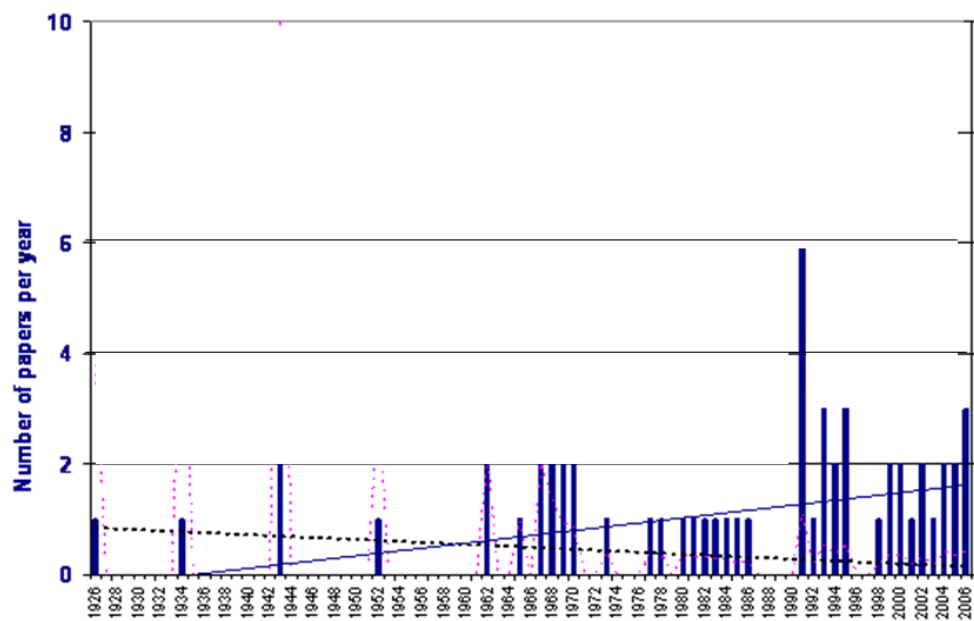


Figura 12. Grafico relativo ai lavori su *Casimiroa edulis* (1926 – 2006).

3. *Casimiroa edulis* Llave et Lex.

3.1 Inquadramento tassonomico

Casimiroa edulis Llave et Lex. è una pianta originaria del Messico, dove è ampiamente distribuita nel settore centrale e meridionale (Martinez, 1944, 1951), e dell'America centrale; attualmente è coltivata in vari paesi a clima subtropicale per via dei frutti, commestibili e dal sapore variabile a seconda delle cultivar. In Italia non è molto comune, essendo stata introdotta solo di recente.

Il termine generico è dedicato al cardinale Casimiro Gomez de Ortega (1740-1818), botanico spagnolo e direttore dell'Orto Botanico di Madrid; il termine *edulis* fa riferimento ai frutti con polpa dolce e profumata.

Al genere *Casimiroa* appartengono, oltre alla *C. edulis*, 4 altre specie: *C. pubescens* Ramirez, *C. pringlei* Engl. e *C. watsonii* Engl., confinate al territorio del Messico, e *C. emarginata* Standl. & Steyererm, descritta solo per il Guatemala.

Sulla base di una revisione sistematica basata sugli aggiornamenti più recenti (2003) dell'*Angiosperm Phylogeny Group* (sistema APG II), la pianta appartiene:

- alla Divisione Magnoliophyta;
- alla Classe Magnoliopsida;
- alla Sottoclasse Rosidae;
- all'Ordine Sapindales;
- alla Famiglia Rutaceae.

3.2 Famiglia Rutaceae

Le Rutaceae comprendono numerose specie (circa 1600) in gran parte legnose caratterizzate dalla presenza di ghiandole oleifere contenenti essenze fortemente aromatiche. L'apparato vegetativo presenta foglie spirali o opposte, senza stipole.

I fiori sono ermafroditi, attinomorfi o, soltanto di rado, debolmente zigomorfi, con peduncolo allargato in un disco; hanno un'organizzazione pentamera o tetramera, con calice dialisepalo, corolla dialipetala, androceo formato da 2 verticilli di 4-5 stami, gineceo di 5 carpelli (raramente 4 oppure 1-molti), concresciuti in un ovario supero con 5-10 logge.

Il frutto è spesso una bacca, ma può anche essere una drupa o una capsula.

La famiglia delle Rutaceae è molto importante dal punto di vista economico: il genere *Citrus* comprende, infatti, numerose specie e cultivar largamente coltivate per i frutti, denominati complessivamente agrumi. Tra le specie più conosciute si ricordano l'arancio amaro (*Citrus aurantium*), l'arancio dolce (*C. sinensis*), il pompelmo (*C. maxima*), il pompelmo rosa o "grape fruit" (*C. paradisi*), il limone (*C. limon*), il mandarino (*C. reticulata*), il cedro (*C. medica*), il bergamotto (*C. bergamia*).

Le Rutaceae spontanee nelle nostre regioni si riducono a poche specie erbacee o suffrutescenti tra cui soprattutto quelle del genere *Ruta*, quale, ad esempio, *Ruta chalepensis* L., diffusa in ambienti piuttosto aridi.

3.3 Distribuzione geografica e caratteristiche botaniche

Casimiroa edulis Llave et Lex. è un albero sempreverde diffuso nei boschi decidui e nelle basse foreste subtropicali. Lo si rinviene, spontaneo e coltivato, nel Messico e nell'America centrale (Figura 13), ma è stato introdotto anche in Guatemala, El Salvador, Costa Rica, Sud America, Bahamas, regione Mediterranea, India, Filippine.



Figura 13. Distribuzione originaria di *Casimiroa edulis* Llave et Lex.

È coltivato, a scopi commerciali, anche in Nuova Zelanda e in alcune zone del Sud Africa. In Israele è stato prestato particolare interesse alla pianta a partire dal 1935, allorquando si iniziarono a coltivare numerose varietà.

La specie è stata introdotta in California ad opera dei monaci Francescani, intorno al 1810, ed è tuttora coltivata, limitatamente alla parte meridionale dello stato, spesso come pianta ornamentale.

Nell'America centrale la pianta è spesso coltivata con la funzione di riparare dal sole le piantagioni di caffè.

È una pianta che tollera condizioni di siccità e si adatta a temperature medie annue di circa 18° C. Predilige suoli ben drenati, di natura sabbiosa o argillosa, derivanti sia da substrati granitici che calcarei.

Casimiroa edulis è una pianta che, a maturità, può raggiungere i 18 metri di altezza, con i rami giovani densamente pelosi (Figura 14).

Il fusto è robusto, rivestito da una spessa corteccia di colore grigio chiaro e di aspetto verrucoso.



Figura 14. Portamento di *Casimiroa edulis* Llave et Lex.

Le foglie sono lungamente picciolate, alterne e con la pagina superiore verde brillante; la lamina è palmata, suddivisa in 5 foglioline più piccole (a volte 3 o 7), ellittiche oppure ovali, lunghe 10-

15 centimetri, con base cuneata; nella pagina superiore è evidente la nervatura pennata (Figura 15).



Figura 15. Foglie di *Casimiroa edulis* Llave et Lex.

I fiori sono piccoli, pentameri, attinomorfi, riuniti in infiorescenze a grappolo o a pannocchia (Figura 16); generalmente sono ermafroditi ma, occasionalmente, possono essere unisessuali per aborto degli stammi. I sepali hanno la sembianza di lacinie irsute; i petali sono di colore bianco-verdastro. L'androceo è costituito da 5 stami ingrossati alla base; il gineceo è composto da un ovario supero, diviso in 5 logge, munito di stimma sessile.

I frutti sono delle drupe, di forma più o meno tondeggianti e di circa 10 centimetri di diametro; esistono delle varietà con epicarpo verde, molto simili alle mele cotogne, che presentano una polpa chiara; altre

con pellicola esterna giallo-arancio e con una polpa tendente al giallo. All'interno dei frutti sono racchiusi 5-7 semi (Figura 17).



Figura 16. Fiori di *Casimiroa edulis* Llave et Lex.



Figura 17. Frutti di *Casimiroa edulis* Llave et Lex.

4. METODICHE DI LABORATORIO

Le foglie, i semi e la corteccia di *Casimiroa edulis* sono stati raccolti in località Santa Lucia, nei pressi di Capoterra (Cagliari), nel mese di Settembre del 2007 e sono stati sottoposti ad estrazione con opportuni solventi, al fine di ottenere degli estratti da sottoporre a screening farmacologici in vivo.

Di seguito vengono descritti gli strumenti e le metodiche impiegate per estrarre il fitocomplesso da ciascuna droga.

4.1 Strumenti

4.1.1 Soxhlet

È un apparecchio impiegato per estrarre a caldo i principi attivi da una droga, con l'uso di solventi bassobollenti. Consente di arrivare all'esaurimento della droga ma, poiché si tratta di un'estrazione a caldo, non è adatto per estrarre le sostanze termolabili.

Il Soxhlet (Figura 18) è costituito da tre componenti fondamentali sovrapposte: in basso un pallone con il collo smerigliato, a metà l'estrattore vero e proprio e, in alto, un refrigerante a bolle. La camera di estrazione è formata da un tubo centrale con il fondo chiuso, comunicante con il pallone sottostante per mezzo di due condotti di diametro inferiore, uno per il passaggio del solvente, allo stato di vapore, e un sifone per lo scarico dell'estratto.

La droga viene posta in un filtro a ditale, permeabile al solvente, collocato al centro della camera di estrazione. Il solvente viene versato all'interno del pallone, il quale è immerso in un bagno termostatico con temperatura regolata in funzione del punto di ebollizione del solvente.

L'estrazione avviene riscaldando il solvente: i vapori che si sviluppano, salendo lungo il tubo laterale, entrano nel corpo centrale per poi salire fino al refrigerante; qui condensano e ricadono nel ditale fino a riempire l'estrattore. Quando il livello del liquido nel soxhlet raggiunge lo stesso livello della parte superiore del sifone, il liquido contenente i principi attivi estratti si riverserà nel pallone.

Il procedimento si ripeterà più volte, fino a quando il solvente, di colore chiaro, non si colora più passando attraverso la droga.

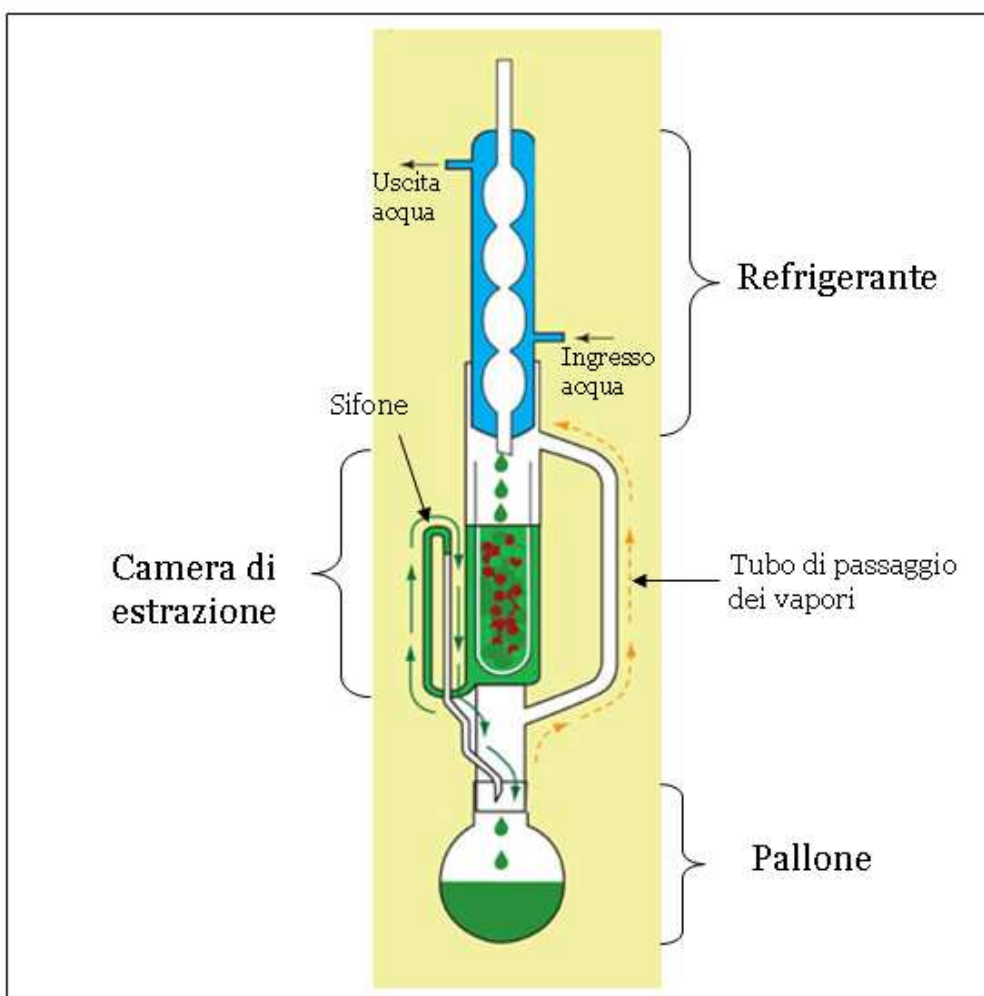


Figura 18. Soxhlet

4.1.2 Rotavapor

È uno strumento impiegato comunemente per allontanare i solventi da una soluzione di un composto d'interesse, tramite evaporazione a bassa pressione. È costituito da cinque elementi principali (Figura 19): un pallone di evaporazione contenente la soluzione da evaporare; un bagno termostatico in cui si immerge il pallone, che mantiene la soluzione alla temperatura opportuna; un meccanismo motorizzato in grado di mettere in rotazione il pallone di evaporazione; un condensatore verticale o inclinato che provvede ad abbattere il grosso dei vapori sviluppatisi; un pallone di raccolta per i solventi condensati.

L'evaporazione viene favorita dalla applicazione, all'evaporatore rotante, di un'opportuna depressione (vuoto), che abbassa la temperatura di ebollizione del solvente; sotto vuoto, infatti, tutti i solventi bollono, e quindi evaporano, a temperature più basse rispetto a quelle necessarie lavorando a pressione atmosferica.

Un ulteriore aiuto all'evaporazione viene dato dal riscaldamento del pallone tramite il bagno termostatico a temperatura regolabile.

La rotazione del pallone, infine, creando un velo di soluzione continuamente rinnovata su tutta la superficie del pallone, aumenta la superficie della soluzione, incrementando ulteriormente la velocità di evaporazione. I vapori di solvente generati si allontanano incontrando quindi la superficie del condensatore opportunamente raffreddata, e qui condensano formando gocce che cadono e vengono convogliate nel pallone di raccolta. Il più comune condensatore è quello a serpentina, in cui circola acqua fredda o una soluzione refrigerata.

Al termine delle operazioni si ottiene la separazione del soluto, che rimane nel pallone di evaporazione, dal solvente, che finisce nel pallone di raccolta.

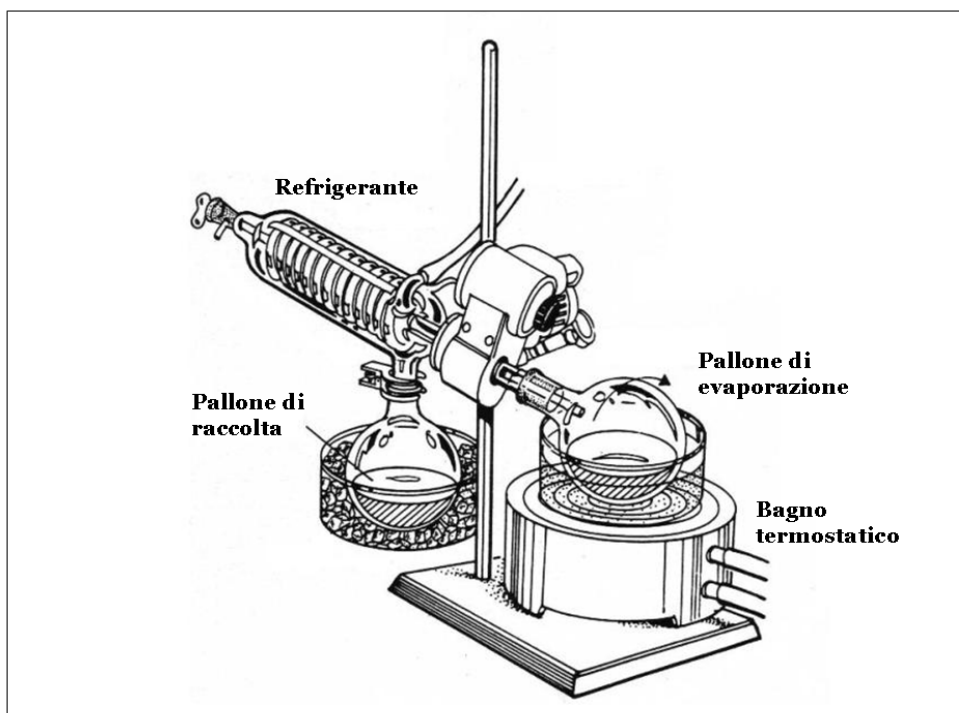


Figura 19. Rotavapor

4.2. Tecniche estrattive

4.2.1 Estrazione del fitocomplesso dalle foglie fresche.

420 g di foglie fresche, preventivamente sminuzzate, sono state sottoposte a macerazione all'interno di una bottiglia di vetro ambrato contenente una soluzione composta da Acetone:Etanolo in rapporto 1:1.

La bottiglia è stata conservata al buio, onde evitare che la droga subisse alterazioni indotte dalla luce; durante questa fase si è provveduto a scuoterla energicamente, per favorire il contatto tra il solvente e le singole particelle della droga, e conseguentemente una migliore penetrazione del solvente.

Dopo 8 giorni si è provveduto a filtrare ripetutamente la soluzione, in modo da eliminare le particelle in sospensione, recuperando in una beuta il solvente contenente il fitocomplesso (Figura 20).



Figura 20. Filtrazione dell'estratto di foglie fresche di *Casimiroa edulis*

La miscela è stata successivamente portata a secco mediante rotavapor e si è ottenuto un estratto di 27,5 g.

4.2.2 Estrazione del fitocomplesso dalle foglie secche.

600 g di foglie fresche sono stati essiccati in stufa ventilata, ad una temperatura di 40° C per 48 h.

Si sono ottenuti 300 g di droga secca, i quali sono stati sottoposti ad estrazione in una miscela di Etanolo:Acetone (1:1); al fine di ridurre i tempi ci si è avvalsi, in questa estrazione, del soxhlet (Figura 21).

La matrice è stata inserita all'interno della camera di estrazione dell'apparecchio, nella quale è stata ripetutamente attraversata dalla miscela di Etanolo:Acetone (1:1), la quale si è caricata dei principi attivi.



Figura 21. Estrazione del fitocomplesso dalle foglie di *Casimiroa edulis* con il soxhlet e il rotavapor.

Dopo un periodo di 2 giorni il processo estrattivo si è concluso (il solvente, di colore chiaro, non si colorava più passando attraverso la droga).

La miscela contenente il fitocomplesso è stata concentrata mediante l'utilizzo del rotavapor (Figura 21). La resa totale è stata di 30,5 g.

4.2.3 Estrazione del fitocomplesso dai semi.

500 g di semi (Figura 22) sono stati frantumati in piccoli pezzi e sottoposti a due successive estrazioni, con solventi diversi, in un imbuto separatore della capacità di 2 l.



Figura 22. Semi di *Casimiroa edulis*

Nella prima estrazione, necessaria al fine di “sgrassare” la droga, è stato impiegato l'Etere di petrolio.

Dopo un periodo di 8 giorni si è provveduto a recuperare il sovente, attraverso il rubinetto dell'imbuto separatore (Figura 23).



Figura 23. Imbuto separatore

La matrice, ripulita dai grassi, è stata quindi sottoposta ad una seconda estrazione con una miscela Etanolo:Acqua distillata (70%:30%); anche in questo caso il tempo di macerazione è stato di 8 giorni, al termine dei quali si è provveduto a filtrare, recuperare e concentrare l'estratto (Figura 24). La resa totale è stata di 53 g.



Figura 24. Filtrazione e concentrazione dell'estratto di semi di *C. edulis*

4.2.4 Estrazione del fitocomplesso dalla corteccia.

920 g di corteccia sono stati frantumati in piccoli pezzi (Figura 25) ed essiccati in stufa ventilata, alla temperatura di 40° C per 48 h.



Figura 25. Preparazione della corteccia di *Casimiroa edulis*

Successivamente la droga essiccata (450 g) è stata polverizzata e sottoposta a due successive estrazioni, con solventi diversi [Etere di petrolio e miscela di Etanolo:Acqua distillata (70%:30%)].

La metodica estrattiva seguita è la stessa descritta per l'estrazione del fitocomplesso dai semi. La resa totale è stata di 19 g.

Tutti gli estratti ottenuti sono stati conservati, fino al loro impiego, all'interno di boccette in vetro ambrato (Figura 26), riposte al fresco e al riparo dalla luce del sole.



Figura 26. Estratti di *Casimiroa edulis*

5. INDAGINE FARMACOLOGICA

I saggi farmacologici sono stati eseguiti in collaborazione con il Dipartimento di Tossicologia dell'Università di Cagliari e con l'MGV's Pharmacy College di Nashik, in India, e hanno avuto l'obiettivo di valutare gli effetti farmacologici, a carico del SNC, dei seguenti estratti:

- estratto Acetone:Etanolo (1:1) di foglie fresche;
- estratto Acetone:Etanolo (1:1) di foglie essiccate;
- estratto Etanolo:Acqua distillata (70%:30%) di semi;
- estratto Etanolo:Acqua distillata (70%:30%) di corteccia.

5.1 Valutazione degli effetti degli estratti di *Casimiroa edulis* sull'attività motoria, mediante l'uso del test cage.

5.1.1 Animali

I test sono stati eseguiti su ratti maschi di ceppo Wistar, del peso di 200-300 g. Gli animali sono stati stabulati singolarmente in gabbie trasparenti di policarbonato (lunghezza 47 cm, larghezza 23 cm e altezza 19 cm) con fondo ricoperto di segatura e la parte superiore costituita da una griglia metallica (Figura 27). Essi sono stati tenuti secondo le condizioni standard di laboratorio (cicli di luce-buio di 12 ore, temperatura di $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidità del $55 \pm 5\%$), con libero accesso all'acqua e al cibo, tranne durante gli esperimenti.



Figura 27. Gabbia trasparente in policarbonato

5.1.2 Strumenti

L'attività motoria totale di ciascun ratto è stata valutata con l'ausilio di apposite gabbie (*test cage*) munite di un sistema di registrazione a fotocellule (Opto Varimex Mini, Columbus Instruments, Ohio), che consente di rilevare sia i movimenti orizzontali sia quelli perpendicolari degli animali (Figura 28).



Figura 28. Test cage

Con questo strumento sono stati registrati due tipi di attività motoria:

- *attività locomotoria*, costituita dai movimenti dell'animale lungo gli assi della gabbia;
- *attività motoria totale*, rappresentata dalla combinazione dell'attività locomotoria e del comportamento stereotipato.

I comportamenti stereotipati sono dei movimenti afinalistici e confinati eseguiti dall'animale conseguentemente all'attivazione del sistema dopaminergico. In questo studio sono state registrate le seguenti stereotipie:

- *Grooming* (toelettamento);
- *Rearing* (sollevamento sulle zampe posteriori) (Figura 29);
- *Sniffing* (annusamento confinato verso il fondo della gabbia);
- *Licking* (leccamento confinato);
- *Chewing* (masticazione a vuoto).

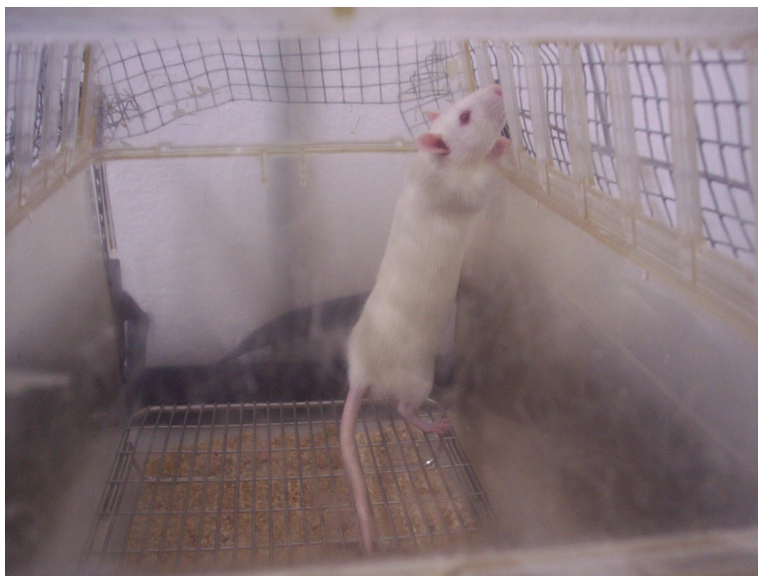


Figura 29. Rearing

I movimenti stereotipati sono stati valutati osservando il comportamento di ciascun animale per un totale di 60 minuti complessivi.

5.1.3 Procedura sperimentale

Il giorno dell'esperimento ciascun animale è stato posto individualmente all'interno della *test cage*, 60 minuti prima che il test avesse inizio, in modo che si abituasse all'ambiente.

Al termine di questo periodo di tempo si è provveduto a somministrare ai ratti, suddivisi in 6 gruppi, i seguenti preparati:

- Veicolo (acqua distillata, 5 ml/kg i.p.);
- estratto Etanolo:Acqua distillata (70%:30%) di semi di *Casimiroa edulis* (100 mg/kg i.p.) precedentemente disciolto in acqua distillata (5 ml/kg);
- estratto Acetone:Etanolo (1:1) di foglie fresche di *Casimiroa edulis* (200 mg/kg p.o);
- estratto Acetone:Etanolo (1:1) di foglie essiccate di *Casimiroa edulis* (200 mg/kg p.o);
- estratto Etanolo:Acqua distillata (70%:30%) di corteccia di *Casimiroa edulis* (200 mg/kg i.p.) precedentemente disciolto in acqua distillata (5 ml/kg);
- Caffaina (3 mg/kg i.p.);

Gli estratti di semi e corteccia, solubili in acqua distillata, sono stati somministrati per via intraperitoneale (Figura 30); quelli ottenuti dalle foglie (fresche e secche), insolubili in acqua distillata, sono stati disciolti in una miscela composta da dimetilsolfossido (DMSO) e Propylene glycol (PEG) nel rapporto di 1:1, e successivamente somministrati per via orale (Figura 30).



Figura 30. Somministrazioni intraperitoneale e orale degli estratti di *C. edulis*

Per i successivi 60 minuti, ad intervalli di 10 minuti, sono state misurate l'attività motoria e quella stereotipata.

5.2 Valutazione degli effetti degli estratti di *Casimiroa edulis* sull'attività motoria, mediante l'apparato *open-field*.

5.2.1 Animali

Per questo test sono stati impiegati topi maschi del ceppo Albino Swiss (18-25 g), suddivisi in gruppi composti ciascuno da 5 animali.

5.2.2 Strumenti

È stato utilizzato l'apparato *open-field*, consistente in una cassetta di legno compensato (70 x 60 x 30 cm) bianco, avente il pavimento suddiviso in 16 quadrati.

5.2.3 Procedura sperimentale

I topi sono stati divisi in 4 gruppi di 5 e sono stati trattati con il veicolo (Gruppo I), con la caffeina (3 mg/kg i.p.)(Gruppo II) o con l'estratto di foglie fresche di *Casimiroa edulis* (100 e 200 mg/kg)(Gruppi III e IV). Dopo 30 minuti dall'iniezione gli animali sono stati sistemati, singolarmente, all'interno dell'apparato *open-field* e si è provveduto a contare, per un periodo di 5 minuti, il numero di quadrati da loro attraversati (con tutte e 4 le zampe), e il numero di *rearings*.

5.3 Valutazione dell'azione antidepressiva degli estratti di *Casimiroa edulis* attraverso il Test del nuoto forzato.

Il test del nuoto forzato (FST, *forced swimming test*) è il modello farmacologico sperimentale più ampiamente utilizzato per valutare l'attività antidepressiva di una droga (Cryan et al., 2002). È definito modello di *behavioral despair* (disperazione comportamentale) in quanto l'animale, costretto a nuotare in una piccola vasca dalla quale non può fuggire, dopo un periodo di nuoto vigoroso, rimane immobile (fase di disperazione).

5.3.1 Animali

I test sono stati eseguiti su ratti maschi di ceppo Wistar, del peso di 270-320 g, suddivisi in 5 gruppi di 4.

5.3.2 Procedura sperimentale

La procedura usata per il FST (*forced swimming test*) è un riadattamento del metodo proposto da Porsolt et al. (1977, 1978), sulla base delle indicazioni di Lucki (1997) e Cryan et al. (2002).

L'apparecchiatura consiste in un cilindro di plastica alto 50 cm e largo 20, riempito di acqua alla temperatura di 25° C, fino ad un livello di 30 cm (Figura 31).

24 ore prima del test i ratti sono stati immersi singolarmente nell'acqua per un periodo di 15 minuti (pre-test); successivamente sono stati rimossi, asciugati con della carta e tenuti per un'ora in una stanza riscaldata prima di essere rimessi nella loro gabbia.

Nelle 24 ore successive, prima del vero e proprio test, i ratti, suddivisi in 5 gruppi, hanno ricevuto per 3 volte l'acqua distillata (5 ml/kg i.p.) (Gruppo I), l'estratto di semi (100 mg/kg i.p.) (Gruppo II), quello di foglie fresche (50 mg/kg p.o.) (Gruppo III), quello di corteccia (100

mg/kg i.p.)(Gruppo IV), o la *fluoxetina* (10 mg/kg i.p.)(Gruppo V), un inibitore selettivo del re-uptake della serotonina (Beasley et al., 1992), usato come controllo positivo.

Tali somministrazioni hanno avuto luogo 1 ora dopo il pre-test, 5 ore e 1 ora prima del test.



Figura 31. Cilindro di plastica impiegato per il test del nuoto forzato

Durante il test del nuoto forzato, della durata di 5 minuti, i ratti sono stati nuovamente messi all'interno del cilindro pieno d'acqua e si è preso nota della durata delle seguenti risposte comportamentali:

- *Climbing behavior*, movimenti attivi delle zampe anteriori, di solito diretti verso le pareti del cilindro (Figura 32);
- *Swimming behavior*, movimenti attivi di nuoto all'interno del cilindro (Figura 33);

- *Immobility*, comportamento passivo dell'animale che compie solo i movimenti necessari per mantenersi a galla con la testa fuori dall'acqua (Figura 34).

Un aumento nelle risposte attive (*swimming* e *climbing*), e una riduzione dell'*immobilità* sono considerati profili comportamentali consistenti in un'azione simil-antidepressiva (Cryan et al., 2002).



Figura 32. Risposta comportamentale attiva: climbing.



Figura 33. Risposta comportamentale attiva: nuoto.

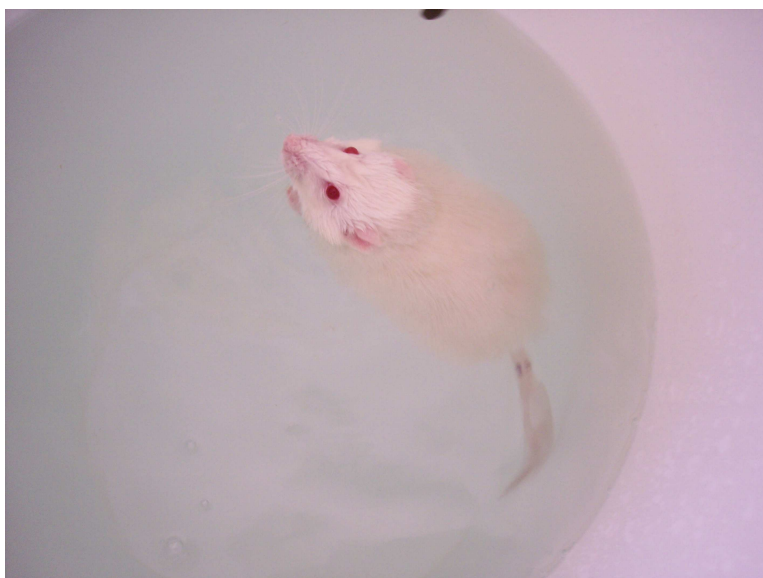


Figura 34. Risposta comportamentale passiva: immobilità.

5.4 Valutazione dell'effetto sedativo-ipnotico degli estratti di *Casimiroa edulis*, determinata con il test del potenziamento dell'ipnosi indotta da *Pentobarbital*.

Il test è basato sulla proprietà delle droghe sedativo-ipnotiche di causare, negli animali da laboratorio, la perdita del riflesso di raddrizzamento: l'animale, dopo essere stato delicatamente adagiato sulla schiena, non si rigira sulle zampe (Soulimani et al., 2001) (Figura 35).



Figura 35. Perdita del riflesso di raddrizzamento

La durata del sonno indotto è definita come il periodo di tempo che intercorre tra la perdita e il recupero del riflesso di raddrizzamento, in quanto quest'ultimo avvenimento è considerato il momento di cessazione dell'ipnosi (Carlini et al., 1986; Gonzalez-Trujano et al., 1998).

5.4.1 Animali

Per questo test sono stati impiegati ratti maschi del ceppo Wistar (280-330 g), suddivisi in 4 gruppi composti ciascuno da 4 animali.

5.4.2 Procedura sperimentale

Gli animali hanno ricevuto, 1 ora prima dell'iniezione di Pentobarbital (50 mg/kg i.p.): la soluzione salina (5 ml/kg i.p.) (Gruppo I), l'estratto di semi di *Casimiroa edulis* (500 mg/kg i.p.) (Gruppo II), l'estratto di foglie fresche di *C. edulis* (1000 mg/kg p.o.) (Gruppo III) e l'estratto di corteccia (500 mg/kg i.p.) (Gruppo IV). Il Pentobarbital è stato solubilizzato in una soluzione composta da glicole propilenico, etanolo 90% e acqua distillata.

Dopo la somministrazione del barbiturico si è provveduto a osservare:

- la *latenza*, periodo di tempo intercorso tra la somministrazione del Pentobarbital e la perdita del riflesso di raddrizzamento da parte dell'animale;
- la *durata del sonno*, intesa come periodo di tempo compreso tra la perdita e il riacquisto del riflesso di raddrizzamento.

5.5 Valutazione dell'effetto ansiolitico degli estratti di *Casimiroa edulis*, determinata con il test del labirinto a croce elevato (*elevated plus maze*).

Questo è il test standard impiegato per valutare l'effetto ansiolitico/ansigenico delle droghe (Hogg, 1996; Lister, 1987). Si basa sulla naturale avversione dei roditori per gli spazi aperti (dove è più difficile difendersi) e sulla loro preferenza per gli spazi chiusi, che ricordano la tana (Rodgers e Dalvi, 1997). Per questa ragione, la proporzione tra le esplorazioni spontanee compiute dagli animali negli spazi aperti ed in quelli chiusi del labirinto fornisce una misura comportamentale dell'ansia.

Una droga che ha effetto ansiolitico determinerà un aumento del tempo trascorso negli spazi aperti (Handley e McBlane, 1993); al contrario una diminuzione di questo tempo indica un'attività ansigenica.

5.5.1 Animali

Per questo test sono stati impiegati topi maschi del ceppo Albino Swiss (18-25 g), suddivisi in gruppi composti ciascuno da 5 animali.

5.5.2 Strumenti

Il labirinto utilizzato è costituito da quattro bracci, disposti in modo tale da formare una croce: due bracci (25 cm x 5 cm), posti uno di fronte all'altro, non possiedono le pareti (bracci aperti), mentre gli altri due (25 cm x 5 cm x 20 cm) hanno le pareti (bracci chiusi). I bracci sono connessi tra loro da una piattaforma centrale che costituisce il punto di partenza. L'intero labirinto è stato posto a 25 cm da terra (Figura 36).

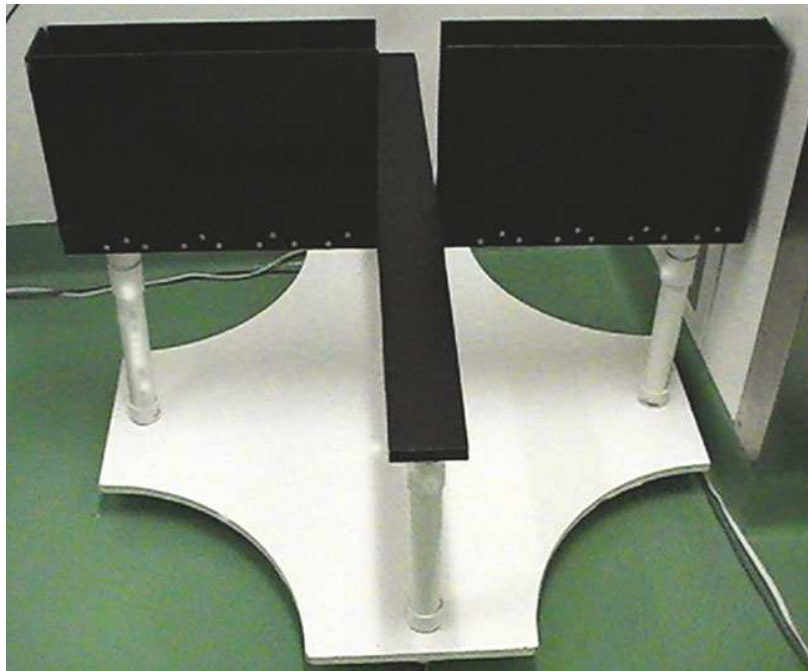


Figura 36. Labirinto a croce elevato (EPM)

5.5.3 Procedura sperimentale

I topi, suddivisi in 4 gruppi di 5, hanno ricevuto il veicolo (Gruppo I), la caffeina (3 mg/kg i.p.)(Gruppo II) o l'estratto di foglie fresche di *Casimiroa edulis* (100 e 200 mg/kg i.p.)(Gruppi III e IV).

La caffeina è stata impiegata quale controllo positivo (Bhattacharya S.K. et al., 1997).

Dopo 30 minuti dalla somministrazione ciascun topo è stato sistemato, singolarmente, nel centro del labirinto a croce, rivolto verso un braccio chiuso e sono stati registrati, nei 5 minuti del test:

- il numero di ingressi nei bracci aperti e chiusi (tutte e 4 le zampe dell'animale devono essere all'interno del braccio);
- il tempo trascorso dall'animale all'interno di ciascun tipo di braccio.

5.6 Valutazione dell'effetto degli estratti di *Casimiroa edulis* sulla catalessi indotta dall'aloiperidolo.

L'aloiperidolo è un agente neurolettico, antagonista dei recettori D₂ della dopamina, che nei ratti produce la catalessi, un fenomeno per cui un soggetto mantiene per un tempo indefinito una certa posizione, in uno stato di inerzia e torpore, estraneo all'ambiente, pur senza la completa abolizione della coscienza. In particolare, sembra che il blocco dei recettori postsinaptici D₁ e D₂, localizzati nei neuroni dello striato, sia la principale causa della catalessi indotta da aloiperidolo (Ossowska et al., 1990; Sanberg, 1980; Koffer et al., 1979). Malec (1997) ha mostrato l'interazione antagonistica tra i recettori A_{2A} dell'adenosina e quelli D₂ della dopamina e ha suggerito un coinvolgimento dei recettori A₂ nel meccanismo della catalessi.

Tale fenomeno è inibito dalle droghe che aumentano la trasmissione dopaminergica o riducono quella colinergica, così come dalle sostanze impiegate nel trattamento del Parkinsonismo. La caffeina, un antagonista non specifico del recettore dell'adenosina, agisce in maniera sinergica con gli agenti antimuscarinici, inibendo la catalessi indotta dall'aloiperidolo (Moo-Puc et al., 2003).

5.6.1 Animali

Per questo test sono stati impiegati topi maschi del ceppo Albino Swiss (18-25 g).

5.6.2 Procedura sperimentale

I topi, divisi in gruppi di 5 ciascuno, 30 minuti prima dell'iniezione di aloiperidolo (1 mg/kg i.p.), sono stati trattati nel seguente modo: il Gruppo I ha ricevuto il veicolo, il Gruppo II la caffeina (3 mg/kg), i Gruppi III, IV e V l'estratto di foglie fresche di *Casimiroa edulis* (50,

100 e 200 mg/kg), i Gruppi VI e VII l'estratto di *Casimiroa edulis* (100 e 200 mg/kg) e la caffeina (3 mg/kg) insieme.

La durata della catalessi è stata misurata dopo 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minuti, ponendo le zampe anteriori dei topi in una sbarra di legno (2,54 cm di diametro) messa a 3,5 cm dal piano del tavolo, e registrando il tempo intercorso prima che gli animali le rimuovessero dalla sbarra (Ferre et al., 1990).

5.7 Valutazione dell'effetto degli estratti di *Casimiroa edulis* sulla catalessi indotta dall'aloiperidolo, nei topi trattati per 6 giorni con la caffeina e con gli estratti.

Questo test è simile al precedente ed è stato eseguito allo scopo di verificare se l'uso prolungato dell'estratto di foglie fresche di *C. edulis* e/o di caffeina fosse in grado di inibire la catalessi indotta dall'aloiperidolo.

5.7.1 Animali

Sono stati impiegati topi maschi del ceppo Albino Swiss (18-25 g).

5.7.2 Procedura sperimentale

I topi, divisi in 7 gruppi di 5 ciascuno, sono stati trattati, una volta al giorno e per un totale di 6 giorni, con il veicolo (Gruppo I), la caffeina (3 mg/kg i.p.)(Gruppo II), l'estratto di foglie di *Casimiroa edulis* (50, 100, 200 mg/kg i.p.)(Gruppi III, IV e V) o la caffeina insieme all'estratto di *C. edulis* (100 e 200 mg/kg i.p.)(Gruppi VI e VII).

Il 7° giorno è stato sospeso, a tutti gli animali, il trattamento con le droghe sopra elencate ed è stato somministrato l'aloiperidolo (1 mg/kg i.p.); si è provveduto a misurare la durata della catalessi, utilizzando il bar test (Ferre et al., 1990), dopo 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minuti dall'iniezione di aloiperidolo.

5.8 Valutazione dell'effetto anticonvulsivante degli estratti di *Casimiroa edulis*, mediante il metodo delle convulsioni indotte dal PTZ (Pentilenetetrazolo): un modello animale di “Crisi di assenza” (Piccolo Male).

Il Pentilenetetrazolo induce, nei ratti o nei topi, convulsioni cloniche simili a quelle osservate nel “Piccolo Male epilettico”. Tale sostanza antagonizza l'azione dell'acido gamma-aminobutirrico e induce convulsioni, le quali sono inibite da droghe come il diazepam, il sodio valproato e la gabapentina.

5.8.1 Animali

Sono stati impiegati topi del ceppo Albino Swiss (25-30 g), divisi in 4 gruppi di 5 ciascuno.

5.8.2 Procedura sperimentale

I topi sono stati trattati con il veicolo (Gruppo I), il Diazepam (1 mg/kg i.p.)(Gruppo II), o l'estratto di foglie fresche di *Casimiroa edulis* (100 e 200 mg/kg i.p.)(Gruppi III e IV), 30 minuti prima dell'iniezione sottocutanea di PTZ (80 mg/kg)(Figura 37).



Figura 37. Somministrazione sottocutanea di PTZ

Si è provveduto a prendere nota del tempo intercorso prima di poter osservare i seguenti episodi:

- Spasmi mioclonici;
- Convulsioni cloniche.

È stato inoltre annotato il numero di animali morti nelle 24 ore successive. Il ritardo nell'insorgere di questi comportamenti è indicativo di un'attività anticonvulsivante.

5.9 Valutazione dell'effetto anticonvulsivante degli estratti di *Casimiroa edulis*, mediante il modello degli stati epilettici indotti da Litio-Pilocarpina.

Sebbene il Litio non abbia attività pro-convulsivante nei ratti, il pretrattamento con questa sostanza, seguito da dosi sub-convulsivanti di Pilocarpina o di altri agonisti colinergici, provoca crisi limbiche (Persinger et al., 1988). Le convulsioni prodotte inducono continue crisi che si protraggono per diverse ore e che si concludono con la morte dell'animale. Tale modello sperimentale può essere considerato simile allo stato epilettico umano.

5.9.1 Animali

Sono stati impiegati ratti di ceppo Albino, di entrambi i sessi (150-175 g), divisi in 4 gruppi di 6.

5.9.2 Procedura sperimentale

A tutti gli animali è stato somministrato il Litio solfato (3 meq/kg i.p.) 24 ore prima della Pilocarpina (30 mg/kg i.p.).

30 minuti prima dell'iniezione di Pilocarpina gli animali del Gruppo I hanno ricevuto il veicolo, quelli del Gruppo II il Diazepam (1 mg/kg i.p.), quelli del Gruppo III e IV l'estratto di semi di *Casimiroa edulis* (rispettivamente 100 e 200 mg/kg i.p.).

La violenza delle convulsioni è stata stimata, come descritto da Patel et al. (1988), utilizzando la seguente scala:

0 = nessuna risposta

1 = strofinamento

2 = tremore

3 = oscillazioni della testa

4 = cloni degli arti anteriori

5 = rearing, caduta e cloni

5.10 Valutazione dell'effetto antinocicettivo: contrazioni addominali (writhing) indotte dall'acido acetico.

Il *writhing* è una risposta contrattile addominale causata da un'iniezione intraperitoneale di acido acetico o di qualsiasi altra sostanza irritante.

Conseguentemente a queste contrazioni la pancia dell'animale tocca il terreno e le zampe si protendono all'indietro rendendo difficoltosa la deambulazione. Gli analgesici che agiscono perifericamente inibiscono il *writhing* indotto dall'acido acetico.

5.10.1 Animali

Per questo test sono stati impiegati topi maschi del ceppo Albino Swiss (18-25 g), sistemati in 4 gruppi di 5 ciascuno.

5.10.2 Procedura sperimentale

Il primo gruppo ha ricevuto il veicolo (0,5% CMC); il secondo ed il terzo gruppo hanno ricevuto l'estratto di semi di *Casimiroa edulis* (50 e 100 mg/kg p.o.); il quarto gruppo ha ricevuto il Diclofenac (10 mg/kg p.o.), farmaco di riferimento. Dopo un periodo di tempo di 30 minuti ai topi di ciascun gruppo sono stati somministrati, per via intraperitoneale, 0,1 ml di una soluzione allo 0,6% di acido acetico.

Si è quindi provveduto a contare il numero delle contrazioni addominali per i successivi 30 minuti.

5.11 Valutazione dell'effetto antinfiammatorio: edema della zampa del ratto indotto dalla carragenina.

Questo test è un modello sperimentale ampiamente utilizzato nella ricerca di nuove sostanze ad azione antinfiammatoria (Winter et al., 1962; Adeyemi et al., 2002).

La λ carragenina è un agente flogistico presente in diverse specie di alghe rosse (Anderson e Rees, 1966), la quale provoca un'inflammatione mediante il rilascio di istamina, serotonina, bradichina e prostaglandine (Di Rosa, M., 1972; Goetzel, E.J., 1980; Vinegar et al., 1969). Le droghe che esercitano attività antinfiammatoria mediante inibizione delle prostaglandine riducono l'edema alla zampa nell'arco di 3 ore dalla somministrazione della carragenina.

5.11.1 Animali

Per questo esperimento sono stati impiegati ratti maschi di ceppo Albino (125-150 g), divisi in 4 gruppi di 5 ciascuno.

5.11.2 Procedura sperimentale

Al primo gruppo è stato somministrato oralmente il veicolo; al secondo il Diclofenac (5 mg/kg); al terzo e al quarto l'estratto di semi di *Casimiroa edulis* (rispettivamente 50 e 100 mg/kg).

Dopo un periodo di tempo di 60 minuti ciascun ratto ha ricevuto un'iniezione sottopiantare nella zampa destra di 0,1 ml di una soluzione di carragenina all'1% (Figura 38).

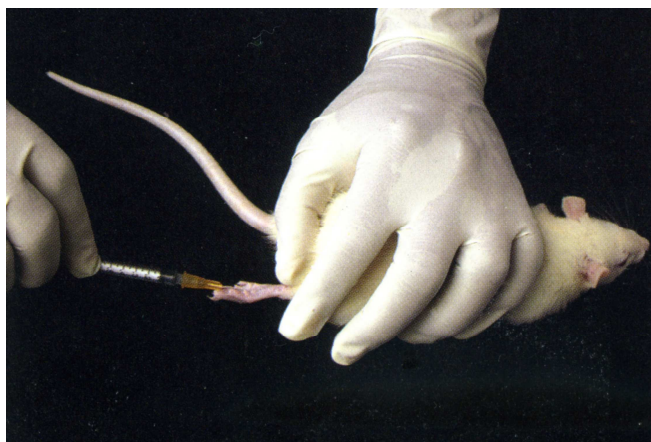


Figura 38. Somministrazioni sottopiantare di carragenina

I volumi della zampa sono stati misurati, usando il pletismometro (UGO BASILE), 0, 1, 2 e 3 ore dopo l'iniezione di carragenina (Figura 39).



Figura 39. Pletismometro

L'attività antinfiammatoria è stata misurata come la percentuale di riduzione dell'edema rispetto al controllo (Duffy et al., 2001).

Tale parametro è stato determinato, dopo 3 ore dalla somministrazione della carragenina, applicando la seguente formula:

$$\% \text{ di Inibizione dell'edema} = \boxed{1 - (V_t/V_c) \times 100}$$

Dove V_t è il volume dell'edema nei ratti trattati con la droga e V_c è il volume dell'edema nei ratti di controllo (trattati col veicolo).

6. RISULTATI TESTS FARMACOLOGICI

6.1 Effetti degli estratti di *Casimiroa edulis* sull'attività motoria e sul rearing.

La somministrazione dell'estratto di semi (100 mg/kg i.p.) e di foglie fresche (200 mg/kg p.o.) di *Casimiroa edulis* ha provocato una leggera, ma non significativa, riduzione dell'attività motoria. L'estratto di foglie secche (200 mg/kg p.o.) e quello di corteccia (200 mg/kg p.o.) hanno, invece, prodotto un profilo dell'attività motoria simile a quello osservato nei ratti trattati con il veicolo (salina).

Nella Figura 40 sono rappresentati i risultati di questo esperimento.

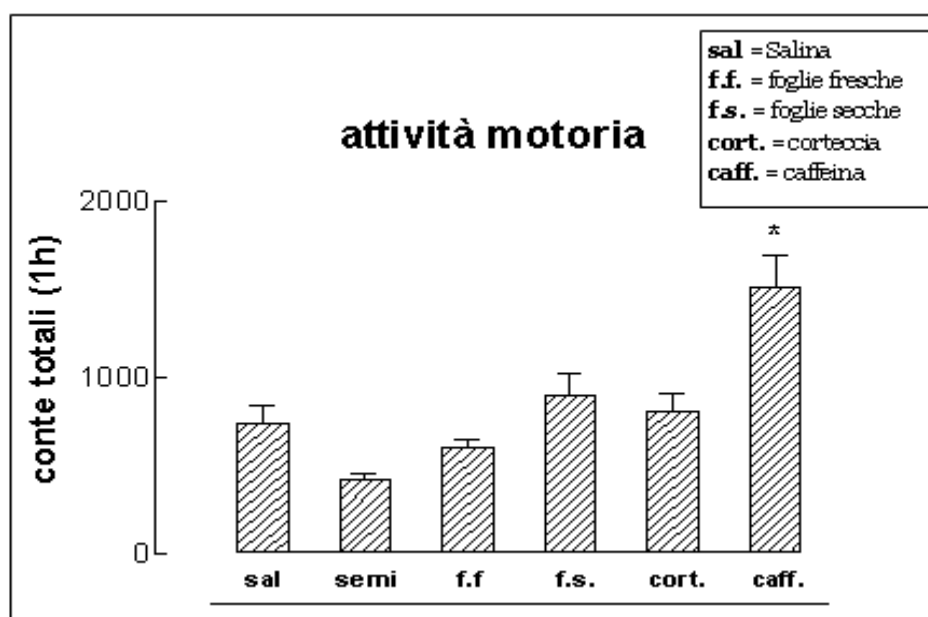


Figura 40. Effetto degli estratti di *Casimiroa edulis* e della caffeina sull'attività motoria nei ratti.

n=4. I valori sono dati dalla media \pm SEM.

* $p < 0.05$, confronto con il gruppo trattato con la salina (by one-way ANOVA seguito dal Dunnett's test).

La caffeina (3 mg/kg i.p.), stimolante del sistema nervoso centrale (Kaplan et al., 1992; Nehlig et al., 1992), ha indotto un significativo aumento dell'attività motoria.

Se gli estratti non hanno prodotto una rilevante riduzione dell'attività motoria spontanea, è stata invece evidenziata una significativa diminuzione del rearing nei ratti trattati con l'estratto di semi e di foglie fresche. Anche gli estratti di foglie secche e corteccia hanno provocato una riduzione, seppur non rilevante, del rearing.

La caffeina ha invece indotto un rimarcabile aumento del comportamento stereotipato.

I risultati di questo esperimento sono riportati in Figura 41.

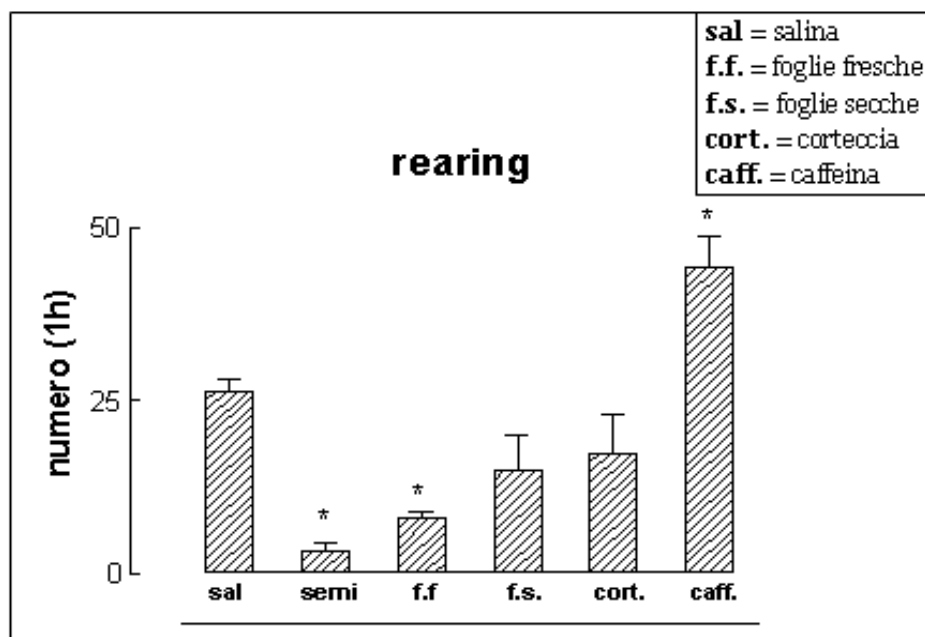


Figura 41. Effetto degli estratti di *Casimiroa edulis* e della caffeina sul rearing nei ratti.

n=4. I valori sono dati dalla media \pm SEM.

* $p < 0.05$, confronto con il gruppo trattato con la salina (by one-way ANOVA seguito dal Dunnett's test).

6.2 Effetti dell'estratto di foglie fresche di *Casimiroa edulis* sull'attività motoria, mediante l'apparato *open-field*.

In Tabella 1 vengono riportati i valori ottenuti in seguito alla somministrazione dell'estratto di foglie fresche di *C. edulis* (100 e 200 mg/kg) e di caffeina (3 mg/kg i.p.).

Come si può osservare, entrambi i dosaggi dell'estratto di *C. edulis* hanno causato una riduzione dell'attività locomotoria (espressa come numero di quadrati attraversati); tuttavia, solo alla dose di 200 mg/kg, tale riduzione è stata significativa (circa il 33%) in confronto ai risultati ottenuti nei topi trattati con il veicolo; allo stesso modo, si è osservata una diminuzione di circa il 30% del rearing totale rispetto ai topi trattati con il veicolo.

Sr no	Trattamento (mg/kg)	N. di quadrati attraversati	Rearing
1	Veicolo	136.6 ± 10.2	19.57 ± 5.94
2	Caffeina (3)	131.2 ± 6.17	22.6 ± 2.17
3	<i>C. edulis</i> (100)	121.4 ± 9.45	16.4 ± 1.97
4	<i>C. edulis</i> (200)	91.2 ± 8.71*	12.6 ± 2.35*

Tabella 1. Effetto dell'estratto di foglie fresche di *Casimiroa edulis* e della caffeina sull'attività locomotoria e sul rearing nei topi.

n=5. I valori sono dati dalla media ± SEM.

*p<0.05, confronto con il gruppo trattato con il veicolo (by one-way ANOVA seguito dal Dunnett's test).

6.3 Valutazione dell'azione antidepressiva degli estratti di *Casimiroa edulis* attraverso il Test del nuoto forzato.

Gli effetti degli estratti di *Casimiroa edulis* e della fluoxetina nel test del nuoto forzato sono mostrati in Figura 42.

L'estratto di foglie fresche (50 mg/kg o.s.) e, soprattutto quello di corteccia (100 mg/kg i.p.), hanno ridotto significativamente il tempo di immobilità rispetto ai valori di controllo. Non ci sono state significative differenze tra gli effetti di questi due estratti e la fluoxetina. La riduzione dell'immobilità era accompagnata, nel caso dell'estratto di foglie fresche, da un aumento significativo del tempo di climbing. Diverso è l'effetto osservato in seguito alla somministrazione dell'estratto di semi (100 mg/kg i.p.): tale preparato ha indotto un rimarcabile aumento del tempo di immobilità e una significativa riduzione del tempo speso in comportamenti attivi (nuoto e arrampicamento).

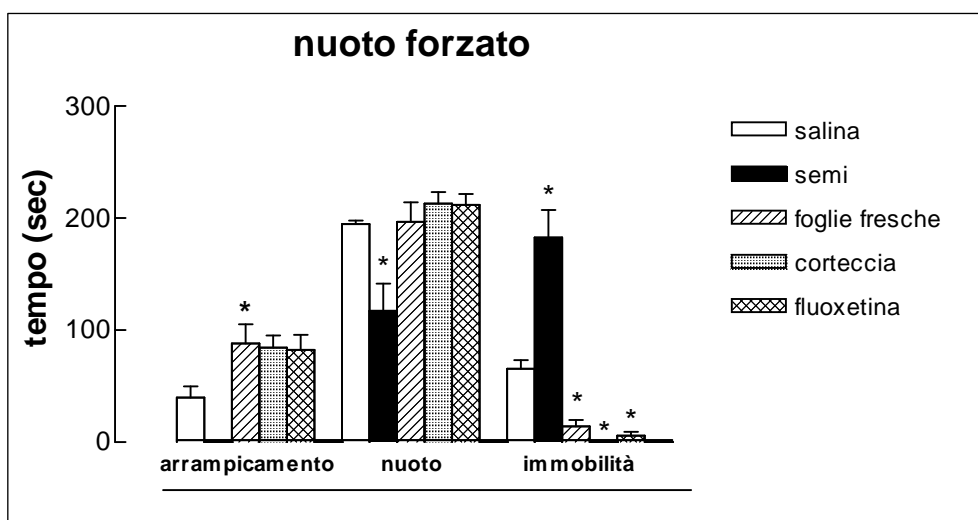


Figura 42. Effetto degli estratti di *Casimiroa edulis* e della fluoxetina sui comportamenti attivi nel test del nuoto forzato.

n=4. I valori sono dati dalla media \pm SEM della durata del climbing, nuoto e immobilità. * $p < 0.05$, confronto con il gruppo trattato con il veicolo (by one-way ANOVA seguito dal Dunnett's test).

6.4 Effetto sedativo-ipnotico degli estratti di *Casimiroa edulis*, determinato con il test del potenziamento dell'ipnosi indotta da Pentobarbital.

Il trattamento acuto dei ratti con gli estratti di semi (500 mg/kg i.p.), foglie fresche (1000 mg/kg p.o.) e corteccia (500 mg/kg i.p.) di *Casimiroa edulis*, un'ora prima dell'iniezione del Pentobarbital, non ha modificato in maniera rilevante la latenza a indurre il sonno, ma tutti e tre i preparati (in particolare l'estratto di foglie fresche) hanno aumentato significativamente la durata dell'ipnosi indotta dal farmaco, come rappresentato in Figura 43.

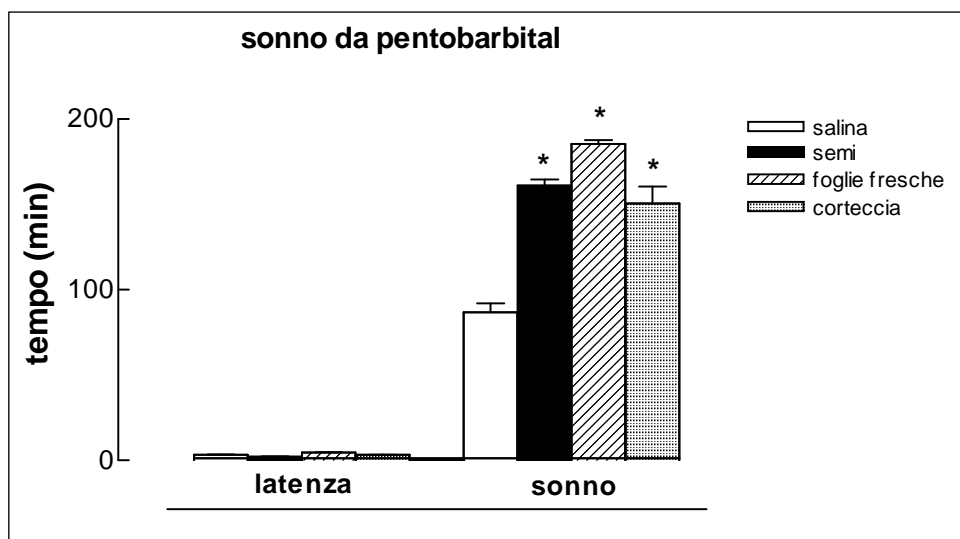


Figura 43. Effetto degli estratti di *Casimiroa edulis* sull'ipnosi indotta da Pentobarbital nei ratti.

n=4. I valori sono dati dalla media \pm SEM della latenza per la perdita del riflesso di raddrizzamento e della durata dell'ipnosi.

* $p < 0.05$, confronto con il gruppo trattato con il veicolo (by one-way ANOVA seguito dal Dunnett's test).

6.5 Valutazione dell'effetto ansiolitico dell'estratto di foglie fresche di *Casimiroa edulis*, determinata con il test del *labirinto a croce elevato (elevated plus maze)*.

La somministrazione della caffeina (3 mg/kg i.p.) ha ridotto significativamente il numero degli ingressi nei bracci aperti e la durata del tempo trascorso in essi. Al contrario, l'estratto di foglie fresche di *Casimiroa edulis* (100 e 200 mg/kg) ha incrementato in maniera significativa il tempo di permanenza degli animali nei bracci aperti del labirinto, evidenziando una possibile attività ansiolitica.

Sr no	Trattamento (mg/kg)	% Preferenza per i bracci chiusi	Bracci chiusi		Bracci aperti	
			Durata (Sec)	Ingressi	Durata (Sec)	Ingressi
1	Veicolo	60	154.1 ± 6.85	9.71 ± 0.86	51.14 ± 6.15	5.28 ± 0.91
2	Caffeina (3)	60	224.2 ± 15.38	8.0 ± 0.54	24.6 ± 4.49*	3.0 ± 0.44*
3	<i>C. edulis</i> (100)	20	157.0 ± 6.80	7.2 ± 0.37	84.6 ± 5.45*	5.0 ± 0.54
4	<i>C. edulis</i> (200)	60	150.2 ± 11.03	9.8 ± 1.15	88.4 ± 7.26*	6.4 ± 0.92

Tabella 2. Effetto dell'estratto di foglie fresche di *C. edulis* e della caffeina sull'ansietà nei topi

n=5. I valori sono dati dalla media ± SEM.

*p<0.05, confronto con il gruppo trattato con il veicolo (by one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

6.6 Effetto degli estratti di *Casimiroa edulis* sulla catalessi indotta dall'aloiperidolo.

Sr no	Trattamento (mg/kg)	Durata della catalessi in s (Media \pm SEM) dopo						
		15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	180 min
1	Veicolo	15.0 \pm 2.70	32.4 \pm 0.47	72.8 \pm 3.02	149.2 \pm 6.13	183.2 \pm 6.93	123.8 \pm 6.8	51.4 \pm 5.4
2	Caffeina (3)	1.4 \pm 0.87*	3.0 \pm 0.4*	15.6 \pm 3.13*	42.6 \pm 6.88	25.2 \pm 3.3*	6.2 \pm 0.8*	5.0 \pm 0.2*
3	<i>C. edulis</i> (50)	--	--	--	--	--	--	--
4	<i>C. edulis</i> (100)	--	--	15.6 \pm 0.50*	20.0 \pm 3.95*	24.4 \pm 3.43*	13.8 \pm 1.06*	6.75 \pm 1.01*
5	<i>C. edulis</i> (200)	35.4 \pm 4.54	77.4 \pm 8.77*	200.2 \pm 7.30*	240.2 \pm 7.30*	146.0 \pm 9.38	117.2 \pm 9.31	69.0 \pm 3.68
6	[<i>C. edulis</i> (100) + Caffeine (3)]	--	--	--	--	--	--	--
7	[<i>C. edulis</i> (200) + Caffeine (3)]	--	--	--	--	--	--	--

Tabella 3. Effetto dell'estratto di foglie fresche di *Casimiroa edulis* e della caffeina sulla catalessi indotta dall'aloiperidolo

n=5. I valori sono dati dalla media \pm SEM.

*p<0.05, confronto con il gruppo trattato con il veicolo (by one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

I topi trattati con il veicolo hanno esibito dei cambiamenti nel tempo sulla durata della catalessi, e la massima durata di tale fenomeno (183.2 ± 6.9 s) è stata osservata 90 minuti dopo la somministrazione di aloperidolo. Dalla Tabella 3 si evince che la caffeina ha ridotto significativamente la durata della catalessi, in tutti gli intervalli di tempo considerati; anche la somministrazione dell'estratto di foglie

fresche di *C. edulis* (50 e 100 mg/kg) ha ridotto in maniera rimarcabile la durata della catalessi; la dose più bassa, in particolare, è stata capace di inibire completamente la catalessi; al contrario, alle dosi più alte (200 mg/kg) l'estratto ha prodotto catalessi, la cui durata è stata quasi sempre maggiore rispetto a quella osservata nei topi trattati con il veicolo.

La co-somministrazione dell'estratto di foglie di *C. edulis* (100 e 200 mg/kg) e caffeina, ha inibito completamente la catalessi.

6.7 Effetto degli estratti di *Casimiroa edulis* sulla catalessi indotta dall'aloiperidolo, nei topi trattati per 6 giorni con la caffeina e con gli estratti.

La Tabella 4 mostra gli effetti della somministrazione ripetuta per 6 giorni consecutivi dell'estratto di foglie fresche di *Casimiroa edulis* (50, 100 e 200 mg/kg) e della caffeina, sulla catalessi indotta dall'aloiperidolo.

Sr no	Trattamento (mg/kg)	Durata della catalessi in s (Media \pm SEM) dopo						
		15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	180 min
1	Veicolo	15.0 \pm 2.70	32.4 \pm 0.47	72.8 \pm 3.02	149.2 \pm 6.13	183.2 \pm 6.93	123.8 \pm 6.8	51.4 \pm 5.4
2	Caffeina (3) day1-6	--	1.8 \pm 0.8*	3.2 \pm 1.51*	6.0 \pm 3.14*	22.6 \pm 7.84*	16.8 \pm 3.25*	14.6 \pm 3.45*
3	<i>C. edulis</i> (50) day 1-6	--	6.8 \pm 0.7	17.8 \pm 2.8*	31.8 \pm 3.5*	45.4 \pm 6.8*	81.8 \pm 9.6*	42.1 \pm 5.8*
4	<i>C. edulis</i> (100) day 1-6	31.6 \pm 2.42*	50.6 \pm 3.6*	107.8 \pm 5.5*	63.4 \pm 2.9*	49.4 \pm 4.0*	33.8 \pm 3.4*	6.4 \pm 1.3*
5	<i>C. edulis</i> (200) day 1-6	--	9.66 \pm 1.2*	22.8 \pm 2.5*	27.2 \pm 4.0*	13.8 \pm 1.7*	9.0 \pm 1.4*	--
6	[<i>C. edulis</i> (100) + Caffeine(3)] day 1-6	--	--	--	--	7.2 \pm 0.6*	--	--
7	[<i>C. edulis</i> (200) + Caffeine(3)] day 1-6	--	--	--	--	5.25 \pm 0.6*	--	--

Tabella 4. Effetto dell'estratto di foglie fresche di *C. edulis* e della caffeina sulla catalessi indotta dall'aloiperidolo nei topi trattati per 6 giorni

n=5. I valori sono dati dalla media \pm SEM.

*p<0.05, confronto con il gruppo trattato con il veicolo (by one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

L'attività anticatalettica della caffeina si è mantenuta anche dopo la sospensione del trattamento, mentre in seguito all'interruzione del trattamento prolungato con l'estratto di *Casimiroa edulis* (50 e 100 mg/kg), l'aloferidolo ha indotto catalessi, la quale è stata più severa di quella osservata nei topi trattati solo una volta con l'estratto (vedi Tabella 3); al contrario, la dose massima di estratto (200 mg/kg) si è dimostrata più efficace nell'inibire la catalessi dopo una somministrazione prolungata piuttosto che in seguito a somministrazione unica.

Quando la caffeina e la *C. edulis* sono stati dati insieme per 6 giorni, l'aloferidolo ha indotto un unico episodio di catalessi, di breve durata, dopo 90 minuti dall'iniezione di aloferidolo.

6.8 Effetto antiepilettico degli estratti di *Casimiroa edulis*, mediante il metodo delle convulsioni indotte dal PTZ (Pentilenetetrazolo): un modello animale di “Crisi di assenza” (Piccolo Male).

Nei topi trattati con il veicolo i periodi di latenza degli spasmi mioclonici e delle convulsioni cloniche sono stati di 123.7 ± 7.01 e 138.1 ± 7.86 , rispettivamente. Come si può osservare in Tabella 5, la somministrazione dell'estratto di foglie fresche di *Casimiroa edulis* (100 e 200 mg/kg) ha indotto un significativo aumento della latenza di entrambi gli episodi convulsivi indotti da PTZ; tale aumento è dose-dipendente.

Un altro interessante dato emerso dall'esperimento riguarda l'assenza di mortalità negli animali trattati con l'estratto, così come in quelli trattati con il farmaco di riferimento (Diazepam).

Sr no	Trattamento (mg/kg)	Spasmi mioclonici	Convulsioni cloniche	% Mortalità
1	Veicolo	123.7 ± 7.01	138.1 ± 7.86	40
2	Diazepam (1)	--	--	00
3	<i>C. edulis</i> (100)	368.0 ± 25.68*	484.6 ± 20.64*	00
4	<i>C. edulis</i> (200)	532.8 ± 15.34*	710.2 ± 35.89*	00

Tabella 5. Effetto dell'estratto di foglie fresche di *Casimiroa edulis* sulle convulsioni indotte dal PTZ

n=5. I valori sono dati dalla media \pm SEM.

*p<0.05 , confronto con il gruppo trattato con il veicolo (Dunnett's test).

6.9 Effetto anticonvulsivante dell'estratto di *Casimiroa edulis*, mediante il modello degli stati epilettici indotti dal Litio-Pilocarpina.

Nei ratti trattati con il veicolo le convulsioni si sono manifestate con una severità crescente nel tempo. La somministrazione del Diazepam ha eliminato le convulsioni nei primi 2 periodi di tempo e ne ha significativamente ridotto la severità nei momenti successivi. L'estratto di semi di *Casimiroa edulis* (100 e 200 mg/kg) si è dimostrato ancora più efficace del farmaco di riferimento, in quanto ha determinato, al dosaggio più alto (200 mg/kg), una completa assenza di episodi convulsivi.

Trattamento (mg/kg)	Punteggio dopo			
	15 min	30 min	60 min	75 min
Veicolo	1.8 ± 0.2	2.7 ± 0.4	3.2 ± 0.5	4.3 ± 0.6
Diazepam (1)	--	--	1.4 ± 0.3*	1.9 ± 0.4*
<i>C. edulis</i> (100)	--	--	--	1.1 ± 0.2*
<i>C. edulis</i> (200)	--	--	--	--

Tabella 6. Effetto dell'estratto di semi di *C. edulis* sulle crisi indotte dal litio-pilocarpina

n=5. I valori sono dati dalla media ± SEM.

*p<0.05 , confronto con il gruppo trattato con il veicolo (Mann-Whitney U test)

6.10 Effetto antinocicettivo: contrazioni addominali (writhing) indotte dall'acido acetico.

Nei topi trattati con il veicolo, il conteggio totale delle contrazioni addominali è stato di 85.4 ± 3.61 ; l'estratto di semi di *C. edulis* ha ridotto significativamente tale valore; tale diminuzione è stata dose dipendente: alla dose di 50 mg/kg la diminuzione è stata del 38,6%; dopo la somministrazione di 100 mg/kg di estratto il numero delle contrazioni addominali si è ridotto del 58,5%.

Il Diclofenac, impiegato come controllo positivo, ha ridotto tali contrazioni del 75%.

Sr no	Trattamento (mg/kg i.p.)	N. di contrazioni addominali in 30 min
1	Veicolo (0.5% CMC)	85.4 ± 3.61
2	<i>C. edulis</i> (50)	$52.2 \pm 2.55^*$
3	<i>C. edulis</i> (100)	$35.4 \pm 2.0^*$
4	Diclofenac (10)	$21.2 \pm 2.2^*$

Tabella 7. Effetto dell'estratto di semi di *Casimiroa edulis* sulle contrazioni indotte dall'acido acetico nei topi

n=5. I valori sono dati dalla media \pm SEM.

* $p < 0.05$, confronto con il gruppo trattato con il veicolo (Dunnett's test).

6.11 Effetto antinfiammatorio: edema della zampa del ratto indotto dalla carragenina.

In Tabella 8 sono riportati i risultati di questo test: nei ratti trattati con il veicolo, il volume dell'edema, dopo 3 ore, era di $2,43 \pm 0,04$ ml; il Diclofenac, farmaco di riferimento impiegato come controllo positivo, ha determinato una riduzione dell'infiammazione del 56,2%; l'estratto di semi di *Casimiroa edulis*, somministrato alla dose di 50 e 100 mg/kg, ha provocato una diminuzione del 33,7% e del 47,6% rispettivamente.

Trattamento (mg/kg)	Volume dell'edema in ml (Media \pm SEM) dopo				
	0 h	1 h	2 h	3 h	% inibizione dell'edema dopo 3 h
Veicolo	0.92 ± 0.05	1.61 ± 0.03	1.85 ± 0.01	2.43 ± 0.04	--
Diclofenac (5)	0.90 ± 0.03	1.08 ± 0.008	1.18 ± 0.02	$1.56 \pm 0.02^*$	56,2
<i>C. edulis</i> (50)	0.9 ± 0.04	1.2 ± 0.05	1.75 ± 0.05	$1.9 \pm 0.04^*$	33,7
<i>C. edulis</i> (100)	0.91 ± 0.04	1.35 ± 0.02	1.55 ± 0.02	$1.70 \pm 0.05^*$	47,6

Tabella 8. Effetto antinfiammatorio dell'estratto di semi di *Casimiroa edulis* sull'edema alla zampa indotto da carragenina

n=5. I valori sono dati dalla media \pm SEM.

* $p < 0.01$, confronto con il gruppo trattato con il veicolo (Dunnnett's test).

7. CONCLUSIONI

Il presente studio ha investigato gli effetti centrali degli estratti di *Casimiroa edulis* Llave et Lex., una pianta generalmente usata, come sedativo e come rimedio antiipertensivo, nell'etno-medicina Latino-Americana.

I diversi fitocomplessi, ottenuti a partire da foglie, semi e corteccia prelevati da piante coltivate in Sardegna (in località Santa Lucia, Capoterra), sono stati sottoposti a differenti tests con l'ausilio di modelli animali, e hanno prodotto significativi ed evidenti effetti farmacologici.

In particolare, gli estratti di semi e foglie fresche hanno promosso un effetto motorio depressivo nei ratti, producendo una riduzione della motilità totale e, soprattutto, del rearing.

Questo profilo comportamentale è indicativo di un rimarcabile effetto sedativo, confermato anche dal test del potenziamento dell'ipnosi indotta da Pentobarbital e dalla parziale protezione dalle convulsioni indotte da PTZ.

Il test del nuoto forzato ha dimostrato che l'estratto di foglie fresche ha agito come un antidepressivo, in quanto è stato capace di ridurre il tempo di immobilità e di aumentare il tempo di climbing, senza modificare sostanzialmente la durata del nuoto.

L'estratto di corteccia ha ridotto in maniera ancora più evidente il tempo di immobilità e ha determinato un aumento, seppur non significativo, del tempo speso in comportamenti attivi.

La riduzione dell'immobilità è, per entrambi gli estratti (foglie fresche e corteccia), simile a quella osservata dopo somministrazione i.p. di fluoxetina, farmaco antidepressivo di riferimento. Sebbene la relazione tra immobilità e depressione rimanga controversa (Gardier e Bourin, 2001), è stato dimostrato che le droghe con attività

antidepressiva riducono il tempo durante il quale l'animale rimane immobile (Borsini e Meli, 1988).

È stato dimostrato che il nuoto è sensibile ai composti serotoninergici, come la fluoxetina, un inibitore selettivo del re-uptake della serotonina (Page et al., 1999), e che il climbing è sensibile agli antidepressivi triciclici e alle droghe che hanno effetti selettivi sulla trasmissione delle catecolamine (Detke et al., 1995; Cryan e Lucki, 2000).

Nel complesso, il modello degli effetti osservati per gli estratti di foglie e corteccia di *C. edulis* nel test del nuoto forzato, è simile a quello descritto per la desipramina, prototipo antidepressivo noradrenergico (Detke et al., 1995), e, più di recente, per la reboxetina, un inibitore selettivo del re-uptake della noradrenalina (Cryan et al., 2002b; Massana, 1998; Montgomery, 1998; Mucci, 1997; Dubini et al., 1997; Hindmarch, 1997).

Quanto messo in evidenza suggerisce un probabile effetto simil-antidepressivo degli estratti di foglie e corteccia di *C. edulis*.

Diverso è il profilo emerso, sempre nel test del nuoto forzato, in seguito alla somministrazione dell'estratto di semi: è stato osservato un significativo aumento dell'immobilità, una rimarcabile riduzione del nuoto e un'assenza totale di climbing. Questo risultato, associato all'evidente ipomotilità osservata nel test sull'attività motoria e sul rearing, e all'aumento della durata dell'ipnosi indotta da Pentobarbital, è compatibile con un'azione depressiva dell'estratto a carico del sistema nervoso centrale (Perez et al., 1998), e suggerisce che l'estratto possa agire come un blando neurosedativo (Capasso et al., 1996).

Tale effetto è imputabile, probabilmente, alla presenza, nei semi, del glicoside *casimiroidina* che, a larghe dosi, agisce come sedativo (Magos et al., 1999).

La valutazione dell'effetto ansiolitico dell'estratto di foglie di *C. edulis* è stata effettuata mediante il test del labirinto a croce elevato: i ratti hanno mostrato un significativo aumento del tempo trascorso nei bracci aperti del labirinto, in accordo con quanto precedentemente osservato da Mora et al. (2005). Nel complesso, questi risultati potrebbero essere indicativi di una blanda attività simil-ansiolitica.

Molina-Hernández et al. (2004) hanno osservato, in accordo con quanto emerso nel nostro lavoro di ricerca, che l'estratto acquoso di foglie di *C. edulis*, somministrato a basse dosi (25 e 35 mg/kg), produce un effetto simil-ansiolitico, evidenziato da un aumento delle esplorazioni dei bracci aperti del labirinto; al contrario, a dosi più alte (45 e 55 mg/kg), riduce il numero di ingressi nei bracci aperti. Tale diminuzione sarebbe imputabile ad un effetto secondario prodotto dall'estratto di foglie: la riduzione dell'attività locomotoria.

Per quanto concerne gli effetti sulla catalessi indotta da aloperidolo, dallo studio è emerso che la somministrazione acuta dell'estratto di foglie di *C. edulis* (50 e 100 mg/kg) ha inibito la catalessi indotta da aloperidolo, così come la caffeina. Questo lascia ipotizzare che l'estratto abbia incrementato il livello di dopamina e antagonizzato l'effetto dell'aloperidolo nella funzione dopaminergica.

Alla dose più alta (200 mg/kg), invece, l'estratto ha esibito catalessi, suggerendo l'inibizione della funzione dopaminergica (Somani et al., 1999). Il pretrattamento con la caffeina ha inibito la catalessi, in accordo con quanto osservato da Moo-Puc et al. (2003).

Il simultaneo trattamento con caffeina e *Casimiroa edulis* (100 e 200 mg/kg) ha prodotto un effetto sinergico.

In un altro gruppo di esperimenti, dove l'estratto di *C. edulis* e/o la caffeina sono stati somministrati per 6 giorni, e in seguito sospesi, l'attività anticatalettica della caffeina si è mantenuta anche dopo la sospensione del trattamento, mentre nel caso della *C. edulis*,

l'aloiperidolo ha indotto catalessi più severe di quelle osservate nei topi trattati solo una volta con l'estratto.

Gli estratti di semi e foglie hanno mostrato una buona azione anticonvulsivante, sia nel modello animale di convulsioni indotte dalla somministrazione di Litio-Pilocarpina, sia in quello di convulsioni indotte da PTZ. Quest'ultimo modello è ampiamente utilizzato per valutare l'effetto anticonvulsivante di differenti composti (Jefferys John, 2003; Sarkisian, 2001). A livello sinaptico, il PTZ sembra interagisca con il complesso dei recettori GABA_A, agendo come un agente iperpolarizzante.

In entrambi i test gli estratti hanno mostrato una protezione parziale dalle convulsioni, dipendente dalla dose. Un aspetto interessante è dato dalla totale assenza di mortalità, in seguito alla somministrazione dell'estratto di foglie di *C. edulis*, nel test delle convulsioni indotte da PTZ. Yokoyama et al. (1995) hanno osservato un aumento nei livelli di ossido nitrico (NO) durante le crisi indotte da PTZ; l'NO è un mediatore endogeno di vari sistemi biologici (Moncada et al., 1991) al quale sono, tuttavia, legati tutta una serie di effetti negativi insiti nella forte azione ossidante di questa molecola.

Alcune molecole presenti nelle foglie e nei semi di *Casimiroa edulis*, in particolare la quercetina, svolgono una documentata azione inibitoria sulla produzione di NO (Shing-Chuan et al., 2002) suggerendo una possibile spiegazione all'effetto protettivo offerto dagli estratti di questa pianta sulle convulsioni indotte da PTZ.

Questi risultati propongono un possibile utilizzo degli estratti di *C. edulis* nel controllo delle epilessie umane.

L'estratto di semi ha mostrato una buona azione antinocicettiva e antinfiammatoria. Per valutare il primo aspetto è stato impiegato un modello sperimentale del dolore, il quale coinvolge prevalentemente

meccanismi periferici (Davies et al., 1946): tale modello implica l'induzione di contrazioni addominali mediante la somministrazione di acido acetico. In questo esperimento l'estratto è stato capace di ridurre significativamente, e in modo dose-dipendente, le contrazioni, mostrando una buona attività antinocicettiva.

Per quanto concerne la valutazione dell'effetto antinfiammatorio, è stato eseguito il test dell'edema alla zampa indotto da un'iniezione sottocutanea di carragenina. Questo test è ampiamente utilizzato per valutare il potenziale antiflogistico dei prodotti naturali (Della Loggia et al., 1986). L'estratto ha mostrato una buona attività antinfiammatoria, inibendo in maniera significativa l'edema alla zampa. Questo suggerisce la presenza, nei semi, di composti con potenziali proprietà antiflogistiche. Nei semi sono presenti, ad esempio, i due flavonoidi rutina e quercetina (Awaad e Soliman, 2004), i quali oltre a mostrare una spiccata attività antiossidante (Afanas'ev et al., 1989; Grinberg et al., 1994), hanno esibito, in vivo, una buona inibizione dei processi infiammatori (Selloum et al., 2003; Guardia et al., 2001, Di Carlo et al., 1999).

In conclusione possiamo affermare che i risultati conseguiti in questo lavoro di ricerca hanno consentito di mettere in luce le potenzialità farmacologiche di *Casimiroa edulis* Llave et Lex., una pianta psicoattiva ampiamente utilizzata nell'etno-medicina del Messico e dell'America centrale, ma ancora poco conosciuta dal lato farmacologico. Gli effetti a carico del Sistema Nervoso Centrale osservati in seguito alla somministrazione dei fitocomplessi ottenuti dalle foglie, dai semi e dalla corteccia di piante coltivate in Sardegna, da un lato legittimano il loro ampio impiego nella medicina popolare, dall'altro forniscono prove sulla possibilità di ottenere dei prodotti farmacologicamente attivi anche da piante coltivate in paesi diversi da quelli di origine.

Successivi studi saranno necessari per ampliare queste considerazioni, per stabilire una più esatta caratterizzazione dei costituenti attivi della pianta, così come il loro preciso meccanismo d'azione, e per definire se gli effetti farmacologici osservati siano imputabili al fitocomplesso, e quindi ad una sinergia tra i principi attivi e le sostanze coadiuvanti in esso presenti, o all'azione di singoli composti.

8. BIBLIOGRAFIA

Adeyemi O.O., Okpo S.O., Ogunti O.O., 2002 - *Analgesic and anti-inflammatory effect of the aqueous extract of leaves of Persea americana Mill (Lauraceae)*. Fitoterapia, 73: 375-380.

Aebi A., 1956 – *The isolation of casimiroidin from the seeds of Casimiroa edulis*. Helvetica Chimica Acta, 39: 1495.

Afanas'ev I.B., Dorozhko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A., Potapovitch A.I., 1989 - *Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation*. Biochem Pharmacol 38: 1763–1769.

Anderson N.S., Rees D.A., 1966 - *The repeating structure of polysaccharide sulphates from red seaweeds*: In Proc. Vth Inst., Seaweed Symposium. Ed. J. McLachlan, 243-249. London: Pergamon Press.

Argueta V.A., Cano-Asseleih L.M., Rodarte M.E., 1994 – *Atlas del las plantas de la medicina traditional mexicana*. 3 vols. Mexico City: INI.

Awaad A.S., El-Sayed N.H., Maitland D.J., Mabry T.J., 2006 - *Phenolic antioxidants from Casimiroa edulis leaves*. Pharmaceutical Biology (Philadelphia, PA, United States), 44 (4): 258-262.

Awaad A.S., Maitland D.J., Moneir S.M., 2007 – *New alkaloids from Casimiroa edulis fruits and their pharmacological activity*. Chemistry of Natural Compounds, 43 (5): 576-580.

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

Beasley C.M., Masica D.N., Potvin J.H., 1992 – *Fluoxetine: a review of receptor and functional effects and their clinical implications.* Psychopharmacology, 107: 1-10.

Beyerman H.C., Rooda R.W., 1960 - *Structure and synthesis of eduline. Alkaloids of Casimiroa edulis.* Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap., Proc., Ser. B, 63: 432-433.

Bhattacharya S.K., Satyan K.S., Chakrabarti A., 1997 – *Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats.* Journal of Psychopharmacology, 11 (3): 219-224.

Borsini F., Meli A., 1988 - *Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity?* Psychopharmacology (Berl.) 94: 147– 160.

Capasso A., De Feo V., DeSimone F., Sorrentino L., 1996 - *Pharmacological effect of the aqueous extract from Valeriana adscendens.* Phytotherapy Research 10: 309–312.

Carlini E.A., Contar J.D.P., Silva-Filho A.R., Silveira-Filho N.G., Frochtengarten M.L., Bueno O.F.A., 1986 – *Pharmacology of lemon-grass (Cymbopogon citratus Stapf). I. effects of teas prepared from the leaves on the laboratory animals.* Journal of Ethnopharmacology 17: 37-64.

Cruz y Corro A., 1939 - *Tratamiento de la hipertension arterial por medio del cocimiento de hojas de zapote blanco*. La Farmacia 9: 162–167.

Cryan J.F., Lucki I., 2000 - *Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-Hydroxytryptamine_{2c} receptors*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 295: 1120–1126.

Cryan J.F., Markou A., Lucki I., 2002a – *Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future need*. Trends in Pharmacological Sciences, 23: 238-245.

Cryan J.F., Page M.E., Lucki I., 2002b - *Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swimming test*. European Journal of Pharmacology 436: 197–205.

Davies O.L., Raventos J., Walpole A.L., 1946 - *A method for evaluation of analgesic activity using rats*. Br J Pharmacol, 1: 255-64.

De Lille J., 1937 - *Nota acerca de la accion del zapote blanco sobre la tension arterial*. Analisis Instrumental en Biología, 5: 45–47.

Della Loggia A., Tubaro A.P., Zili C., Del-Nagra P., 1986 - *The role of flavonoids in the anti-inflammatory activity of chamomilla reculita*. Clinical Biology Research 219: 481–488.

Detke M.J., Rickels M., Lucki I., 1995 - *Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic*

and noradrenergic antidepressants. Psychopharmacology 121: 66–72.

Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A., Capasso F., 1999 - *Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci.* 65: 337–353.

Di Rosa M., 1972 - *Biological properties of carrageenan. J Pharm Pharmacol.*, 24 (2): 89-102.

Dreyer D.L., 1968 - *Citrus bitter principles. IX. Extractives of Casimiroa edulis. Structure of zapoterin. Journal of Organic Chemistry*, 33 (9): 3577-3582.

Dubini A., Bosc M., Polin V., 1997 - *Noradrenaline-selective versus serotonin-selective antidepressant therapy: differential effects on social functioning. J Psychopharmacol* 11: S17-23.

Duffy J.C., Dearden J.C., Rostron C., 2001 - *Design, Synthesis and biological testing of a novel series of anti-inflammatory drugs. J. Pharm. Pharmacol.*, 53: 1505-1514.

Enriquez R.G., Romero M.L., Escobar L.I., Joseph-Nathan P., Reynolds, W.F., 1984 - *High-performance liquid chromatographic study of Casimiroa edulis. II. Determination of furocoumarins. Journal of Chromatography*, 287 (1): 209-214.

Esch P., Kochmann M., 1912 - *Pharmacology of Casimiroa edulis. Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 21: 353-367.

Estrada L.E., 1989. *Plantas medicinales de Mexico. Introduccion a su estudio*. Universidad Autonoma de Chapingo, Departamento de Fitotecnica, Cap 35–38.

Ferre S., Guix T., Prat G., Jane F., Casas M., 1990 – *Is experimental catalepsy properly measured ?* Pharmacol Biochem behav, 35: 753-757.

Garcia-Argaez A.N., Gonzalez-Lugo N.M., Marquez C., Martinez-Vazquez M., 2003 - *Coumarins present in species of the genus Casimiroa*. Revista de la Sociedad Quimica de Mexico, 47 (2): 151-154.

Garcia-Argaez A.N., Toscano R.A., Martinez-Vazquez M., 2001 - *11 β -Hydroxyobacunone (zapoterin)*. Journal of Chemical Crystallography, 30 (11): 727-730.

Gardier A.M., Bourin M., 2001 - *Appropriate use of “knockout” mice as models of depression or models of testing the efficacy of antidepressants*. Psychopharmacology (Berl.) 153: 393–394.

Garratt P.J., Scheinmann F., Sondheimer F., 1967 - *Constituents of Casimiroa edulis. VIII. The structures of zapotin and zapotinin*. Tetrahedron, 23 (5): 2413-2416.

Garzon-de la Mora P., Garcia-Lopez P.M., Garcia-Estrada J., Navarro-Ruiz A., Villanueva-Michel T., Villarreal-de Puga L.M., Casillan-Ochoa J., 1999 - *Casimiroa edulis seed extracts show anticonvulsive properties in rats*. Journal of Ethnopharmacology 68, 275–282.

Goetzl E.J., 1980 - *Mediators of immediate hypersensitivity derived from arachidonic acid*. N Engl J Med., 303 (14): 822-825.

González-Trujano M.E., Navarrete A., Reyes B., Hong E., 1998 - *Some pharmacological effects of the ethanol extract of leaves of Annona diversifolia on the central nervous system in mice*. Phytotherapy Research, 12: 600–602.

Grinberg L.N., Rachmilewitz E.A., Newmark H., 1994 - *Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation*. Biochem Pharmacol 48: 643–649.

Guardia T., Rotelli A.E., Juarez A.O., Pelrez L.E., 2001 - *Antinflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rats*. Il Farmaco, 56: 683-687.

Handley S.L., McBlane J.W., 1993 - *An assessment of the elevated X maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs*. Journal of Pharmacology and Toxicology Methods 29: 129–135.

Hernandez M.M., 1993 - *Contribucion al conocimiento del estudio etnobotanico, quimico y farmacologico de las plantas tranquilizantes en los mercados de Morelia, Michoacan, Mexico*. Tesis Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Morelia Michoacan, p. 77.

Hindmarch I., 1997 - *The effects of antidepressants on psychomotor function with particular reference to reboxetine*. Eur Neuropsychopharmacol 7(1): S17-21..

Hirschelman W.H., Park E.J., Murillo G., Hawthorne M., Kosmeder J.W., Mehta R., Pezzuto J.M., Moriarty R.M., 2002 - *Synthesis, SAR and biological evaluation of zapotin as a chemoprevention agent*. Abstracts of Papers, 223rd ACS National Meeting, Orlando, FL, United States, April 7-11, 2002.

Hogg S., 1996 - *A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety*. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 54: 21–30.

Iriarte J., Kincl F.A., Rosenkranz G., Sondheimer F., 1956 - *The constituents of Casimiroa edulis Llave et Lex. Part II. The bark*. J. Chem. Soc.: 4170 – 4173.

Ito A., Shamon L.A., Yu B., Mata-Greenwood E., Lee S.K., van Breemen R.B., Mehta R.G., Farnsworth N.R., Fong H.H.S., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D., 1998 – *Antimutagenic constituents of Casimiroa edulis with potential cancer chemopreventive activity*. J Agric Food Chem., 46: 3509-3516.

Jefferys John G.R., 2003 – *Models and mechanism of experimental epilepsies*. Epilepsia, 44: 44-50.

Kaplan G.B., Greenblatt D.J., Kent M.A., Cotreau M.M., Arcelin G., Shader R.I., 1992 - *Caffeine-induced behavioral*

stimulation is dose-dependent and associated with A1 adenosine receptor occupancy. Neuropsychopharmacology, 6 (3): 145-153.

Kincl F. A., Romo J., Rosenkranz G., Sondheimer F., Syntex S.A., Mexico D.F., 1956 - *The constituents of Casimiroa edulis. I. The seed.* Journal of the Chemical Society: 4163-4169.

Koffer K.B, Berney S., Hornykiewicz O., 1978 - *The role of the corpus striatum in neuroleptic- and narcotic-induced catalepsy.* Eur J Pharmac 47: 81-86.

Lister R.G., 1987 - *The use of elevated plus-maze to measure anxiety in mouse.* Psychopharmacology, 92: 180-185.

Lozoya X., Enriquez R., 1981 – *El zapote Blanco: Investigación sobre una planta medicinal Mexicana.* Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico.

Lozoya X., Romero G., Olmedo M., Bondani A., 1977 – *Pharmacodynamics of alcoholic and aqueous extracts from the Casimiroa edulis seed.* Archivos de Investigacion Medica (Mexico), 8: 145-154.

Lozoya-Legorreta X., Rodriguez-Reynaga D., Ortega-Galvan J., Enriquez-Habib R., 1978 – *Isolation of hypotensive substance from seeds of Casimiroa edulis.* Arch Invest Med (Mex), 9 (4): 565-573.

Lucki I., 1997 – *The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs*. Behavior Pharmacology, 8: 523-532.

Magos J.A., Vidrio H., 1991 - *Pharmacology of Casimiroa edulis; part I. Blood pressure and heart rate effects in the anesthetized rat*. Planta Med. 57 (1): 20–24.

Magos, G.A., Vidrio H., Enriquez R., 1995 - *Pharmacology of Casimiroa edulis; III. Relaxant and contractile effects in rat aortic rings*. Journal of Ethnopharmacology 47: 1–8.

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

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

Major R.F., Dursch F., 1958 - *Na,Na-Dimethylhistamine, a hypotensive principle in Casimiroa edulis*. Journal of Organic Chemistry, 23:1564-1567.

Malec D., 1997 - *Haloperidol-induced catalepsy is influenced by adenosine receptor antagonists*. Polish Journal of Pharmacology, 49: 323-327.

Martinez M., 1951 – *Las Casimiroas de México y Centroamérica*. Anales Inst. Biol. Méx., 22 (1): 25-81.

Martinez M., 1944 – *Las Plantas Medicinales de México*, 3rd edition. Ediciones Botas, MexicoCity.

Massana J., 1998 - *Reboxetine versus fluoxetine: an overview of efficacy and tolerability*. J Clin Psychiatry 59 (14): 8-10.

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

Meisels A., Sondheimer F., 1957 - *The constituents of Casimiroa edulis. III. The structure of casimiroin*. Journal of the American Chemical Society, 79: 6328-6333.

Molina-Hernández M., Tellez-Alcántara N.P., Pérez García J., Olivera Lopez J.I., Teresa Jaramillo M., 2004 - *Anxiolytic-like actions of leaves of Casimiroa edulis (Rutaceae) in male Wistar rats*. Journal of Ethnopharmacology 93: 93–98.

Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A., 1991 - *Biosynthesis and endogenous roles of nitric oxide*. Pharmacol Rev., 43: 109-142.

Montgomery S.A., 1998 - *Chairman's overview. The place of reboxetine in antidepressant therapy*. J Clin Psychiatry 59 (14): 26-29.

Moo-Puc R.E., Góngora-Alfaro J.L., Alvarez-Cervera F.J., Pineda J.C., Arankowsky-Sandoval G., Heredia-López F., 2003 - *Caffeine and muscarinic antagonists act in synergy to inhibit haloperidol-induced catalepsy.* Neuropharmacology, 45 (4): 493-503.

Mora S., Diaz-Veliz G., Lungenstrass H., García-Gonzalez M., Coto-Morales T., Poletti C., De Lima T.C.M., Herrera-Ruiz M., Tortoriello J., 2005 - *Central nervous system activity of the hydroalcoholic extract of Casimiroa edulis in rats and mice.* Journal of Ethnopharmacology 97 (2): 191–197.

Mucci M., 1997 - *Reboxetine: a review of antidepressant tolerability.* J Psychopharmacol 11: S33-37.

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

Murphy J.W., Toubé T., Cross A.D., 1968 - *Spectra and stereochemistry. XXIX. Constituents of Casimiroa edulis. 9. Structure of zapoterin.* Tetrahedron Letters, 49: 5153-5156.

Navarro F.J., 1992 – *Historia natural o Jardín Americano (manuscrito de 1801).* Mexico City: UNAM.

Navarro-Ruiz A., Bastidas-Ramírez B.E., García-Estrada J., García-Lopez P., Garzon P., 1995 - *Anticonvulsant activity of*

Casimiroa edulis in comparison to phenytoin and phenobarbital. Journal of Ethnopharmacology 45: 199–206.

Nehlig A., Daval J.L., Debry G., 1992 - *Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects.* Brain Res Brain Res Rev. 17 (2): 139-170.

Ossowska K., Karcz M., Wardas J., Wolfarth S., 1990 - *Striatal and nucleus accumbens D1 /D2 dopamine receptors in neuroleptic catalepsy.* Eur. J. Pharmac. 182: 327-334.

Page M.E., Detke M.J., Dalvi A., Kirby J.G., Lucki I., 1999 – *Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test.* Psychopharmacology 147: 162–167.

Panzcia R.P., Townsend L.B., 1973 - *Total synthesis of the alkaloid casimiroedine, an imidazole nucleoside.* Journal of the American Chemical Society , 95(26): 8737-8740.

Patel S., Meldrum B.S., Fine A., 1988 – *Susceptibility to pilocarpine-induced seizures in rats increases with age.* Behav Brain Res, 31: 165-167.

Perez R.M., Perez J.Á., Garcia L.M., Sossa H., 1998 - *Neuropharmacological activity of Solanum nigrum fruit.* Journal of Ethnopharmacology 62: 43–48.

Persinger M.A., Makarec K., Bradley J.C., 1988 – *Characteristics of limbic seizures evoked by peripheral injections of lithium and pilocarpine.* *Physiol Behav*, 44: 27-37.

Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M., 1978 – *Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments.* *European Journal of Pharmacology*, 47, 4: 379-391.

Porsolt R.D., Le Pichon M., Jalfre M., 1977 – *Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments.* *Nature*, 266: 730-732.

Power F.B., Callan T., 1911 - *Constituents of the Seeds of Casimiroa edulis.* *Journal of the Chemical Society*, 99: 1993-2010.

Rizvi, S.H., Kapil, R.S., Shoeb, A., 1985 - *Alkaloids and coumarins of Casimiroa edulis.* *Journal of Natural Products* 48 (1): 146.

Robin, A., Coyon, A., 1909 - *De l'emploi du Casimiroa edulis ou Zapote blanco comme hypnotique.* *Bull. Gen. Ther.* 158: 16.

Rodgers R.J., Dalvi A., 1997 - *Anxiety, defense and the elevated plus-maze.* *Neurosciences and Biobehavioral Reviews* 21: 801–810.

Romero M.L., Escobar L.I., Lozoya X., Enriquez R.G., 1983 – *High-performance liquid chromatographic study of Casimiroa edulis: I. Determination of imidazole derivatives and rutin in*

aqueous and organic extracts. Journal of Chromatography, 281: 245-251.

Sahagùn B., 1571 - *Historia General de las cosas de Nueva Espana*. Porrúa (Ed.), Mexico, 1975. Lib. XI, Cap. VI, Archives del Museo Nacional de Antropologica e Historia Mexico, pp. 86.

Sanberg, P.R., 1980 - *Haloperidol-induced catalepsy is mediated by postsynaptic dopamine receptors*. *Nature*, 284: 472-473.

Sarkisian M.R., 2001 – *Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders*. *Epilepsy Behav.*, 2: 201-216.

Selloum L., Bouriche H., Tigrine C., Boudoukha C., 2003 – *Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation*. *Exp Toxic Pathol*, 54: 313–318.

Shing-Chuan S., Woan-Ruoh L., Hui-Yi L., Ho-Chun H., Ching-Huai K., Ling-Ling Y., Yen-Chou C., 2002 - *In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production*. *European Journal of Pharmacology* 446: 187– 194.

Somani R.S., Kasture V.S., Kasture S.B., 1999 – *Haloperidol inhibits (-) bicucullin induced seizures and bicucullin potentiates haloperidol induced catalepsy in mice*. *Indian J Pharmacol.*, 31: 434-436.

Sondheimer F., Meisels A., 1958 - *Constituents of Casimiroa edulis. IV. Identification of edulein with 7-methoxy-1-methyl-2-phenyl-4-quinolone.* Journal of Organic Chemistry, 23: 762-763.

Soulimani R., Younos C., Jarmouni-Idrissi S., Boustia D., Khalouki F., Laila A., 2001 – *Behavioural and Pharmacotoxicological study of Papaver rhoeas L. in mice.* Journal of Ethnopharmacology, 74 (3): 265-274.

Tabrez A.S., Nabeeh R.I., 2008 - *Probable neuro sexual mode of action of Casimiroa edulis seed extract versus sildenafil citrate (viagratm) on mating behavior in normal male rats.* Pakistan journal of pharmaceutical sciences , 21 (1): 1-6.

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

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

Vinegar R., Schreiber W., Hugo R., 1969 - *Biphasic development of carrageenan in rats.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 166: 96-103.

Ximénez F., 1615 - *Cuatro libros de la Naturaleza y virtudes de las plantas.* Nicolas Leon (Ed.), Morelia, Mexico, 18: 60.

Yokoyama H., Mori N., Osonoe K., Kasai N., Hiramatsu M., Yoshimura T., Matsue T., Uchida I., Kobayashi N., Tsuchihashi N., Niwa S.I., 1995 - *Increase of central nitric oxide during pentylenetetrazol-induced seizures in rats.* Psychiatry and Clinical Neurosciences, 49 (3): S227-S279.

Weinstein B., Hylton T.A., 1964 - *Heterocyclic compounds. V. Synthesis of casimiroin.* Tetrahedron, 20(7): 1725-1728.

Winter C.A., Risley E.X., Nuss G.W., 1962 - *Carrageenan-induced oedema in hind paw of rat in assay for anti-inflammatory drugs.* Proc. Soc Exp Biol Med, 111: 544-547.

RINGRAZIAMENTI

È doveroso ringraziare, per la loro cortese e qualificata collaborazione, i professori prodighi di consigli, annotazioni e lettura critica:

Prof.ssa Liliana Spina, Dipartimento di Tossicologia dell'Università di Cagliari.

Dott.ssa Rosanna Longoni, Dipartimento di Tossicologia dell'Università di Cagliari.

Prof. Sanjay Kasture, MGV's Pharmacy College di Nashik, India.