

Seguimiento bioguiado de la actividad anticonvulsivante del extracto etanólico de los frutos de *Apium graveolens*

Javier Rincón*, Mario Francisco Guerrero*¹, Jennie Andrea Cardozo y Roberto Pinzón*.

Resumen

El seguimiento bioguiado del extracto etanólico obtenido de los frutos de *Apium graveolens* L. condujo al aislamiento de un compuesto orgánico aromático altamente efectivo para el control de la convulsión inducida por electroshock en ratones (88 % de protección). Estos resultados sugieren que el compuesto podría constituirse en fuente potencial para la obtención de nuevas alternativas farmacológicas en el tratamiento de las crisis tónico clónico generalizadas.

Palabras clave: *Apium graveolens* – Convulsión inducida por electroshock – Fraccionamiento bioguiado

Summary

Bioguided evaluation of anticonvulsant activity of the ethanolic extract of *Apium graveolens* fruits

The bioguided evaluation of the ethanolic extract obtained from the fruits of *Apium graveolens* L. led to the isolation of a organic compound highly effective to prevent maximal electroshock seizure in mice (88% protection). This result suggests that the compound could be a potential source of anticonvulsant drug for the treatment of the tonic clonic seizures.

Key words: *Apium graveolens* – Maximal electroshock seizures – Bioguided fractioning.

Introducción

Con el término de epilepsia se designa una serie de trastornos de tipo paroxístico y recurrente en la actividad eléctrica cerebral, de causa inmediata no identificable (1). Según la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente 18 de cada 1000 habitantes sufren de este trastorno. Colombia figura entre los países de mayor prevalencia (2).

La farmacoterapia antiepiléptica convencional sigue siendo insuficiente para controlar efectivamente un importante grupo de pacientes, además de inducir con frecuencia notorios efectos adversos (3). Los anticonvulsivantes introducidos

en las últimas dos décadas han ampliado las opciones terapéuticas y mejorado la respuesta clínica de un buen número de pacientes; no obstante, persisten todavía problemas relacionados con la falta de eficacia y de seguridad. Hay por lo tanto consenso general acerca de la necesidad de nuevos y efectivos fármacos anticonvulsivantes (4).

Los productos naturales han contribuido notoriamente al arsenal terapéutico. Alrededor de la mitad de los productos farmacéuticos disponibles son de origen natural (5). Actualmente son objeto de un renovado interés dado que apenas una mínima fracción de la biodiversidad ha sido

Recibido para evaluación: Octubre 30 de 2003
Aceptado para publicación: Noviembre 30 de 2003

* Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. AA: 14490.

*¹ Email: mfguerrerop@unal.edu.co

explorada farmacológicamente y a que se cuenta con eficientes técnicas de reconocimiento de la actividad biológica y de la identidad química de los compuestos presentes (5-7). Si bien se requieren ingentes esfuerzos para obtener fármacos a partir de fuentes naturales, es enteramente coherente buscar nuevas sustancias con actividad anticonvulsivante a partir de moléculas de origen natural (8).

Apium graveolens (Umbelliferae) figura entre las plantas con uso etnobotánico como anticonvulsivante. La infusión obtenida de sus frutos se ha utilizado para estos fines en regiones tan distantes como China y Colombia (9,10). A otras plantas de la familia Umbelliferae, tales como *Pimpinella anisum*, *Ferula gummosa* y *Radix bupleuri*, también se les ha documentado efectos anticonvulsivantes (11-13). En un trabajo anterior se identificó la actividad anticonvulsivante del extracto etanólico de frutos de *Apium graveolens* en el modelo de convulsión máxima inducido eléctricamente en ratones (14). En este estudio se presenta la estrategia de seguimiento fitoquímico bioguiado con el fin de avanzar en la identificación del constituyente o constituyentes responsables de la actividad farmacológica.

Parte Experimental

Obtención y caracterización del extracto

El extracto de los frutos de *Apium graveolens* (variedad Tall Utah) se preparó por percolación a partir de 458 g de material vegetal seco y posteriormente se concentró a presión reducida en rotavapor. El material obtenido se estudió fitoquímicamente por cromatografía en capa delgada para la determinación de metabolitos biológicamente activos (cumarinas, alcaloides, saponinas, flavonoides, terpenos y antraquinonas), utilizando cromatofolios de sílicagel HF₂₅₄, solventes de polaridad apropiada y reveladores universales y específicos (U.V., hidroxamato férrico,

Dragendorff modificado, Vainillina-ácido ortofosfórico, Godin, NP-PEG, KOH/EtOH).

Extracción y fraccionamiento

El fraccionamiento del extracto etanólico de *Apium graveolens* se realizó con solventes de diferente polaridad (Tab. 1). El extracto etanólico seco (EE, 19.3 g) se extrajo en cloroformo y el residuo resultante fue tratado con agua destilada, seguido de extracciones sucesivas con volúmenes iguales de cloroformo. El extracto clorofórmico obtenido (EC1) se secó con sulfato de sodio anhidro y posteriormente se concentró en rotavapor. La fase acuosa se filtró, concentró y liofilizó (EA, 7.1 g). Un sólido insoluble resultante de la partición (S1, 2.4 g) se separó y guardó en un desecador.

El extracto clorofórmico (EC1, 9 g) se fraccionó por tratamiento con hexano y una mezcla de metanol-agua 1:9. El extracto de hexano se secó con sulfato de sodio anhidro y luego se concentró (EH, 2.05 g). El extracto metanólico acuoso se concentró, liofilizó (EM1, 5.50 g) y posteriormente se sometió a partición con cloroformo y una mezcla de metanol-agua 1:1. Tanto el extracto clorofórmico (EC2, 4.49 g) como el metanólico acuoso (EM2, 0.95 g) se concentraron en rotavapor y este último se liofilizó. Con las fracciones obtenidas se realizó un estudio fitoquímico para determinar los principales grupos de metabolitos presentes.

Fraccionamiento del extracto clorofórmico EC2 por cromatografía en columna

El extracto clorofórmico (EC2) se purificó por cromatografía en columna (Tab. 1). Este extracto fue redisoluto en cloroformo, absorbido en 6 g de sílica gel 0.063 mm - 0.2000 mm y el solvente evaporado. El montaje de la columna se realizó con una suspensión de sílica gel (55 g)

en hexano (200 mL), seguida del extracto adsorbido. Los solventes y/o mezcla de solventes utilizados para la elusión de la columna fueron hexano, cloroformo y metanol. Las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa delgada y de acuerdo a los resultados se unieron las que presentaron compuestos similares.

Fraccionamiento de la fracción clorofórmica F1 por Cromatografía Líquida de media presión (MPLC)

La fracción F1 obtenida de la cromatografía en columna (mayor índice de protección en el ensayo realizado) se caracterizó mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas. Así mismo ésta se sometió a MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography). 803 mg de la fracción fueron adsorbidos en 2.5 g de sílica gel 60F y utilizados para el montaje. Se usaron hexano, cloroformo, metanol y mezclas de éstos como eluentes. Las fracciones obtenidas se unieron de acuerdo a su análisis cromatográfico, para someterlas a las pruebas farmacológicas.

Convulsión máxima inducida por electroshock

Ratones albinos de cinco a ocho semanas de edad procedentes de la colonia ICR fueron suministrados por el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional. Se mantuvieron en condiciones controladas de ciclos de luz oscuridad de 12 horas, temperatura 22 °C, humedad 60%, agua y alimento a libre demanda.

Los animales se dosificaron por vía oral con el extracto etanólico total de frutos (EE, 500 mg/kg), difenilhidantoína (20 mg/kg), vehículo (glicerina 10%, polipropilenglicol 10%, tween

80 1%, agua 79%) y, siguiendo el procedimiento bioquímico, las siguientes fracciones: EA, EC1, EH, EM1, EC2, EM2, F1, F3, F10 y F1.4; 500 mg/kg. El volumen de administración fue de 0.01 mL/g de peso. Se utilizaron entre 8 y 10 animales por grupo.

Dado que el ayuno prolongado modifica el umbral convulsivo, los animales se dejaron sin alimento únicamente dos horas antes de cada ensayo y se utilizaron una sola vez. Dentro de la primera hora posterior a la administración de las sustancias se les aplicó una descarga eléctrica vía corneal de 50 mA de 60 Hz (15). De acuerdo con pruebas preliminares se fijó la duración de la descarga en 30 milisegundos, tiempo suficiente para provocar la convulsión tónico clónico generalizada en la mayoría de animales del grupo control. Previamente se instiló una gota de solución salina isotónica en cada ojo, para mejorar la conducción eléctrica.

Se catalogó como protegido de la convulsión, aquel animal en el que no se presentó la extensión tónica de las extremidades inferiores (15). Se utilizó un estimulador eléctrico que permite administrar pulsos de corriente o voltaje constante de forma controlada (ref. E13-51, Coulbourn Instruments®).

Todos los procedimientos se efectuaron conforme a las especificaciones concernientes a la protección del animal de laboratorio consignadas en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y en la Ley 84 de 1989 de la Republica de Colombia.

Fármacos y soluciones

Se utilizaron los siguientes productos: difenilhidantoína (Epamín®, suspensión); glicerina, tween 80, etanol 96%, cloroformo, hexano, metanol (Merck).

Análisis de datos y estadística

Se siguió una distribución de tratamientos completamente al azar. Los tratamientos correspondientes fueron: el extracto etanólico total de los frutos de *Apium graveolens*, fenitoína sódica (20 mg/kg po) como patrón, el vehículo como control y las fracciones EA, EC1, EH, EM1, EC2, EM2, F1, F3, F10 y F1.1. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de χ^2 , indicada cuando la variable de medición es de tipo cuantil (16). El nivel de significancia escogido fue de 0.05. Para el análisis de los datos se utilizaron los programas EXCEL MS-97® y SPSS®, v 7.5.

Resultados

Fraccionamiento

La cromatografía en capa delgada del extracto etanólico de los frutos de *Apium graveolens* reveló la presencia de compuestos que dan prueba positiva para alcaloides, terpenoles y/o esteroidales, cumarinas, flavonoides y saponinas. El

rendimiento de las fracciones resultantes del extracto etanólico de *Apium graveolens* se muestra en la Tabla No 1.

La fracción clorofórmica F1 se caracterizó por espectroscopía IR revelando la presencia sustancias aromáticas (3050 cm^{-1} , $1400\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), banda característica para grupo carbonilo (1754 cm^{-1}) y otras bandas pertenecientes a moléculas con radicales alifáticos. Esta fracción se sometió a purificación por MPLC y se obtuvieron siete subfracciones, que presentaron sustancias que por cromatografía en capa delgada revelaron positivo con Dragendorff (F1.2, F1.3, F1.4 y F1.5), Godin (F1.2, F1.3, F1.4, F1.5, F1.6 y F1.7) o presentaron fluorescencia azul al UV 365 nm (F1.5, F1.6, F1.7). El análisis cromatográfico de la fracción F1.3 mostró una sustancia en mayor proporción, comparada con las demás subfracciones que presentaron varios constituyentes, y se caracterizó por espectroscopía IR permitiendo detectar la presencia de una molécula aromática (3050 cm^{-1} , $1400\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), con grupos metileno, metilo (2962 cm^{-1} , 2853 cm^{-1}) y carbonilo (1760 cm^{-1}).

Tabla 1. Fraccionamiento fitoquímico a partir del extracto etanólico de los frutos de los frutos de *Apium graveolens*.

EE*, 19.3 g			
EC1, 9.00 g			EA, 7.10 g
EM1, 5.50 g			S1, 2.40 g
EM2, 0.95g		EH, 2.05 g	
EC2M 4.49g			
F1		F2, F3, F4, F5, F6 F7, F8, F9, F10	
F1.1, F1.2, F1.3, F1.4, F1.5, F1.6, F1.7			

*EE: extracto etanólico, EC1: extracto clorofórmico 1, EA: extracto acuoso, S1: sólido 1, EM1: extracto metanólico 1, EH: extracto hexánico, EM2: extracto metanólico 2, EC2: extracto clorofórmico 2.

Pruebas biológicas

En la Figura 1 se observan los porcentajes de protección de todos los tratamientos utilizados. Los grupos patrón y control (fenitoína y vehículo) arrojaron porcentajes de 77 y 22 % respectivamente. EE confirió una protección del 100%. EA y EC1 obtenidos a partir de EE presentaron índices de protección de 0 y 86 % respectivamente. EM1 y EH derivados del fraccionamiento de EC1, arrojaron índices de protección de 86 y 100 %. Los extractos EC2 y EM2 obtenidos de EM1; presentaron una marcada diferencias en sus índices de protección: 86 y 0 %. Las fracciones F1, F3 y F10 obtenidas de la purificación por cromatografía en columna de EC2, presentaron protección de 88, 25 y 0 %. La fracción F1.4, purificada por MPLC a partir de F1 presentó 88 % de protección. Con la fracción EH que presentó el mayor índice de protección no se continuó el estudio bioguiado debido a su escasa cantidad

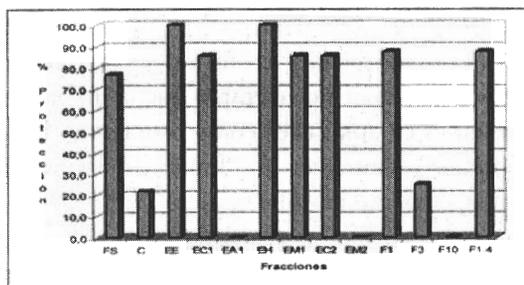


Figura 1. Porcentajes de protección frente a la convulsión máxima inducida eléctricamente en ratones de las fracciones y subfracciones obtenidas de frutos de *Apium graveolens*, fenitoína sódica (20 mg/kg vo), y control (vehículo: 0,01 ml/g de peso; n=8-10 animales por grupo). FS: fenitoína sódica, C: control, EE: extracto etanólico, EC1: extracto clorofórmico 1, EA: extracto acuoso, EH: extracto hexánico, EM1: extracto metanólico 1, EC2: extracto clorofórmico 2, EM2: extracto metanólico 2, F1: subfracción F1 obtenida de EC2, F3: subfracción F3 obtenida de EC2, F10: subfracción F10 obtenida de EC2, F1.4: subfracción F1.4 obtenida de EC2.

y a que presentaba, por análisis por CCD, similitud con la fracción EC2.

Discusión

Este estudio ha permitido confirmar la actividad anticonvulsivante de los frutos de *Apium graveolens*, reconocer sus grupos metabólicos principales y avanzar en su caracterización química y farmacológica.

El análisis fitoquímico permitió confirmar la presencia de cumarinas, flavonoides, terpenoides y/o esteroides así como compuestos de variadas polaridades que dan prueba positiva para alcaloides por CCD. Algunas cumarinas han sido previamente descritas en *Apium graveolens* (17-18) y han sido confirmadas en este estudio en las fracciones EC1, EC2, EM1, EM2 y EH.

La actividad anticonvulsivante parecería estar ligada a la presencia de compuestos de baja polaridad, que revelan positivo en la prueba para alcaloides y que mostraron una notable respuesta, tales como los presentes en la fracción F1, a diferencia de las presentes en la fracción F3, que posee compuestos similares pero de mediana polaridad y de los detectados en la fracción F10, que carece de unos y otros. Este planteamiento se refuerza con la alta protección obtenida con la subfracción F1.4 en la que se confirmó la presencia de un compuesto de baja polaridad, que da positivo en la prueba de Dragendorff por CCD.

El espectro IR de la fracción F1, que corresponde a una mezcla, reveló la presencia de compuestos aromáticos y alifáticos. La subfracción F1.4 proveniente de F1 (protección del 88 %), presenta en el espectro IR bandas que pueden atribuirse a una molécula con una porción alifática y otra aromática, con un grupo carbonilo y que pueden tener un grupo amino secundario.

Todos estos datos apoyan la idea de un compuesto poco polar, de bajo peso molecular, que da prueba positiva para alcaloides, aromático, con un grupo funcional carbonilo y que posiblemente sea una amina secundaria, como el responsable, o cuando menos, uno de los responsables de la actividad anticonvulsivante de frutos de *Apium graveolens*. Es evidente que una sustancia anticonvulsivante debe ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y la estructura química de este compuesto le conferiría la lipofilicidad necesaria para acceder al SNC. Actualmente se adelantan estudios adicionales para confirmar la estructura de la o las moléculas activas.

Se ha reportado gran cantidad de compuestos aislados de *Apium graveolens* dentro de los que se destaca el 3-*n*-butiltalido que posee efectos antiisquémicos (19). Otros compuestos relacionados con el anterior como el sedanólido y los senkiunólidos y un compuesto derivado del indol han sido estudiados para evaluar su actividad antioxidante e inhibidora de la ciclooxigenasa y la topoisomerasa (20).

Los parámetros de descarga eléctrica utilizados en este estudio se ajustaron en esencia a lo descrito por Swinyard y col., (15) si bien se modificaron en lo relacionado con la duración del estímulo. Dada la alta sensibilidad de la colonia de ratones ICR hubo necesidad de disminuir la duración de la descarga al orden de 30 ms (21). El alto índice de protección observado con el patrón utilizado, fenitoína sódica, y a la vez el alto índice de convulsión en el grupo control, permitieron confirmar que las condiciones establecidas fueron adecuadas.

Es importante resaltar los altos índices de protección obtenidos a partir de EE y algunas de las subsecuentes fracciones activas (entre 87 y 100%), estos valores indican que la actividad anticonvulsivante no decrece con los procesos de purificación, como sí suele ocurrir con un

buen número de productos naturales (22). Un estudio posterior, tipo dosis-respuesta tendiente a identificar la DE₅₀ permitirá verificar si la potencia anticonvulsivante se incrementa con el compuesto puro.

Si se llega a establecer un buen índice de seguridad (relación DE₅₀/DT₅₀) se estaría hablando de un compuesto potencialmente promisorio. La escasa cantidad obtenida no permitió efectuar un estudio dosis-respuesta en esta ocasión. Es de esperarse en principio una baja toxicidad aguda teniendo en cuenta que en estudios previos se confirmó el aparente buen perfil de seguridad del extracto de frutos de *Apium graveolens*, dado que mostró una CI₅₀ del orden de 385 mg/kg, vo, en tanto que no se evidenciaron signos importantes de déficit neurológico, según la Prueba de Irwing y del Eje Rodante, incluso hasta la dosis de 1000 mg/kg (14). En este trabajo, se evaluó la toxicidad aguda de la fracción EH, con las mismas pruebas y tampoco se evidenciaron signos neurotóxicos hasta con 1000 mg/kg vo. En cualquier caso habría que considerar con precaución la posible toxicidad subaguda y crónica del compuesto. Cabe mencionar por ejemplo que compuestos presentes en apio, tales como psoralenos, bergaptenos y xantoxinas son fotosensibilizantes y potencialmente fotomutagénicos (23).

La convulsión máxima inducida eléctricamente viene siendo utilizada desde hace tiempo como modelo de las crisis tónico clónico generalizadas en el humano. Este perfil protector identificado en el compuesto purificado de los frutos de *Apium graveolens*, la ubicaría a niveles comparables a fármacos tales como, fenitoína y carbamazepina, entre otros, ampliamente utilizados hoy en día en clínica. Estos compuestos comparten como mecanismo farmacodinámico, su capacidad para interferir con canales de sodio dependientes de voltaje (24). Es posible por tanto, que tal sea el mecanismo de acción

del compuesto mencionado. Estudios *in vitro*, con mediciones de potenciales de acción en sinaptosomas y cultivos neuronales permitirían confirmar este planteamiento (25-26).

Desde luego, es necesario explorar el comportamiento de este compuesto en otros modelos experimentales de epilepsia, entre ellas las convulsiones químicas inducidas con pentileno-tetrazol, bicuculina, estriquina, ácido kaínico y su patrón de respuesta en registros electroencefalográficos (27-28).

En conclusión, el seguimiento bioguiado de los frutos de *Apium graveolens* permitió detectar la presencia de un compuesto que confiere una protección notable frente a la convulsión máxima inducida eléctricamente en ratones, de tipo aromático, con una porción alifática y con grupo carbonilo. Se adelantan nuevos estudios con el fin de caracterizar definitivamente la sustancia y establecer su perfil farmacodinámico.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Proyecto "Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas Medicinales Colombianas", a COLCIENCIAS, al Proyecto X-9 del CYTED, a la División de Investigación, Sede Bogotá, (DIB) y al Dpto. de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Bibliografía

1. Commission on Epidemiology and Prognosis of the International League Against Epilepsy. Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy, *Epilepsia*, 34, 592 (1993).
2. F. Gracia, "Epidemiología de la Epilepsia en Latinoamérica. Sección de Neurología del Hospital Santo Tomás", República de Panamá, 1998.
3. D. Schmidt, The clinical impact of new antiepileptic drugs after a decade of use in epilepsy, *Epilepsy Res.*, 50, 21 (2002).
4. J.O. McNamara, Emerging insights into the genesis of epilepsy, *Nature*, 399, 6738 Suppl. A15 (1999).
5. A.M. Clark, Natural products as a resource for new drugs, *Pharm. Res.*, 13, 1133 (1996).
6. L.H. Caporale, Chemical ecology: a view from the pharmaceutical industry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 75 (1995).
7. V.E. Tyler, Phytomedicines: back to the Future, *J. Nat. Prod.*, 62, 1489 (1999).
8. S. Grabley and R. Thiericke, Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 64, 101 (1999).
9. J.T. Zhang and X.M. LI., ABP: A new type of antiepileptic agent, *Eur. J. Pharmacol.*, 183, 609 (1990).
10. A. Portilla. "Divulgación de Conocimientos Científicos sobre las Plantas más Útiles y Conocidas en Colombia.", Editorial Luz, Pasto, 1951, p. 331.
11. M.H. Pourgholami, S. Majzoub, M. Javadi, M. Kamalinejad, G.H. Fanaee, and M. Sayyah, The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* exerts anticonvulsant effects in mice, *J. Ethnopharmacol.*, 66, 211 (1999).
12. M. Sayyah, A. Mandgary, and M. Kamalinejad, Evaluation of the anticonvulsant activity of the seed acetone extract of *Ferula gummosa* Boiss against seizures induced by pentileno-tetrazole and electroconvulsive shock in mice, *J. Ethnopharmacol.*, 82, 105 (2002).
13. Y. Liu, H. Wu, and F. Ge, Chemical constituents analysis on anticonvulsive effect of three extracts from *Radix bupleuri*, *Zhong Yao Cai.*, 25, 635 (2002).

14. M.F. Guerrero, C.L. Gracia y B. Meneses, Actividad anticonvulsivante del extracto de *Apium graveolens* L. en ratones. *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.*, **26**, 7 (1997).
15. E.A. Swinyard, J.H. Woodhead, H.S. White, and M.R. Franklin, "Experimental Selection, Quantification, and Evaluation of Anticonvulsants. Antiepileptic Drugs", 3rd ed. Ed. R. Levy, New York, 1989, pp. 85-102.
16. S. Siegel, "Estadística no Paramétrica", 3^a Ed, Trillas, México, 1991, p. 120.
17. R.C. Beier, G.W. Ivie, E.H. Oertli, and D.L. Holt, HPLC analysis of linear furocoumarins (psoralens) in healthy celery (*Apium graveolens*), *Food Chem. Toxicol.*, **21**, 163 (1983).
18. G.A. Lombaert, K.H. Siemens, P. Pellaer, M. Mankotia, and W. Ng, Furanocoumarins in celery and parsnips: method and multiyear Canadian survey, *J. AOAC Int.*, **84**, 1135 (2001).
19. J.T. Zhang, New drugs derived from medicinal plants, *Therapie*, **57**, 137 (2002).
20. R.A. Momin and M.G. Nair, Antioxidant, cyclooxygenase and topoisomerase inhibitory compounds from *Apium graveolens* Linn seeds, *Phytomed.*, **9**, 312 (2002).
21. P. Salvati, R. Maj, C. Caccia, et al., Biochemical and electrophysiological studies on the mechanism of action of PNU-151774E, a novel antiepileptic compound, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**, 1151 (1999).
22. J. Chang, Medicinal herbs: Drugs or dietary supplements?, *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 211 (2000).
23. R.C. Beier, Natural pesticides and bioactive components in foods, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **113**, 47 (1990).
24. H.S. White, Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of the established and newer antiepileptic drugs, *Epilepsia*, **40** Suppl 5, 2 (1999).
25. M.B. Jackson, Toward a mechanism of gating of chemically activated channels, *Adv. Neurol.*, **44**, 171 (1986).
26. A.V. Delgado-Escueta and M.P. Horan, Brain synaptosomes in epilepsy: organization of ionic channels and the Na⁺-K⁺ pump, *Adv. Neurol.*, **27**, 85 (1980).
27. A.J. Gower, M. Noyer, R. Verloes, J. Gøbert, and E. Wülfert, ucb L059, a novel anti-convulsant drug: pharmacological profile in animals, *Eur. J. Pharmacol.*, **222**, 193 (1992).
28. M.F. Guerrero, C.L. Gracia y B. Meneses. Registro electroencefalográfico computarizado en ratas para la detección de anticonvulsivantes, *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.*, **26**, 59 (1997).