

## 3-Butil-isobenzofuranona: un compuesto aislado de *Apium graveolens* con actividad anticonvulsivante

Jennie A. Cardozo, Raimudo Braz-Filho\*, Javier Rincón-Velandia\*\*1 y Mario F. Guerrero-Pabón\*\*2

### Resumen

El compuesto 3-Butil-isobenzofuranona se aisló de los frutos de *Apium graveolens* luego de procesos cromatográficos y se identificó por análisis de I.R., <sup>1</sup>H-NMR y <sup>13</sup>C-RMN. Se realizó el fraccionamiento fitoquímico bioguiado a partir del extracto etanólico seco con cloroformo, hexano y una mezcla de metanol-agua (1:1). El extracto clorofórmico obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluentes hexano, cloroformo y metanol. De ella se obtuvo una fracción que se caracterizó por espectroscopia IR, que a su vez se sometió a purificación por MPLC arrojando el compuesto aromático mencionado. 3-Butil-isobenzofuranona mostró un índice de protección de 89%, comparable al observado con fenitoína sódica en el modelo de convulsión máxima inducida por descarga eléctrica en ratones. Estos resultados sugieren que 3-Butil-isobenzofuranona podría constituirse en fuente potencial para la obtención de nuevas alternativas farmacológicas basadas en productos naturales, en el tratamiento de las crisis tónico clónicas generalizadas en el humano.

**Palabras clave:** 3-Butil-isobenzofuranona - *Apium graveolens* - Convulsión inducida por electroshock - fraccionamiento bioguiado.

### Summary

#### 3-Buthyl-isobenzofuranone: a compound isolated from *Apium graveolens* with anticonvulsant activity

3-buthyl-isobenzofuranone was isolated from fruits of *Apium graveolens* L., after bioguided fractionation of the ethanol extract. The compound was obtained and identified by m-p <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic studies following to dried extract treatment with chloroform, hexane and a mixture of methanol/H<sub>2</sub>O (1:1). Chloroformic fraction was submitted to CCD eluting with hexane, chloroform and methanol. 3-buthyl-isobenzofuranone showed highly effective protection against maximal electroshock seizures in mice (89 % protection), suggesting that it could be a potential source of anticonvulsant drug for the treatment of tonic clonic seizures in humans.

**Key words:** 3-buthyl-isobenzofuranone - *Apium graveolens* - Maximal electroshock seizures - Bioguided fractioning.

### Introducción

Los frutos o extractos de frutos de *Apium graveolens* L. (Apiacea), conocido popularmente como apio, son utilizadas etnobotánicamente como

saborizantes y para fines medicinales como: sedantes, anticonvulsivantes, antirreumático, para

Recibido para evaluación: mayo 27 de 2005

Aceptado para publicación: julio 29 de 2005

\* Universidad Estadual Norte Fluminense, Campos, Brasil.

\*\* Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, AA. 14490, Bogotá, Colombia

1 E-mail: jrinconv@unal.edu.co

2 E-mail: mfguerrero@unal.edu.co

tratamiento del asma y la bronquitis y combinada con otras plantas para la reducción de la presión sanguínea (1-3). Algunos compuestos nitrogenados obtenidos de las semillas de *Apium graveolens* han sido reportados como principios con actividad antiinflamatoria y más recientemente han sido estudiadas las actividades antioxidante e inhibitoria de ciclooxigenasa y topoisomerasa (3,4). En un trabajo preliminar se reportó que un derivado sintetizado, tomando como referencia el 3-n-butiltalido aislado de los frutos de apio, fue el más potente de los compuestos estudiados en el bloqueo de las contracciones inducidas por electroshock (5). Las actividades antinociceptiva y antiinflamatoria de extractos de estos mismos frutos fueron confirmadas en los ensayos de convulsiones inducidas con ácido acético, en el ensayo de placa caliente y en ensayo de supresión del edema inducida por carragenina (6,7) y de igual forma fue reportado la actividad antihepatotóxica del extracto metanólico (8). Recientemente se ha estudiado el mecanismo de acción vasodilatador de la apigenina aislada de *A. graveolens* (9).

Los estudios químicos en los frutos de esta especie vegetal han revelado metabolitos de diferentes grupos biosintéticos. Se ha reportado la presencia de cumarinas, furanocumarinas libres y como glucósidos, ácido miristícico, entre otros (10-15). Los componentes volátiles de *A. graveolens* han sido estudiados encontrándose una proporción de 46% de hidrocarburos monoterpenicos y 42.3 % de ftalidos. Los principales componentes fueron  $\gamma$ -terpineno y 3-butil- 4,5-dihidroftalido. El 3-butiltalido se encontró en una proporción de 2.5% (16). Otro estudio reportó que hay tres constituyentes que representan aproximadamente el 70 % del total de volátiles (apiol *ca* 23 %, 3-butiltalido *ca* 22% y 3-butiltetrahidroftalido *ca* 24%) (17). Por medio de cultivos celulares de tejidos de *A. graveolens* se han obtenido

diferentes tipos de esteroides (18,19) y se han realizado estudios relacionados con la biosíntesis de furanocumarinas (20). Recientemente se han estudiado los constituyentes polares del extracto metanólico de estos frutos encontrándose cinco glicósidos de sesquiterpenos, tres glicósidos de ftalidos, seis glicósidos aromáticos, dos glicósidos de norcarotenoides y un glicósido de lignana (3).

Estudios previos han mostrado actividad anticonvulsivante del extracto etanólico de los frutos, así como de algunas de sus subfracciones (21,22).

En este trabajo se describe el aislamiento e identificación de 3-Butil-isobenzofuranona, cuya elucidación estructural se obtuvo por análisis de IR y RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  uni- y bi-dimensionales, después del fraccionamiento fitoquímico bio guiado a partir del extracto etanólico.

Habida cuenta de que un buen número de trastornos epilépticos aún permanecen refractarios a la farmacoterapia disponible en el momento (23), este compuesto podría contribuir en la obtención de nuevas alternativas para el tratamiento de uno de los trastornos del sistema nervioso central con mayor morbilidad en nuestro medio (24).

## Metodología

### Obtención y caracterización del extracto

El extracto de los frutos de *Apium graveolens* (variedad Tall Utah) se preparó por percolación con etanol del 96% a partir de 458 g de material vegetal seco y posteriormente se concentró a presión reducida en rotavapor.

## Extracción y aislamiento

El extracto etanólico seco (EE, 19.3 g) se sometió a partición con cloroformo y agua en un embudo de separación, las fases se separaron después de lo cual se obtuvo una fracción clorofórmica (EC1, 13.0 g). Este extracto se secó con sulfato de sodio anhidro, se concentró y se fraccionó con hexano y una mezcla de metanol-agua 1:9. La fracción metanólica acuosa se concentró y posteriormente se sometió a una segunda partición con cloroformo obteniendo una segunda fracción clorofórmica (EC2, 4.45 g) y un fracción proveniente de la mezcla metanol-agua 1:1. De cada uno de los extractos se tomó una muestra para realizar el ensayo de actividad anticonvulsivante.

El extracto clorofórmico (EC2), detectado como la fracción más activa en los ensayos de actividad anticonvulsivante realizados, se purificó por cromatografía en columna en sílica gel (55 g). Los solventes y/o mezclas de solventes utilizados para la elusión de la columna fueron hexano, cloroformo y metanol. Por cromatografía en capa delgada las fracciones obtenidas fueron reunidas en 10 grupos. Los grupos de fracciones 1, 3 y 10 fueron ensayados para determinar su actividad anticonvulsivante y la fracción 1, más activa, fue utilizada para purificación por MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography). Una muestra de la fracción (803 mg) se absorbió en 2.5 g de sílica gel 60F y la columna fue eluida con hexano, cloroformo y metanol puros y en mezclas. Las fracciones obtenidas fueron ensayadas biológicamente y la fracción más activa (FR1) fue caracterizada y utilizada para hacer los espectros de IR y RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  uni y bidimensionales.

## Pruebas biológicas

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 de Colombia. 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 semillas (EE, 500 mg/kg), difenilhidantoína (20 mg/kg), vehículo (glicerina 10%, polipropilenglicol 10%, Tween® polisorbato 80 1%, Agua 79%) y los compuestos purificados del extracto clorofórmico (500 mg/kg). El volumen de administración fue de 0.01 mL/g de peso. Se utilizaron entre 8 y 10 animales por grupo.

Los animales se dejaron sin alimento 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 y 60 Hz (25) con una duración de 30 milisegundos. 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 (25). 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 Colombia.

## Análisis de datos y estadística

Se siguió una distribución de tratamientos completamente al azar. Los tratamientos correspondientes fueron: el extracto etanólico

total de las frutas de *Apium graveolens*, fenitoína sódica (20 mg/kg, po, como patrón); el vehículo (0.01 mL/g de peso como control) y el compuesto activo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de Chi<sup>2</sup>, indicada cuando la variable de medición es de tipo cuantitativa (26). El nivel de significancia escogido fue de 0.05. Para el análisis de los datos se utilizaron los programas EXCEL MS-97 y OS4.

## Resultados y discusión

### Identificación del compuesto

El análisis cromatográfico de la subfracción clorofórmica mostró una sustancia en mayor pro-

porción que se caracterizó por espectroscopia IR permitiendo detectar la presencia de una molécula aromática (3050 cm<sup>-1</sup>, 1400-1600 cm<sup>-1</sup>), con grupos metileno y metilo (2962 cm<sup>-1</sup>, 2853 cm<sup>-1</sup>) y carbonilo (1760 cm<sup>-1</sup>).

La molécula, con mayor actividad, aislada del extracto clorofórmico, muestra en el espectro de RMN <sup>1</sup>H la presencia de una molécula que tiene una porción aromática  $\delta_H$  7.59-7.89 ppm y otra alifática  $\delta_H$  0.86-2.07 ppm. Adicionalmente se observa un doblete característico de hidrógeno carbinólico en  $\delta_H$  5.63 (dd, J = 7.7, 3.7). La región de hidrógenos aromáticos muestra un patrón de sustitución característicos de un anillo aromático disustituido en orto que presenta cuatro hidrógenos distintos acoplando entre sí con una constante

**Tabla 1.** Datos de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C para 3-butilisobenzofuranona, aislada de las semillas de *Apium graveolens*, CDCl<sub>3</sub>, 400 Mhz.

|                 | $\delta_C$ | $\delta_H$         | $^2J_{CH}$ | $^3J_{CH}$ |
|-----------------|------------|--------------------|------------|------------|
| C               |            |                    |            |            |
| 1               | 125.29     | —                  |            | H-3, H-6   |
| 2               | 150.18     |                    |            | H-4, H-6   |
| 7               | 169.91     | —                  | H-8        | H-6        |
| CH              |            |                    |            |            |
| 3               | 122.56     | 7.68(d,7.7)        |            | H-5        |
| 4               | 134.32     | 7.78(dt, 7.7)      |            | H-6        |
| 5               | 129.17     | 7.59(t,7.7)        |            | H-3        |
| 6               | 124.87     | 7.82(dd,7.7,3.7)   |            | H-4        |
| 8               | 81.09      | 5.63(dd,7.7,3.7)   |            | H-3        |
| CH <sub>2</sub> |            |                    |            |            |
| 9               | 33.49      | 2.07(m)<br>1.70(m) |            |            |
| 10              | 26.41      | 1.35-1.27          | H-9b       | H8, 3H-12  |
| 11              | 21.85      | 1.35-1.27          | 3H-12      | H-9b       |
| CH <sub>3</sub> |            |                    |            |            |
| 12              | 13.78      | 0.86(t,7.0)        |            |            |

de acoplamiento de 7.7 Hz. La señal que aparece en  $\delta_H$  5.63 ppm se observa como un doblete y siendo carbinólico es muy posible que tenga un  $-\text{CH}_2$  vecino. La porción de hidrógenos alifáticos presenta la característica típica de una cadena alifática normal. La señal a campo más alto  $\delta_H$  0.86 ppm es un tripleto y por lo tanto tiene el aspecto de corresponder a un metilo terminal de una cadena carbonada.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  indica la presencia de una molécula pura con los carbonos que coinciden con lo descrito para el espectro de hidrógeno. Se detectan claramente un carbono de carbonilo de ester  $\delta_C$  167.91 ppm y seis hidrógenos aromáticos diferentes, dos de los cuales son cuaternarios  $\delta_C$  150.18 ppm y 125.29 ppm y los otros cuatro metínicos  $\delta_C$  134.32, 129.17, 124.87 y 122.56. Adicionalmente en la región de carbonos carbinólicos se determina claramente la presencia de un carbono metínico y en la región de carbonos alifáticos se presentan cuatro carbonos, tres metilénicos y uno metínico. Todas las atribuciones hechas se realizaron teniendo en cuenta el espectro HMQC.

El espectro de HMBC permite establecer una serie de correlaciones entre carbonos e hidrógenos a dos y tres enlaces importantes para confirmar la estructura de la molécula. Las interacciones a dos enlaces y a tres enlaces, observados en la Figura 1, fueron fundamentales para proponer inequívocamente la estructura del compuesto que está presente en la fracción más activa como anticonvulsivante obtenida de los frutos de *H. graveolens*. En la Tabla 1 se resumen los desplazamientos y las interacciones observadas para la molécula aislada.

### Actividad anticonvulsivante

En la Figura 2 se observan los porcentajes de protección de los tratamientos utilizados. Se confirma la notable protección conferida por el

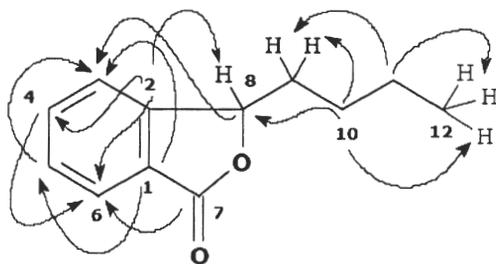
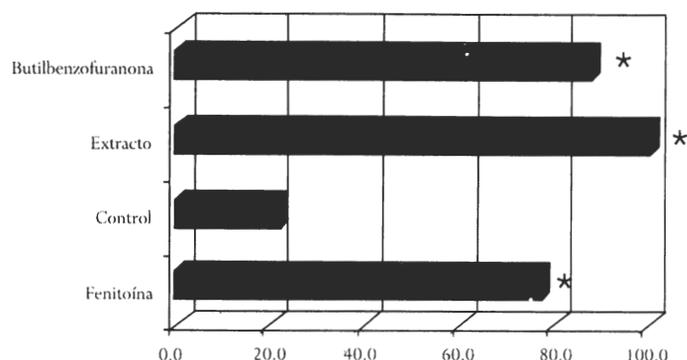


Figura 1. Estructura molecular de 3-butylisobenzofuranona.

patrón, fenitoína sódica (77% versus 22% del control), pero sobresale el extracto etanólico con una protección total (100%). Así mismo, se resalta la protección obtenida con la 3-butylisobenzofuranona (88%) molécula determinada como la más activa en el estudio bioguiado.

Estos resultados confirman la actividad anticonvulsivante de 3-butylisobenzofuranona y dado que es el principal constituyente de la fracción clorofórmica (23.26% del extracto etanólico) más activa, necesariamente juega un papel crucial en los efectos conferidos por el extracto total. No obstante no se descarta la presencia de otros compuestos activos si se tiene en cuenta que la actividad del extracto total es aún superior que la del compuesto.

3-butylisobenzofuranona ya ha sido descrito previamente (27). Actualmente se estudia como agente neuroprotector por sus efectos antiapoptóticos (28) y antiisquémicos (29). En los estudios efectuados con el extracto etanólico se observó, durante los ensayos preliminares, que su actividad anticonvulsivante era mayor si se evaluaba dentro de la primera hora. Posteriormente el índice de protección decaía notablemente. Si este fuera el caso de 3-butylisobenzofuranona, el potencial farmacológico de este compuesto como tal quedaría en entredicho, más por razones de orden farmacocinética que farmacodinámica. Es posible que el agente se biotransforme rápidamente y dado



**Figura 2.** Porcentaje de protección obtenido con 500 mg/kg, vo, del extracto etanólico de los frutos de *Apium graveolens*, el compuesto 3-butilbenzofuranona y fenitoína sódica comparados con el vehículo (n:8-10, Chi<sup>2</sup>). \*  $p \leq 0.05$  con respecto al control.

que los trastornos epilépticos son de carácter crónico, es necesario que una sustancia, para que sea verdaderamente efectiva, alcance niveles razonablemente sostenidos. En cualquier caso, la molécula 3-butylisobenzofuranona podría servir de base para estudios de semisíntesis y de estructura actividad orientados a preservar su actividad anticonvulsivante y a la vez prolongar su vida media.

Los trastornos epilépticos configuran un síndrome entre los que se destacan aquellos que generan convulsiones tónicas clónicas generalizadas. Sustancias tipo benzodiacepinas previenen las convulsiones por electroshock pero a la vez, también las inducidas experimentalmente con pentilentetrazol (25,30). En estudios previos efectuados con el extracto de semillas de *Apium graveolens* se observó protección frente al electroshock, mas no frente a pentilentetrazol. Si 3-butylbenzofuranona, aislado de estas semillas, conserva este perfil, lo cual es muy probable, no sería muy posible entonces que su actividad tenga que ver con mecanismos de tipo gabaérgico. Cabría

entonces considerar por ejemplo, interacciones de algún tipo sobre canales de sodio tal como sucede con agentes como carbamazepina y fenitoína sódica que protegen contra el electroshock, mas no contra pentilentetrazol (25,30).

Por otra parte también conviene establecer la relación entre los mecanismos neuroprotectores tipo antiapoptosis y los anticonvulsivantes de 3-butylbenzofuranona. Está documentado que este compuesto disminuye la activación de caspasa-3 e inhibe la fragmentación del DNA tras isquemia cerebral inducida experimentalmente (28). Fenómenos isquémicos asociados con degeneración neuronal están vinculados con trastornos epilépticos de difícil manejo como la Epilepsia del Lóbulo Temporal (31). Esto abriría nuevas perspectivas en la búsqueda de alternativas farmacológicas para las epilepsias refractarias a la medicación convencional.

En conclusión 3-butylbenzofuranona, aislado de los frutos de *Apium graveolens*, posee actividad anticonvulsivante en el modelo de crisis inducidas por electroshock en ratones. Se adelantan estudios con el fin de discriminar su perfil farmacodinámico y farmacocinética y para hacer propuestas con relación a modificaciones estructurales y de actividad anticonvulsivante de derivados.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Proyecto Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas Medicinales Colombianas, a Colciencias, al Proyecto X-8 del CYTED, a la División Nacional de Investigación de la Universidad Nacional (Dinain) y al

Dpto. de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

## Bibliografía

1. H. García, "Flora Medicinal de Colombia", Bogotá, Colombia, 1975, T. II, p.329.
2. H. Chang y P. But, "Pharmacology and Applications of Chinese Material Medica", World Scientific, 1987. TI, p.579.
3. K. Junichi, I. Toru y S. Mitsuru, Polar constituents of celery seed, *Phytochem.*, **64**, 1003 (2003).
4. R.A. Momim y M.G. Nair, Antioxidant, cyclooxygenase and topoisomerase inhibitory compounds from *Apium graveolens* Linn. Seeds, *Phytomed.*, **9**, 312 (2002).
5. X.-M Li y J.-T. Zhang, ABP a new type of antiepileptic agent, *Eur. J. Pharmacol.*, **183**, 609 (1990).
6. A.H. Atta y A. Alkofahni, Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts, *J. Ethnopharmacol.*, **60**, 117 (1998).
7. K.A. MuhaNed, H.S. Ihsan, H.A. May-Nabi y A.I. Mudafar, *J. Ethnopharmacol.*, **26**, 163 (1989).
8. S. Anubha y S.S. Handa, Hepatoprotective activity of *Apium graveolens* and *Hygrophila auriculata* against paracetamol and thioacetamide intoxication in rats, *J. Ethnopharmacol.*, **49**, 119 (1995).
9. K. Feng.Nien, H. Tur.Fu y T. Che-Ming, Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta, *Biochim. Biophys. Acta*, **1115**, 69 (1991).
10. O. Ceska, S.K. Chaudhary, P.J. Warrington y M.J. Ashwood-Smith, Photoactive furanocoumarins in fruits of some Umbelliferae, *Phytochem.*, **26**, 165 (1986).
11. S.K. Garg, S.R. Gupta y N.D. Sharma, Apiumoside, a new furanocoumarin glucoside from the seeds of *Apium graveolens*, *Phytochem.*, **18**,1764 (1979).
12. S.K. Garg, S.R. Gupta y N.D. Sharma, Coumarins from *Apium graveolens* seeds, *Phytochem.*, **18**, 1580 (1979).
13. S.K. Garg, S.R. Gupta y N.D. Sharma, Apiumetin, a new furanocoumarin from the seeds of *Apium graveolens*, *Phytochem.*, **17**, 2135 (1978).
14. S.K. Garg, S.R. Gupta y N.D. Sharma, Minor phenolics of *Apium graveolens* seeds, *Phytochem.*, **18**, 352 (1979).
15. R. C. Beier, G.W. Ivie, E.H. Oertli y D.L. Holt, HPLC analysis of linear furocoumarins (psoralens) in healthy celery (*Apium graveolens*), *Food Chem. Toxicol.*, **21**, 163 (1983).
16. G. MacLeod y J.M. Ames, Volatile components of celery and celeriac, *Phytochem.*, **28**, 1817 (1989).
17. J.M. Alexander, J.M. Glesni y G. Subramanian, Volatile constituents of celery, *Phytochem.*, **27**, 373 (1988).
18. P.J. Yares, P.A. Haughan, J.R. Lenton y L.J. Goad, Four  $\Delta^5,7$ -Sterols from terbinafine treated celery cell suspension cultures, *Phytochem.*, **31**, 3051 (1992).
19. D. Lynne, R.D. Threlfall y L.G. Goad, The sterol composition of five pants species grown as cell suspension cultures, *Phytochem.*, **35**, 655 (1994).
20. S. Volker, P. Jörn y B. Wilhelm, Biosynthesis of furanocoumarins: mevalonate-independent prenylation of umbelliferone in *Apium graveolens*, *Phytochem.*, **50**, 1141 (1999).
21. M.F. Guerrero, C.L. Gracia y B. Meneses. Actividad anticonvulsivante del extracto de *Apium graveolens* L. en ratones, *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, **26**, 7 (1997).

22. J. Rincón, M.F. Guerrero, J.A. Cardozo y R. Pinzón, Seguimiento bioguiado de la actividad anticonvulsivante del extracto etanólico de los frutos de *Apium graveolens*, *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, **32**, 141 (2004).
23. D. Schmidt, The clinical impact of new antiepileptic drugs after a decade of use in epilepsy, *Epilepsy Research*, **50**, 21 (2002).
24. M. Arcos-Burgos, L.G. Palacio, I. Jiménez, N. Pineda, O. Mora, J.L. Sánchez, M. Jiménez, A. Muñoz, V. Brancolini, M. Devoto y A. Ruiz-Linares, Genealogías antioqueñas en las que la epilepsia idiopática presenta conglomeración familiar, *Rev. de Neurol.*, **26**, 50 (1998).
25. E.A. Swinyard, J.H. Woodhead, H.S. White y M.R. Franklin. "Experimental selection, quantification, and evaluation of anticonvulsants. Antiepileptic Drugs", 3<sup>rd</sup> ed., Ed. R. Levy, New York, 1989. pp. 85-102.
26. S. Siegel. "Estadística no paramétrica", 3<sup>a</sup> ed., Trillas, México, 1991. p.120.
27. J.S. Yang y Y.W. Chen, Isolation and identification of the anticonvulsive constituents of *Apium graveolens*, *Chin. Pharmacol. Bull.*, **19**, 670 (1984).
28. Q. Chang y X-L. Wang, Effects of chiral 3-n-butylphthalide on apoptosis induced by transient focal cerebral ischemia in rats, *Acta Pharmacol. Sin.*, **24**, 796 (2003).
29. J.T. Zhang, New drugs derived from medicinal plants, *Therapie*, **57**, 37 (2002).
30. H.S. White, Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of the established and newer antiepileptic drugs, *Epilepsia*, **40** Suppl. 5, 2 (1999).
31. J.O. McNamara, Emerging insights into the genesis of epilepsy, *Nature*, **399** Suppl. A15, 6738 (1999).