



ORIGINAL

Actividad anticonvulsivante del extracto metanólico de tallo y raíz de *Kalanchoe pinnata* Lam. en ratones: Comparación con diazepam



CrossMark

A. Mora-Pérez^{a,b,*} y M. del R. Hernández-Medel^b

^a Posgrado en Neuroetología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

^b Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

Recibido el 24 de abril de 2015; aceptado el 1 de junio de 2015

Accesible en línea el 20 de agosto de 2015

PALABRAS CLAVE

Anticonvulsivante;
Convulsiones;
Bryophyllum pinnatum;
Kalanchoe pinnata;
Diazepam;
Pentilene-tetrazol

Resumen

Introducción: En México, la medicina tradicional emplea extractos de hojas o de la planta completa de «siempre viva» (*Kalanchoe pinnata* [K. *pinnata*] Lam.) para tratar la alferecía amarilla cuando presenta convulsiones. La actividad anticonvulsivante del tallo o de la raíz sigue sin explorarse.

Métodos: El extracto metanólico de la raíz (EMR) y el del tallo (EMT) de *K. pinnata* Lam., fueron evaluados con el modelo de inducción de convulsiones con pentilene-tetrazol en ratones de la cepa Balb/C, comparado con diazepam. Las fracciones del EMT fueron subsecuentemente evaluadas.

Resultados: El EMR incrementó la latencia a las crisis clónico-tónicas de forma inversamente proporcional a la dosis, observándose el mismo patrón sobre los efectos letales del pentilene-tetrazol. Todas las dosis evaluadas del EMT aumentaron la latencia a las mioclonías y a las crisis clónicas de forma dosis-dependiente e incrementaron la latencia a las crisis clónico-tónicas de manera semejante al diazepam con una protección del 100% contra los efectos letales del pentilene-tetrazol. El fraccionamiento del EMT redujo su eficacia. Al mezclar las fracciones de cloroformo y acetato de etilo, se recuperó la actividad anticonvulsivante y la protección contra los efectos letales. El análisis fitoquímico preliminar identificó alcaloides y esteroides en el EMR; esteroides y terpenos en el EMT.

Conclusión: La actividad anticonvulsivante de EMR de *K. pinnata* Lam. disminuye aumentando la dosis y en el EMT se presenta de forma dosis-dependiente, conservándose en la mezcla de cloroformo y acetato de etilo. Se sugiere que los metabolitos responsables de estos efectos son esteroides en el EMR; esteroides y terpenos presentes en el EMT.

© 2015 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: dayomora@hotmail.com (A. Mora-Pérez).

KEYWORDS

Anticonvulsant;
Convulsions;
Bryophyllum
pinnatum;
Kalanchoe pinnata;
Diazepam;
Pentylentetrazol

Anticonvulsant activity of methanolic extract from *Kalanchoe pinnata* Lam. stems and roots in mice: A comparison to diazepam

Abstract

Introduction: In ancient and current traditional medicine in México, extracts from the leaves or whole plant of 'life leaf' (*Kalanchoe pinnata* [*K. pinnata*] Lam) have been used to treat an entity known locally as 'yellow epilepsy' (*alferecía amarilla*) when it is accompanied by seizures. However, the anticonvulsive activity of its stems and roots remains unexplored

Methods: The anticonvulsant activity of the methanolic root extract (MER) or stem (MES) of *K. pinnata* Lam. was evaluated in a pentylentetrazol-induced seizure model in Balb/C mice, and effects were compared to those of diazepam. The stem extract fractions that produced anti-convulsant activity were subsequently evaluated using the pentylentetrazol -induced seizure model.

Results: We observed increased latency of tonic-clonic seizures that was inversely proportional to the dose of MRE, with a similar impact on the lethal effects of pentylentetrazol. Different doses of the MSE showed a dose-dependent increase in latency to myoclonus, clonus, and tonic-clonic seizures, acting similarly to diazepam and offering 100% protection against the lethal effects of pentylentetrazol. Fractioning MSE decreased its effectiveness, but when fractions were mixed with fractions of chloroform and ethyl acetate, anticonvulsive activity was restored. The preliminary phytochemical analysis identified alkaloids and sterols in MRE, and sterols and terpenes in MSE

Conclusions: The anticonvulsant activity of *K. pinnata* Lam. decreases with increased doses of MRE, whereas the effect of MSE is dose-dependent and preserved in the mixture chloroform and ethyl acetate. We suggest that the metabolites responsible for these effects are sterols in MRE, and sterols and terpenes in MSE

© 2015 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Kalanchoe pinnata (*K. pinnata*) Lam (sin. *Bryophyllum pinnatum*) es una planta endémica de Madagascar perteneciente a la familia de las Crassulaceae y actualmente distribuida por todo el mundo^{1,2}. En México, es popularmente conocida como «siempre viva» y se encuentra entre los 20-2.600 m sobre el nivel del mar³.

En algunas regiones del estado de Veracruz, México, la planta completa es empleada en la medicina tradicional en forma de infusión para tratar la «alferecía amarilla» cuando se presentan convulsiones⁴. Algunos estudios demostraron que el extracto acuoso de las hojas de *K. pinnata* Lam. (50-200 mg/kg) ejerce actividad anticonvulsivante y sedante, presentando mayor eficacia frente a los efectos de la picrotoxina que frente a los de la esticnina⁵. El modelo del pentilentetrazol (PTZ) es el método más usado para la búsqueda de sustancias con potenciales efectos anticonvulsivantes^{6,7}, incluyendo los extractos de plantas⁸. Este modelo permite identificar el desarrollo de las convulsiones inducidas por PTZ (75-90 mg/kg, ip, 6-7) identificando 5 niveles: 0 (no convulsiones), 1 (disminución progresiva de la actividad motora), 2 (mioclonías, movimiento localizados), 3 (convulsiones clónicas, pérdida de la postura erguida), 4 (fase clónico-tónicas) y 5 (muerte)^{6,9,10}. El mecanismo por el cual el PTZ induce convulsiones aún no ha sido completamente establecido. Sin embargo, se ha sugerido que actúa sobre el sitio de reconocimiento de la picrotoxina

en el receptor GABAA⁶⁻¹¹. Diversos agonistas del receptor GABAA, como el diazepam (DZP), protegen contra las convulsiones inducidas por el PTZ^{12,13}.

En el presente estudio, el potencial efecto anticonvulsivante de diversas dosis del extracto metanólico de raíz (EMR) y del de tallo (EMT) de *K. pinnata* Lam., fueron evaluadas empleando el modelo inducción de convulsiones con PTZ en ratones de la cepa Balb/C, comparando los efectos producidos con el DZP un fármaco anticonvulsivante clínicamente efectivo.

Material y métodos

Material vegetal

K. pinnata Lam. fue colectada en la ciudad de Xalapa, Veracruz, México, y autenticada por especialistas del herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Veracruzana (CIB-UV), donde se quedó bajo su resguardo un espécimen con número referencia (CIB 9091, 9092).

Preparación de los extractos de *Kalanchoe pinnata* Lam

El tallo (598,06 g) y la raíz (495 g) de *K. pinnata* Lam. fueron secados durante 7 días a 50 °C, obteniéndose 88,11 g de tallo

y 56,04 g de raíz, que fueron separados y picados. El material vegetal fue sometido a maceración con metanol (MeOH) de 5-7 días y concentrado empleando un rotoevaporador (Buchi, Flawil, Suiza) a 65 °C, obteniendo un rendimiento de 32,60 g del EMT y 5,90 g del EMR, los cuales fueron evaluados en el modelo de PTZ, para determinar su potencial anticonvulsivante. Con base a esos resultados se decidió solo fraccionar el EMT. Se sometió 1 g del EMT a cromatografía en columna. La columna fue empacada con silicagel (70-230 mesh, Merck). La elución se realizó empleando los disolventes cloroformo (CHCl₃), acetato de etilo (AcOEt) y MeOH. Fueron obtenidas 4 fracciones: CHCl₃ (8,2%), AcOEt (8,3%), MeOH (35,2%) y una sal inorgánica (SI; 48,3%).

Animales

Se emplearon 114 ratones jóvenes ambos sexos de la cepa Balb/C¹³, con peso de entre 22-25 g al inicio de los experimentos. Los ratones se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM-Cuernavaca (IBTUNAM), Cuernavaca, Morelos, México. Se mantuvieron en cajas acrílicas bajo condiciones controladas de luz/oscuridad (ciclo de 12 h/12 h) y temperatura (25 ± 1 °C), con acceso *ad libitum* a agua purificada y alimento (Harlan México, S.A. de C.V.). Todos los animales se manejaron de acuerdo a las normas éticas establecidas en la Guía con respecto al Uso, Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio (National Research Council, 1996,¹⁴) y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Fármacos y reactivos

PTZ, propilenglicol y Tween 80 fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). DZP fue obtenido del Laboratorios Cryopharma (Cryopharma S.A. de C.V., México). Los disolventes CHCl₃, AcOEt, y MeOH fueron obtenidos de PFQ (PFQ S.A. de C.V., México) y purificados a través de destilación fraccionada y por columnas de rectificación.

Pruebas fitoquímicas preliminares

Las pruebas preliminares se realizaron mediante el empleo de los siguientes métodos cualitativos: presencia de alcaloides (reactivos de Dragendorff y Wagner), esteroides y terpenos (reacción de Lieberman Burchard y Salkowski) y flavonoides (técnica de Shinoda). El perfil químico de la SI se obtuvo mediante el ensayo a la flama y el reactivo de Griess, para determinar nitratos (NO₃), y AgNO₃ para determinar cloruros (Cl⁻)^{15,16}.

Series experimentales

Actividad anticonvulsivante del extracto metanólico de tallo

Treinta seis ratones jóvenes fueron asignados a 6 grupos independientes (n=6 por grupo). El primer grupo (VEH) recibió por vía oral 10 ml/kg de vehículo (cosolvente, integrado por propilenglicol, Tween 80, y solución salina, 4:1:5, v:v:v)¹⁷. Al segundo grupo se le administró DZP (5 mg/kg; ip) como fármaco de referencia¹³. Los 4 grupos restantes

recibieron dosis de 100, 200, 400 y 800 mg/kg, vía oral de EMT respectivamente. Todos los tratamientos se administraron 30 min antes del agente convulsivante PTZ (75 mg/kg, ip). Después de la administración, los sujetos experimentales fueron colocados individualmente en cajas de acrílico (11 × 11 × 11 cm) para su observación.

Se emplearon 2 fases de observación. En la primera fase, durante 30 min se evaluaron las latencias a: a) las mioclonías, b) las crisis clónicas y c) las crisis clónico-tónicas. Se consideró como tiempo cero el momento en que se administró el agente convulsivante PTZ. En la segunda fase, se evaluó la variable protección contra los efectos letales, considerando una protección total cuando el sujeto experimental sobrevivió 24 h después de administrado el PTZ.

Actividad anticonvulsivante del extracto metanólico de raíz

En otros treinta y seis ratones, se evaluó el efecto del EMR, distribuidos a 6 grupos independientes (n=6 por grupo): vehículo (VEH, 10 ml/kg vo), DZP (5 mg/kg, ip) y los 4 grupos restantes recibieron las dosis del EMR (100, 200, 400 y 800 mg/kg, vo) respectivamente. Se utilizó el mismo esquema experimental del EMT.

Actividad anticonvulsivante de las fracciones del extracto metanólico de tallo

Cuarenta y dos ratones fueron asignados a 7 grupos independientes (n=6 por grupo): vehículo (10 ml/kg vo), DZP (5 mg/kg, ip), los 5 grupos restantes recibieron vo (100 mg/kg) las fracciones del EMT: CHCl₃, AcOEt, MeOH, CHCl₃:AcOEt (mezcla 1:1 de CHCl₃ y AcOEt), y la SI. El efecto de los tratamientos se evaluó como se describió en los protocolos anteriores.

Todas las sesiones experimentales fueron videograbadas con una videocámara (Sony, DCR-DVD 101, lente Carl Zeiss) para ser analizadas posteriormente.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el ANOVA de una vía para grupos independientes. Cuando los valores fueron de $p \leq 0,05$, se aplicó la prueba de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. Los resultados se expresaron como media ± error estándar.

Resultados

Análisis fitoquímico preliminar

Los resultados del análisis fitoquímico preliminar del extracto de *K. pinnata* Lam. se presentan en la [tabla 1](#). Los alcaloides y esteroides fueron identificados en el EMR. Terpenos y esteroides fueron detectados en el EMT, en las fracciones de CHCl₃, AcOEt, y en la mezcla de CHCl₃:AcOEt. Flavonoides fueron detectados en el EMT, no así en sus fracciones. En la SI obtenida del EMT se identificaron cloruros, nitratos y potasio.

Tabla 1 Análisis fitoquímico preliminar

Metabolitos	Extractos		Fracciones de EMT				
	EMT	EMR	CHCl ₃	AcOEt	CHCl ₃ -AcOEt	MeOH	SI
Alcaloides	-	+	-	-	-	-	—
Esteroles	+	+	+	+	+	-	—
Flavonoides	+	-	-	-	-	-	—
Terpenos	+	+	+	+	+	-	—
Cloruros	—	—	—	—	—	—	+
Nitratos	—	—	—	—	—	—	+
Potasio	—	—	—	—	—	—	+

AcOEt: acetato de etilo; CHCl₃: cloroformo; CHCl₃-AcOEt: cloroformo-acetato de etilo; EMR, extracto metanólico de raíz; EMT: extracto metanólico de tallo; MeOH: metanol; SI: sal inorgánica; +: presencia; -: ausencia.

Actividad anticonvulsivante del extracto metanólico de tallo

El análisis estadístico demostró diferencias significativas ($F_{5,30}=48,02$; $p<0,001$) en la latencia a las mioclonías. La prueba *post hoc* mostró que esta variable se incrementó con todas las dosis evaluadas del EMT comparadas con el vehículo, aunque con menor eficacia que el DZP y la dosis de 100 mg/kg y 200 mg/kg con menor eficacia que las de 400 mg/kg y 800 mg/kg (fig. 1a). Asimismo, se observaron diferencias significativas ($F_{5,30}=8,19$; $p<0,001$) en la latencia a las crisis clónicas. Esta variable se incrementó de forma dosis-dependiente en menor eficacia que el DZP y la dosis de 100 mg/kg y 200 mg/kg con menor eficacia que las de 400 mg/kg y 800 mg/kg (fig. 1b). La latencia a las crisis clónico-tónicas fue significativamente diferente ($F_{5,30}=62765,40$; $p<0,001$) entre los tratamientos. La prueba *post hoc* mostró que todas las dosis evaluadas incrementaron significativamente esta variable con respecto al vehículo con la misma eficacia que el DZP (fig. 1c).

Finalmente, todas las dosis del EMT y el DZP producen una protección del 100% contra los efectos letales del PTZ (tabla 2).

Actividad anticonvulsivante del extracto metanólico de raíz

El análisis estadístico demostró diferencias significativas ($F_{5,30}=298,64$; $p<0,001$; fig. 2a) en la latencia a las mioclonías y en la latencia a las crisis clónicas ($F_{5,30}=20147,09$; $p<0,001$; fig. 2b); la *post hoc* demostró que solo el DZP incrementó dichas latencias en comparación a todos los grupos. SE encontraron diferencias significativas ($F_{5,30}=12,41$; $p<0,001$) en la latencia a las crisis clónico-tónicas. EL análisis *post hoc* mostró que los grupos tratados con el EMR (100-400 mg/kg) exhiben un incremento en la latencia a las crisis clónico-tónicas comparado con el vehículo, no así con la dosis de 800 mg/kg, aunque con menor eficacia que el DZP (fig. 2c). Un efecto similar fue detectado en la variable protección contra los efectos letales del PTZ (tabla 3).

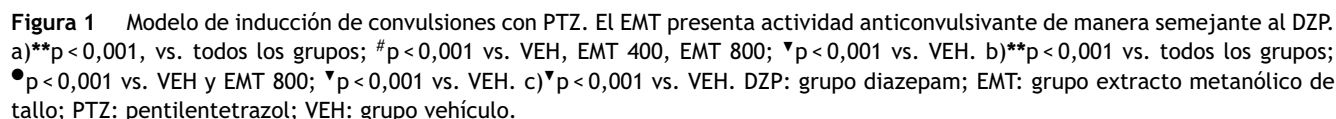
Actividad anticonvulsivante de las fracciones del extracto metanólico de tallo

La latencia a las mioclonías presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{6,35}=80,66$; $p<0,001$), así como la latencia a las crisis clónicas ($F_{6,35}=8,71$; $p<0,001$). La prueba *post hoc* mostró que las fracciones de CHCl₃ y AcOEt aumentaron significativamente la latencia comparadas con el VEH, MeOH y SI; mientras que DZP y CHCl₃:AcOEt la incrementaron con respecto a todos los grupos (fig. 3a, 3b). La latencia a las crisis clónico-tónicas presentó diferencias significativas ($F_{6,35}=38,42$; $p<0,001$). La prueba *post hoc* mostró que CHCl₃, AcOEt y MeOH incrementaron esta variable en comparación con el grupo VEH y la SI, mientras que DZP y CHCl₃:AcOEt con respecto a todos los grupos (fig. 3c).

Finalmente, las fracciones del EMT presentan una menor protección sobre los efectos letales del PTZ. Sin embargo, la mezcla de fracciones CHCl₃:AcOEt muestra una protección total, similar a la producida por el EMT y el DZP. La fracción de SI no presenta actividad alguna en esta variable (tabla 4).

Discusión

En el presente trabajo se exploró la actividad anticonvulsivante del EMR y EMT de *K. pinnata* en ratones de la cepa Balb/C sometidos al modelo de inducción de convulsiones con PTZ. Estudios preclínicos demuestran que fármacos anticonvulsivantes clínicamente efectivos (valproato, DZP y carbamazepina), aminoran la severidad de las convulsiones inducidas por el PTZ^{7,18}. El EMR incrementó la latencia a las crisis clónico-tónicas de manera inversamente proporcional a la dosis, presentando el mismo comportamiento sobre los efectos letales del PTZ, y observándose la mejor eficacia con la dosis de 100 mg/kg, aunque menor que con el DZP. Mientras que el EMT incrementó de manera dosis-dependiente la latencia a las mioclonías y a las crisis clónicas con respecto del vehículo, con menor eficacia que el DZP; todas las dosis evaluadas incrementaron la latencia a las crisis clónico-tónicas y presentaron una protección del 100% frente a los efectos letales del PTZ con la misma eficacia que el DZP. De acuerdo al análisis fitoquímico preliminar, los efectos sobre las crisis clónico-tónicas por el EMT y el



poseen actividad anticonvulsivante, mediante la activación del receptor GABA_A^{21,22}.

Por otra parte, los efectos producidos por el EMT sobre la latencia a las mioclonías y a las crisis clónicas podrían ser atribuidos a la presencia de los terpenos como la α -amirina y β -amirina, que ya se han identificado en *K. pinnata*

Variables	Grupos					
	VEH	DZP	100	200	400	800
				EMT (mg/kg)		
Ratones vivos/ ^a n	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Protección (%)	0	100	100	100	100	100

^a n: ratones por caja.

Variables	Grupos					
	VEH	DZP	100	200	400	800
				EMR (mg/kg)		
Ratones vivos/ ^a n	0/6	6/6	3/6	2/6	2/6	0/6
Protección (%)	0	100	50	33.3	33.3	0

^a n: ratones por caja.

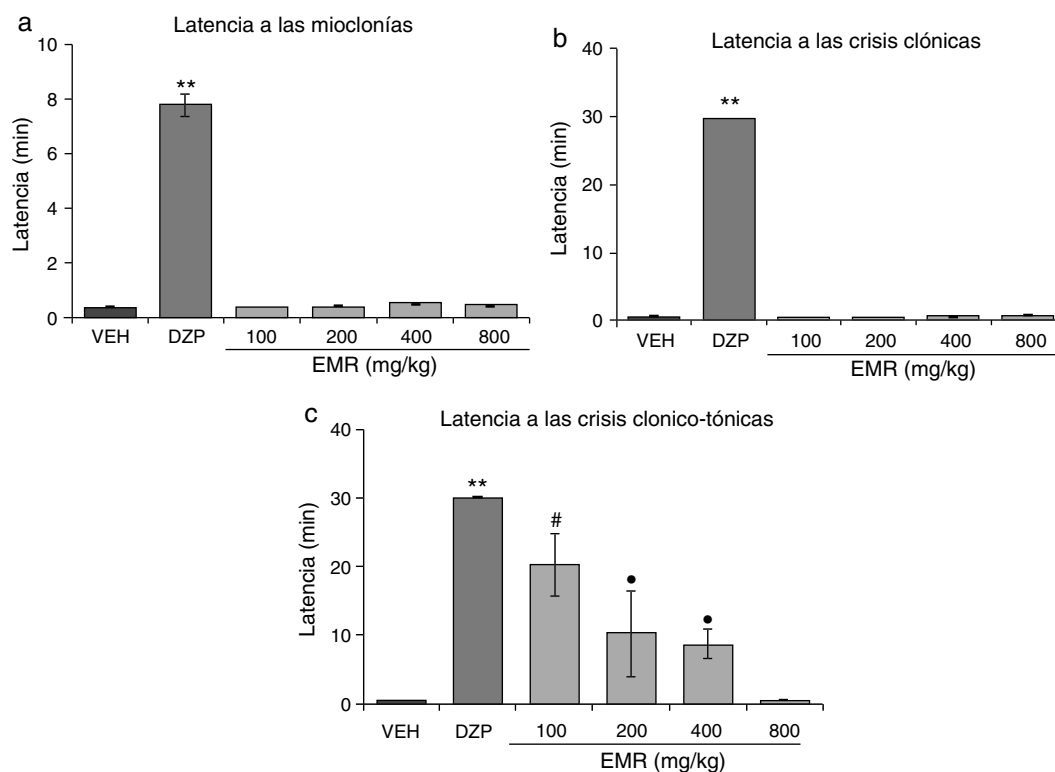


Figura 2 Modelo de inducción de convulsiones con PTZ. El EMR no modifica la latencia a las mioclonías ni a las crisis clónicas. Sin embargo, incrementa de manera inversamente proporcional a la dosis la latencia a las crisis clónico-tónicas. DZP produce efectos anticonvulsivantes. a)** $p < 0,001$ vs. todos los grupos. b)** $p < 0,001$ vs. todos los grupos. c)** $p < 0,001$ vs. VEH, EMR 400, EMR 800; # $p < 0,001$ vs. VEH, EMR 400, EMR 800; • $p < 0,001$, vs VEH, EMR 800. DZP: grupo diazepam; EMR: grupo extracto metanólico de raíz; PTZ: pentilentetrazol; VEH: grupo vehículo.

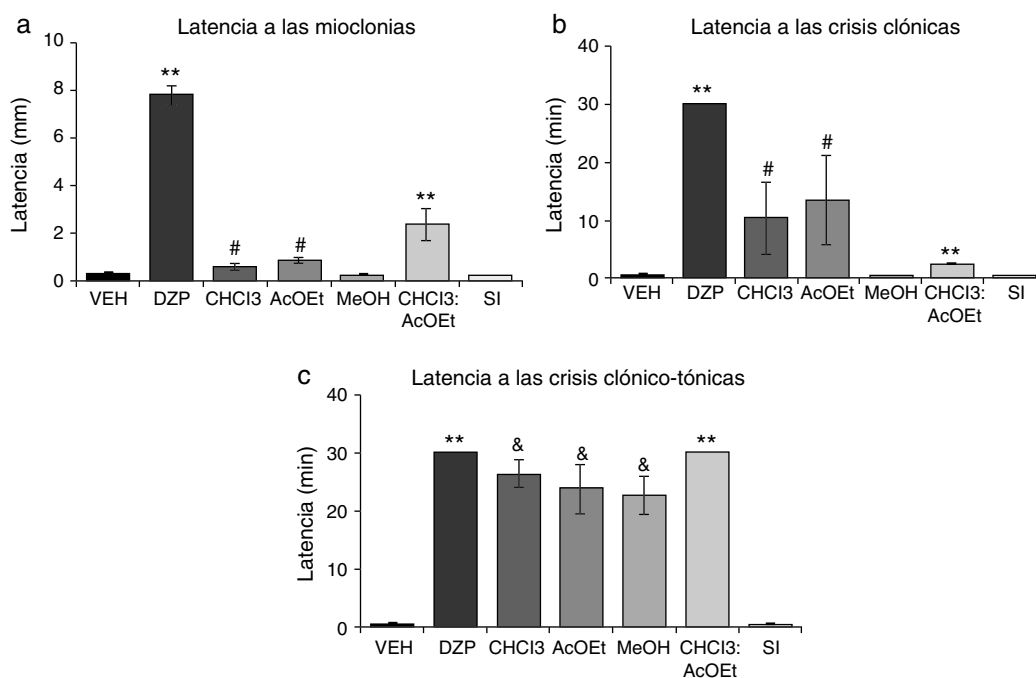


Figura 3 Modelo de inducción de convulsiones con PTZ. Las fracciones CHCl₃, AcOEt, CHCl₃:AcOEt y DZP presentan efectos anticonvulsivantes. a)** $p < 0,001$ vs. todos los grupos; # $p < 0,001$ vs. VEH, MeOH, y SI. b)** $p < 0,001$ vs- todos los grupos; # $p < 0,001$ vs. VEH, MeOH y SI. c)** $p < 0,001$ vs. todos los grupos; & $p < 0,001$, comparado con VEH, SI. AcOEt: grupo acetato de etilo; CHCl₃: grupo cloroformo; CHCl₃:AcOEt: grupo cloroformo:acetato de etilo, DZP: grupo diazepam; MeOH: grupo metanol; PTZ, pentilentetrazol; SI: grupo sal inorgánica; VEH, grupo vehículo.

Tabla 4 Protección de las fracciones del EMT contra los efectos letales del PTZ

Variables	Grupos						SI
	VEH	DZP	CHCl ₃	AcOEt	MeOH	CHCl ₃ -AcOEt	
Ratones vivos/ ^a n	0/6	6/6	4/6	4/6	2/6	6/6	0/6
Protección (%)	0	100	66.6	66.6	33.3	100	0

AcOEt: acetato de etilo; CHCl₃: cloroformo; CHCl₃-AcOEt: cloroformo-acetato de etilo; DZP: diazepam; EMT: extracto metanólico de tallo; MeOH: metanol; PTZ: pentilentetrazol; SI: sal inorgánica; VEH: vehículo.

^a n: ratones por caja.

Lam.¹; dichos terpenos han demostrado tener efectos sobre el sistema nervioso central, al producir efectos anticonvulsivantes en el modelo de PTZ²³ y efectos ansiolíticos en el laberinto de brazos elevados, de manera semejante al DZP, lo que podría indicar que el mecanismo de acción es compartido²⁴. Adicionalmente, se ha relacionado la interacción del sistema noradrenérgico con el efecto anticonvulsivante de la β -amirina, ya que su administración incrementa la liberación de noradrenalina cerebral en ratas²⁵.

También se observó que la actividad anticonvulsivante se conserva en las fracciones CHCl₃ y AcOEt del EMT, no con la misma eficacia que el extracto completo o el DZP; probablemente debido a la disminución de las concentraciones de esteroides y terpenos, identificados también en estas fracciones al fraccionar el EMT. En tanto que al combinar las fracciones CHCl₃ y AcOEt, se recupera la eficacia anticonvulsivante, así como la protección contra los efectos letales del PTZ con la misma eficacia que el DZP.

Una limitante del presente estudio fue que no se logró identificar cuál o cuáles de los esteroides o terpenos son responsables del efecto anticonvulsivante de la planta y/o si existe una interacción entre ellos, una posibilidad que se mantiene para ser explorada en estudios posteriores.

Conclusión

El EMR y el EMT de *K. pinnata* Lam. ejercen actividad anticonvulsivante en el modelo de inducción de convulsiones con PTZ. Adicionalmente el EMT produce una protección total contra los efectos letales del PTZ con la misma eficacia que el DZP. Los metabolitos responsables de la actividad en tallo se encuentran contenidos en la mezcla de las fracciones de CHCl₃ y AcOEt, y se sugiere que son esteroides y terpenos. Mientras que la actividad en el EMR podría ser atribuida a la presencia de esteroides.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

El primer autor recibió beca por parte del CONACyT (Reg.229628), para sus estudios de doctorado en Neuroeología.

Bibliografía

1. Kamboj A, Saluja AK. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz.: Phytochemical and pharmacological profile: A review. *Phcog Rev.* 2009;3:364–74.
2. Nayak BS, Marshall JR, Isitor G. Wound healing potential of ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Lam. leaf: A preliminary study. *Indian J Exp Biol.* 2010;48:572–6.
3. Sandoval JMC, Martínez PJL. El uso de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. en el estado de Veracruz. *La Ciencia y el Hombre.* 1994;16:49–56.
4. Instituto Nacional Indigenista. Siempre viva (*Kalanchoe pinnata* Lam.). En: Argueta A, Vazquez G, Concepcion M, editores. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Mexico City: Instituto Nacional Indigenista; 1994. p. 1282–3.
5. Yemitan OK, Salahdeen HM. Neurosedative and muscle relaxant activities of aqueous extract of *Bryophyllum pinnatum*. *Fitoterapia.* 2005;76:187–93.
6. Löscher W, Hönnack D, Fassbender CP, Nolting B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs: III. Pentylentetrazole seizure models. *Epilepsy Res.* 1991;8:171–89.
7. De Deyn PP, D'Hooge R, Marescau B, Pei YQ. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 1992;12:87–110.
8. Contreras CM, Chacón L, Enriquez RG. Anticonvulsant properties of *Ipomoea stans*. *Phytomedicine.* 1996;3:41–4.
9. Swinyard EA, Kupferberg HJ. Antiepileptic drugs: Detection, quantification, and evaluation. *Fed Proc.* 1985;44:2629–33.
10. Krall RL, Penry JK, White BG, Kupferberg HJ, Swinyard EA. Antiepileptic drug development: II. Anticonvulsant drug screening. *Epilepsia.* 1978;19:409–28.
11. Ramanjaneyulu R, Ticku MK. Interactions of pentamethylene-tetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *Eur J Pharmacol.* 1984;98:337–45.
12. Khosla P, Pandhi P. Anticonvulsant effect of nimodipine alone and in combination with diazepam on PTZ induced status epilepticus. *Indian J Pharmacol.* 2001;33:208–11.
13. Patil MS, Patil CR, Patil SW, Jadhav RB. Anticonvulsant activity of aqueous root extract of *Ficus religiosa*. *J Ethnopharmacol.* 2011;133:92–6.
14. National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Publication no. 85-23]. Washington DC: National Academy Press; 1996.
15. Obadoni BO, Ochuko PO. Phytochemical studies and comparative efficacy of the crude extracts of some homeostatic plants in Edo and Delta States of Nigeria. *Global J Pure Appl Sci.* 2001;8:203–8.
16. Trease GE, Evans WC. *Pharmacognosy*. London: Ballière Tindall Press; 1983.
17. Mustafa F, Indurkar J, Ismail S, Mordi MN, Ramanathan S, Mansor SM. Analgesic activity, toxicity study and phytochemical screening of standardized *Cinnomomum iners* leaves methanolic extract. *Pharmacognosy Res.* 2010;2:76–81.

18. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*. 2011;20:359–68.
19. Pal S, Nag Chaudhari AK. Preliminary studies on the antiinflammatory and analgesic activities of *Bryophyllum pinnatum*. *Med Sci Res*. 1989;17:561–2.
20. Pal S, Nag Chaudhari AK. Studies on the Anti-Ulcer activity of a *Bryophyllum pinnatum* leaf extract in experimental animals. *J Ethnopharmacol*. 1991;33:97–102.
21. Galli R, Luisi M, Pizzanelli C, Monteleone P, Casarosa E, Iudice A, et al. Circulating levels of allopregnanolone, an anticonvulsant metabolite of progesterone, in women with partial epilepsy in the postcritical phase. *Epilepsia*. 2001;42:216–9.
22. Frye CA, Rhodes ME, Walf A, Harney J. Progesterone reduces pentylenetetrazol-induced ictal activity of wild-type mice but not those deficient in type I 5 α -reductase. *Epilepsia*. 2002;43:14–7.
23. Aragão GF, Carneiro LMV, Juniora APF, Bandeira PN, Lemos TLG, Viana GS. Evidence for excitatory and inhibitory amino acids participation in the neuropharmacological activity of alpha- and beta-amyrin acetate. *Open Pharmacol J*. 2009;9–16.
24. Aragão GF, Carneiro LMV, Juniora APF, Vieira LC, Bandeira PN, Lemos TLG. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl). *Pharmacol Biochem Behav*. 2006;85: 827–34.
25. Subarnas A, Tadano T, Nakahata N, Arai Y, Kinemuchi H, Oshima Y, et al. A possible mechanism of antidepressant activity of beta-amyrin palmitate isolated from *Lobelia inflata* leaves in the forced swimming test. *Life Science*. 1993;52:289–96.