

Efectos sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y fracciones de *Hygrophila tyttha* Leonard

Sandra Y. Ariza, Javier Rincón y Mario F. Guerrero¹

¹ Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A.A. 14490, Bogotá D.C., Colombia. Correo electrónico: mfguerrerop@unal.edu.co

Recibido para evaluación: mayo 30 de 2006

Aceptado para publicación: junio 20 de 2006

RESUMEN

Se evaluó en ratones albinos ICR el perfil de actividad que sobre el sistema nervioso central ejercen el extracto etanólico y las fracciones acuosa, clorofórmica, metanólica y hexánica obtenidas de *Hygrophila tyttha* (Acanthaceae. NV: amansamachos). Para tal fin se utilizaron pruebas destinadas a detectar posible actividad ansiolítica (laberinto en cruz elevado), antidepresiva (nado forzado), anticonvulsivante (pentilentetrazol, electrochoque) e hipnótica (potenciación de sueño inducido por pentobarbital). Se efectuó un estudio fitoquímico bioguiado para determinar las fracciones con mayor actividad. La fracción clorofórmica, a juzgar por los altos índices de protección obtenidos en el modelo del *electroshock* (90%) y el patrón de respuesta mostrado en la prueba del *laberinto en cruz elevado* (comparable a diazepam), posiblemente aglutina la mayor proporción de metabolitos activos. Según el análisis fitoquímico, éstos pueden corresponder a compuestos tipo cumarinas, flavonoides, esteroides y/o terpenos y saponinas. A la luz de estos resultados se encuentra justificación al uso etnobotánico de esta especie y se destaca el potencial de *Hygrophila tyttha* como fuente natural de posibles compuestos con aplicación terapéutica en trastornos de ansiedad y convulsivos.

Palabras clave: acanthaceae, *Hygrophila tyttha*, amansamachos, ansiolítico, anticonvulsivante.

SUMMARY

EFFECTS OF THE ETHANOLIC EXTRACT FRACTIONS OBTAINED FROM *Hygrophila tyttha* LEONARD ON THE CNS

The central nervous effects elicited by the ethanolic extract and the aqueous, chloroformic, methanolic and hexanic fractions obtained from *Hygrophila tyttha* were evaluated in ICR mice. To achieve this objective, tests to prove anxiolytic (elevated

plus-maze), antidepressant (forced swimming), anticonvulsant (pentylene-tetrazol, electroshock), and hypnotic (pentobarbital induced sleep) activity were applied. A bioguided phytochemical study was carried out to determine the most active fractions. According to the high protection scores obtained by the electroshock model (90%) and the activity registered by the *elevated plus maze* (comparable to diazepam), the chloroformic fraction possibly contains the main active compounds, such as coumarins, flavonoids, steroids and/or terpenoids and saponins, according to the phytochemical analyses. These results support the ethnobotanical use and the therapeutic potential of *Hygrophila tytttha* as a natural source of therapeutic compounds for the treatment of central disorders like anxiety and seizures.

Key words: Acanthaceae, *Hygrophila tytttha*, *amansamachos*, anxiolytic, anticonvulsant.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud el 80% de la población mundial depende en forma directa o indirecta de las plantas medicinales para su atención primaria en salud (1). La idea generalizada de una menor incidencia de efectos secundarios, el costo accesible y una aparente efectividad en los tratamientos son, entre otros, los factores que han influido en la creciente demanda de productos naturales con fines medicinales. Por encima de estas consideraciones, el hecho de constituir una fuente química tan vasta y diversa explica en buena parte su aporte permanente de nuevos fármacos al arsenal terapéutico (2, 3).

Por otra parte, tanto los trastornos de ansiedad como los convulsivos constituyen los problemas psiquiátricos y neurológicos de mayor prevalencia en nuestro medio (4, 5). Sin duda la farmacoterapia, además de la psicoterapia, han logrado importantes progresos en muchos casos, pese a lo cual, persiste un buen número de pacientes refractario a la medicación. Adicionalmente en no pocos casos se presentan importantes efectos adversos. Esto hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas, una de cuyas fuentes pueden ser los productos naturales.

Uno de ellos es la especie *Hygrophila tytttha* Leonard (Acanthaceae), que con fines ansiolíticos y como parte de rituales mágicos se utiliza popularmente en Colombia, con el nombre vulgar de *amansamachos*, *amansatoros* o *amansaguapos*. Es la misma denominación que en otras regiones de América como Cuba y México se da a otra especie: *Justicia pectorales*, utilizada para los mismos fines. Este estudio establece el perfil sobre el sistema nervioso central de *Hygrophila tytttha* en pruebas de tamizado utilizadas ampliamente en neurofarmacología experimental por su valor predictivo. Con ello se da soporte a su uso etnobotánico y se aporta información sobre su potencial terapéutico.

METODOLOGÍA

Preparación del extracto

Diez kilos de la parte aérea de la planta (tallos y hojas) se recolectaron en el municipio de Palmira (Valle). Un ejemplar se depositó en el Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional, bajo el código COL 511937, para su respectiva clasificación taxonómica. El material fresco se secó en estufa de aire circulante a una temperatura de 50 °C durante 72 horas y luego se trituró con un molino de discos. El polvo obtenido se sometió a percolación con etanol 96% (4L). El percolador se dejó en reposo durante dos días al cabo de los cuales se retiró el solvente con un goteo aproximado de 20/minuto. El extracto obtenido se filtró y concentró en un rotavapor a temperatura ≤ 40 °C. Finalmente se almacenó en una cápsula de porcelana que se introdujo en un desecador al vacío a temperatura ambiente. Una porción del extracto se destinó a las pruebas biológicas, otra a la realización del análisis fitoquímico preliminar (6) y la última al fraccionamiento fitoquímico.

Fraccionamiento fitoquímico

Setenta gramos del extracto etanólico seco se destinaron al fraccionamiento fitoquímico. En la primera partición se empleó una proporción de $\text{CHCl}_3 - \text{H}_2\text{O}$ (1:1), para obtener una fracción clorofórmica y una acuosa. La primera se secó con sulfato de sodio y se concentró en evaporador rotatorio. La segunda se liofilizó. Ambas se evaluaron en la prueba de *laberinto en cruz elevado* para detectar posible actividad ansiolítica. La fracción clorofórmica (que arrojó resultados positivos), se sometió a una nueva partición con hexano y una mezcla de $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ 9:1, obteniendo así una fracción hexánica y una metanólica que se concentraron en evaporador rotatorio (figura 1). Adicionalmente la fracción metanólica se sometió a liofilización para eliminar completamente el agua remanente (7).

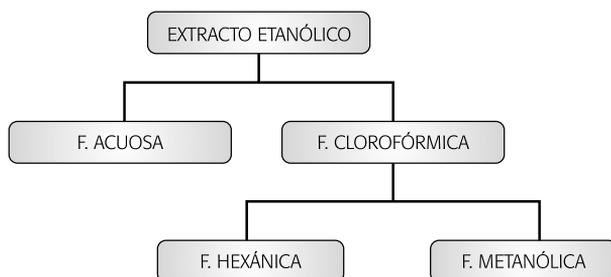


Figura 1. Diagrama general del fraccionamiento fitoquímico.

Animales de experimentación

Se emplearon ratones machos ICR de 25 a 35 g de peso, criados y mantenidos en el Bioterio del Departamento de Farmacia, con ciclos de 12h luz/12h oscuridad, temperatura 21 ± 1 °C, agua y comida a libre demanda.

Condiciones de experimentación

En cada una de las pruebas se utilizaron 10 ratones por cada tratamiento. El extracto y/o las fracciones se administraron por vía oral después de 6 horas de ayuno, y una hora después de administrados los tratamientos se procedió a la realización del ensayo. Una vez finalizadas las pruebas, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. El vehículo utilizado para dispersar el extracto y las fracciones así como para la administración de los animales del grupo control fue la mezcla de: glicerina 10%, propilenglicol-400 3%, polisorbato-80 2% y agua destilada 85%, con un volumen de 0.01 mL/g de peso.

Test de Irwin: con el fin de determinar el perfil neurofarmacológico del extracto se realizó el Test de Irwin para lo cual se evaluaron 9 dosis (7, 15, 30, 60, 125, 250, 500, 1.000 y 2.000 mg/Kg) utilizando 3 animales por cada dosis. El comportamiento de los animales se observó a la ½, 1, 2, 6 y 24 horas posaplicación.

Prueba del suelo agujereado: este ensayo se utilizó para clasificar los animales de acuerdo con su grado basal de ansiedad como paso previo para la aplicación de la prueba del *laberinto en cruz elevado*. El método fue introducido en 1962 por Boisser y Simón y está diseñado para medir la respuesta de un animal a un ambiente no familiar. Se utiliza una caja de acrílico transparente (50 x 50 x 30 cm) a 10 cm de altura, con 9 orificios de 2 cm de diámetro ubicados de manera equidistante. El ensayo se realiza colocando el animal en el centro de la plataforma y se evalúa la actividad locomotora durante 5 minutos registrando el número de veces que el animal espía los orificios. Se considera "espíar" que el ratón introduzca la cabeza dentro de los agujeros hasta el nivel de las orejas. El número de exploraciones guarda una relación inversa con el estado de ansiedad del animal (8, 9).

Laberinto en cruz elevado: uno de los modelos más utilizados para determinar posible actividad ansiolítica es el *laberinto en cruz elevado*. Consiste en una plataforma elevada a 37,5 cm del piso que posee cuatro brazos de (30 x 5 cm), 2 de los brazos son abiertos y opuestos entre sí y los otros dos son cerrados, estos brazos están conectados por una zona central de (5x5 cm). Las paredes de los brazos cerrados están confeccionados en acrílico transparente de 21 cm, mientras que en los brazos abiertos sólo hay un delgado borde de 0,25 cm para tratar de impedir que el ratón se caiga del laberinto (10). El laberinto debe estar

ubicado en un cuarto con luz roja (15W) que ilumine de igual forma tanto las áreas abiertas como las cerradas.

Se coloca el animal en el centro de la plataforma, mirando hacia uno de los brazos cerrados y su comportamiento se observa durante 5 min. Se registra el número de veces que el animal ingresa a la zonas abiertas y a las zonas cerradas, al igual que el tiempo de permanencia en estas zonas. Un aumento en la frecuencia y tiempo de permanencia en las zonas abiertas es indicativo de efecto ansiolítico (8, 11, 12). El patrón utilizado fue diazepam 0,5 mg/Kg, ip.

Electrochoque: es uno de los modelos más antiguos que existe para desencadenar crisis epilépticas (13). En este modelo las convulsiones se inducen por la aplicación de una descarga eléctrica suficiente para llegar al cerebro, producir la convulsión y extenderse a través del sistema nervioso central. Las convulsiones producidas por electrochoque son de tipo tónico clónicas generalizadas. La corriente eléctrica se aplica en la córnea, después de la instilación de solución salina normal, para facilitar la conducción eléctrica. Se registra la presencia de convulsiones para determinar posteriormente el factor de protección que ofrece el tratamiento. El bloqueo del componente extensor tónico de las patas traseras indica un efecto anticonvulsivante (14). El patrón empleado fue Fenitoína sódica 20 mg/Kg vía oral.

Pentilentetrazol: una hora después de administrados los tratamientos el PTZ se administra a los ratones por vía subcutánea en una dosis de 80 mg/Kg para inducir convulsiones de tipo clónico. Éstas se definen como episodios de espasmos musculares repetitivos que duran por lo menos 5 segundos. Se administra el PTZ y se observa la presencia de convulsiones, durante 30 minutos después de la administración. El bloqueo de los episodios convulsivos indica un efecto anticonvulsivante (14). Patrón utilizado: clonazepam, 0.5 mg/Kg vía oral.

Nado forzado: el modelo del nado forzado, propuesto por Porsolt en 1987 y modificado por Detke en 1995 es uno de los más ampliamente utilizados, por su valor predictivo, ya que posee una alta capacidad para detectar actividad antidepresiva en un gran número de sustancias (15). Sin embargo, tiene algunas limitaciones ya que pueden llegar a presentarse falsos positivos. El instrumento que se utiliza para el ensayo con ratones, consiste en un cilindro de 35 cm de altura x 24 cm de diámetro, que contiene 13,5 cm de agua (8). La duración de la prueba es de 5 min y se registra el tiempo de latencia el cual corresponde al tiempo de nado del animal desde el momento en que se le coloca sobre la superficie del agua hasta que se queda inmóvil, y tiempo de inmovilidad. Se considera inmovilidad cuando el animal realiza apenas los movimientos mínimos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua. Un aumento en el tiempo

de latencia y una disminución en el tiempo de inmovilidad de los animales son indicativos de actividad antidepressiva (16).

Sueño inducido con pentobarbital: en este ensayo se determina la actividad hipnótica administrando a los animales un inductor del sueño como el pentobarbital sódico después de haber administrado los tratamientos. Se observa el tiempo de latencia, es decir el tiempo que tarda el animal en perder el reflejo postural así como el tiempo de duración del sueño el cual se considera hasta cuando el animal es capaz de incorporarse totalmente. El registro se efectúa durante por lo menos 3 horas consecutivas después de la inyección del pentobarbital. En general las sustancias con actividad hipnótica reducen el tiempo de latencia y aumentan el tiempo de duración del sueño. El patrón empleado fue pentobarbital, 40 mg/Kg ip.

Diseño experimental y análisis estadístico

En el análisis estadístico se emplearon las pruebas: en los modelos de *laberinto en cruz elevado*, *nado forzado* y *sueño inducido por pentobarbital* se aplicó un análisis de varianza simple (ANOVA) y un análisis de comparaciones múltiples (Tukey) para determinar los tratamientos responsables de las diferencias significativas. En los modelos de electrochoque y pentilentetrazol se aplicó la prueba estadística de Chi cuadrado. Los datos fueron procesados mediante los programas Excel, Minitab y SPSS.

RESULTADOS

Estudio fitoquímico

El análisis fitoquímico preliminar aplicado al extracto etanólico permitió identificar mediante ensayos cualitativos, los grupos de metabolitos presentes en la especie. La presencia de éstos se confirmó realizando cromatografías en capa delgada. Dentro de estos metabolitos se destacan: cumarinas, flavonoides, esteroides y/o terpenos y saponinas. Con el fraccionamiento fitoquímico se obtuvieron 4 fracciones de diferente polaridad: acuosa, clorofórmica, metanólica y hexánica.

Estudio farmacológico

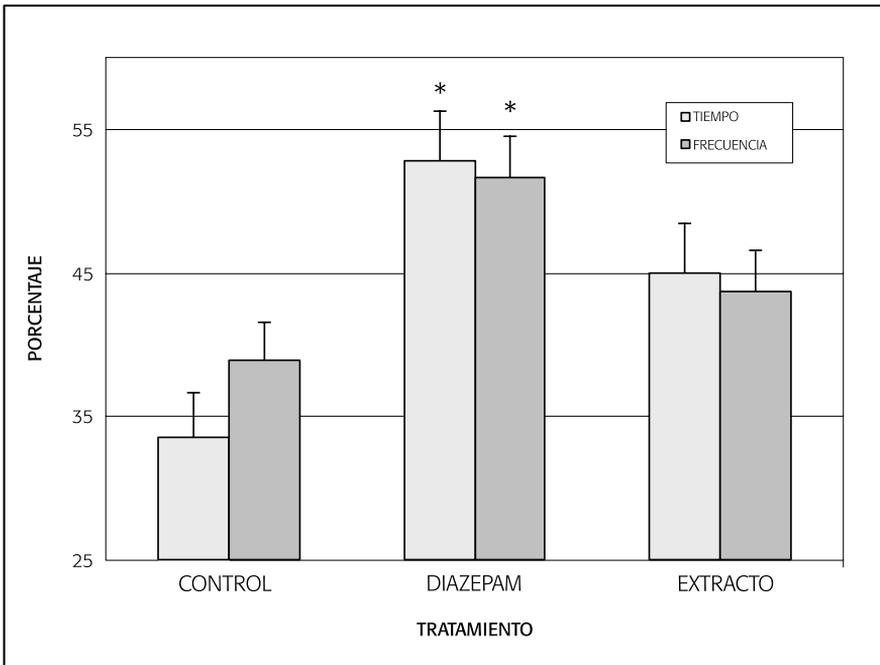
Test de Irwin: mediante esta prueba se pudo determinar que el extracto etanólico de *Hygrophila tytha* posee un efecto depresor sobre el sistema nervioso central. Con dosis superiores a 120 mg/k.o., se empezaron a evidenciar los primeros cambios en el patrón de comportamiento, tales como disminución de la actividad motora, leve disminución de la fuerza prensil y disminución del reflejo pineal y corneal. Con dosis de 1.000 y 2.000 mg/Kg se hicieron mucho más evidentes los signos de sedación. Estos cambios aparecieron entre los 30 minutos y las 2

horas posaplicación, hacia las 6 horas se observó una recuperación del comportamiento normal en los animales.

ENSAYOS BIOLÓGICOS REALIZADOS CON EL EXTRACTO ETANÓLICO

Modelo del laberinto en cruz elevado

Los resultados obtenidos con el extracto no presentan diferencias estadísticamente significativas; no obstante se observa cierta tendencia que debe ser confirmada con las fracciones obtenidas (figura 2).

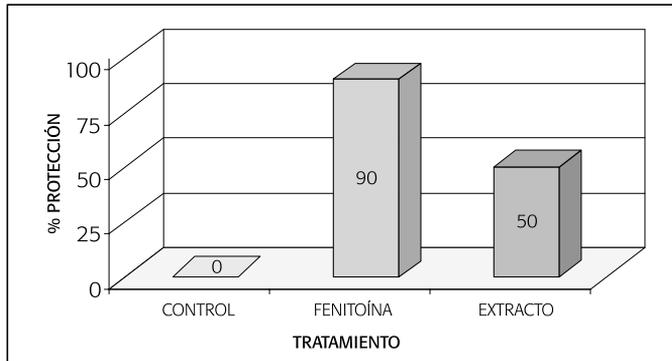


* $p < 0,05$ comparado con el grupo control.

Figura 2. Efecto del extracto etanólico de *Hygrophila tytttha* ($D_0 = 500$ mg/Kg v.o) y diazepam ($0,5$ mg/Kg, i.p) en la frecuencia de entrada y el tiempo de permanencia en las zonas abiertas del LCE, los datos se expresan como el promedio \pm (EMS).

Modelo del electrochoque

Los resultados muestran en el grupo tratado con el extracto, un porcentaje de protección contra la convulsión de 50%. Por esta razón esta actividad se siguió estudiando con las fracciones (figura 3).

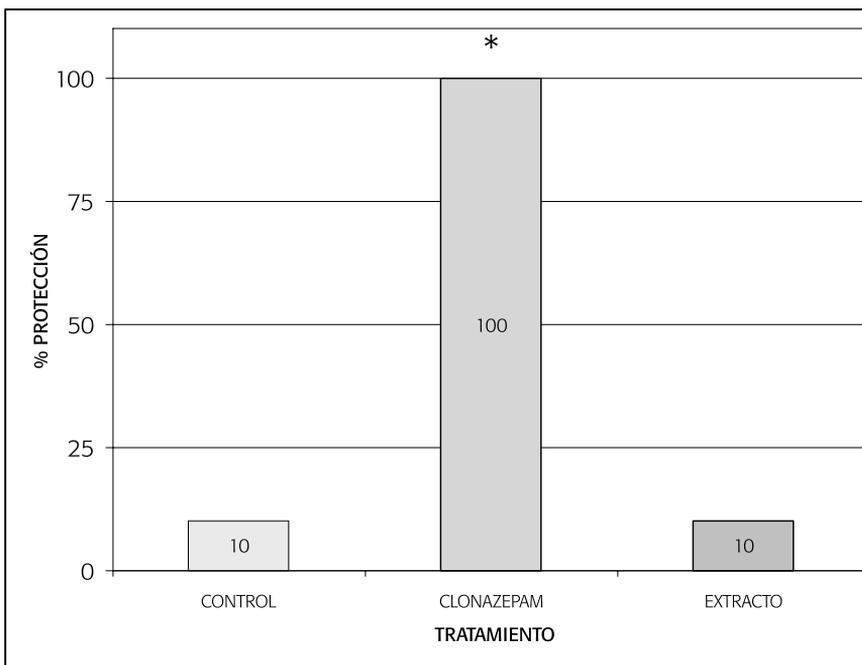


* $p \leq 0.05$, Chi^2 .

Figura 3. Efecto del extracto etanólico de *Hygrophila tytttha* (500 mg/kg, vo) y fenitoína (20 mg/Kg, vo) en el modelo de convulsión inducida por electrochoque en ratones.

Modelo del pentilentetrazol

La respuesta en este modelo es negativa. El comportamiento de los animales tratados con el extracto etanólico es similar al grupo control (figura 4).

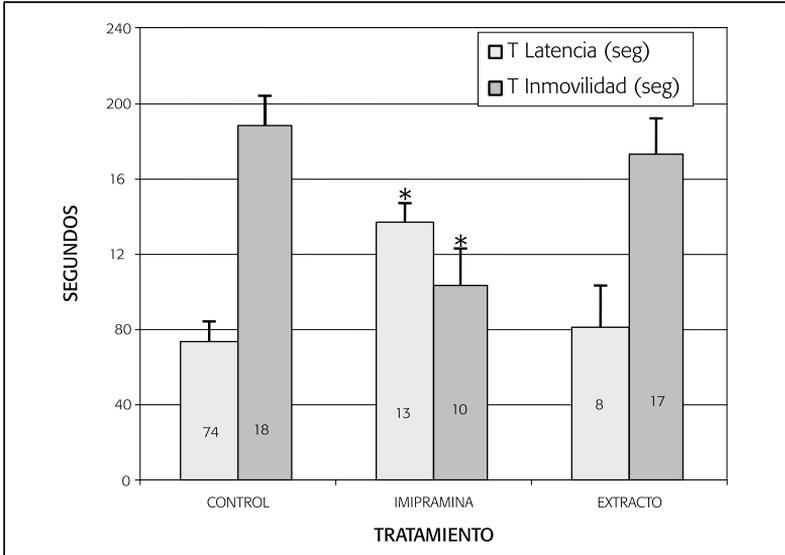


* $p \leq 0,05$, Chi^2 .

Figura 4. Efecto del extracto etanólico de *Hygrophila tytttha* (500 mg/kg, vo) y Clonazepam (0.5 mg/Kg, vo) en el modelo de convulsión inducida por *pentilentetrazol* en ratones.

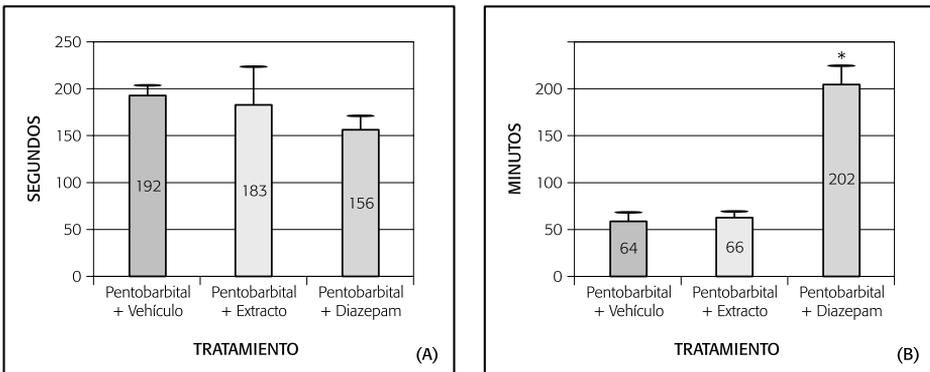
Modelo del nado forzado

No se observan diferencias significativas entre los tratamientos en este modelo (figura 5), por lo cual se considera que el extracto etanólico de *Hygrophila tytha* no posee actividad antidepresiva.



* p<0,05 comparado con el grupo control.

Figura 5. Efecto del extracto etanólico de *Hygrophila tytha*. (Do= 500 mg/Kg v.o) e imipramina (15 mg/Kg, i.p) sobre el tiempo que tardan los animales en adoptar la posición inmóvil y el tiempo de inmovilidad en el modelo de nado forzado. Los datos se expresan como el promedio ± (EMS).



* p<0,05 comparado con el grupo control.

Figura 6. Efecto del extracto etanólico de *Hygrophila tytha* (Do= 500 mg/Kg v.o) sobre el tiempo de latencia (A) y el tiempo de duración del sueño (B) en el modelo de sueño inducido con pentobarbital. Los datos se expresan como el promedio ± (EMS).

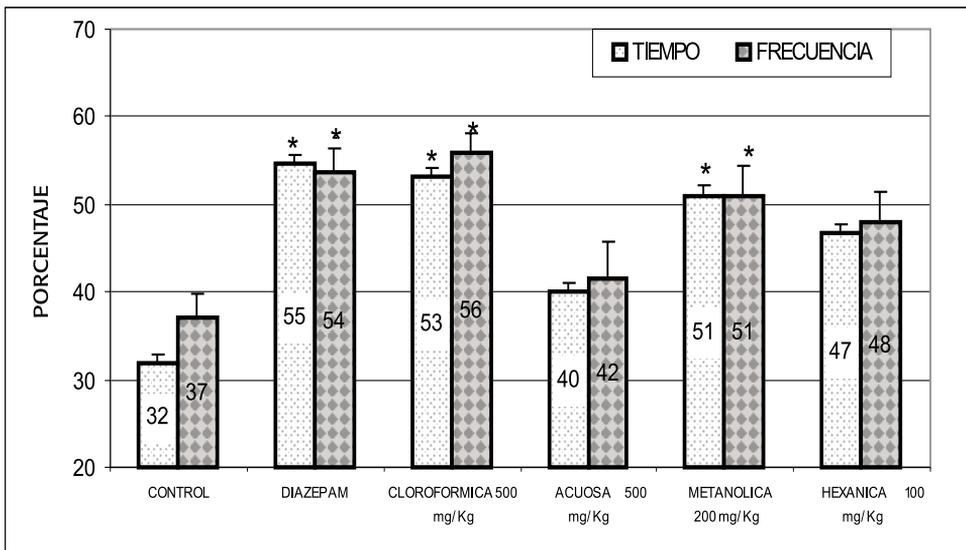
Sueño inducido con pentobarbital

En este modelo el grupo del extracto se comporta de forma similar al grupo control; es decir, no se observa actividad como hipnótico del extracto etanólico (figura 6).

ENSAYOS BIOLÓGICOS REALIZADOS CON LAS FRACCIONES

Laberinto en cruz elevado

Las fracciones primarias obtenidas en la proceso de partición del extracto etanólico fueron la fracción acuosa y la fracción clorofórmica. Esta última fracción da origen a la fracción metanólica y a la fracción hexánica; las 4 fracciones fueron evaluadas en el *LCE*. Teniendo en cuenta los rendimientos obtenidos, la dosis empleada con las fracciones acuosa y clorofórmica fue 500 mg/Kg, mientras que con la metanólica y la hexánica se utilizaron 200 y 100 mg/Kg respectivamente, observándose efectos significativos con respecto al control, tanto en la variable tiempo de permanencia como frecuencia de ingreso a las zonas abiertas en el caso de las fracciones clorofórmica y metanólica, además del patrón utilizado, diazepam (figura 7).

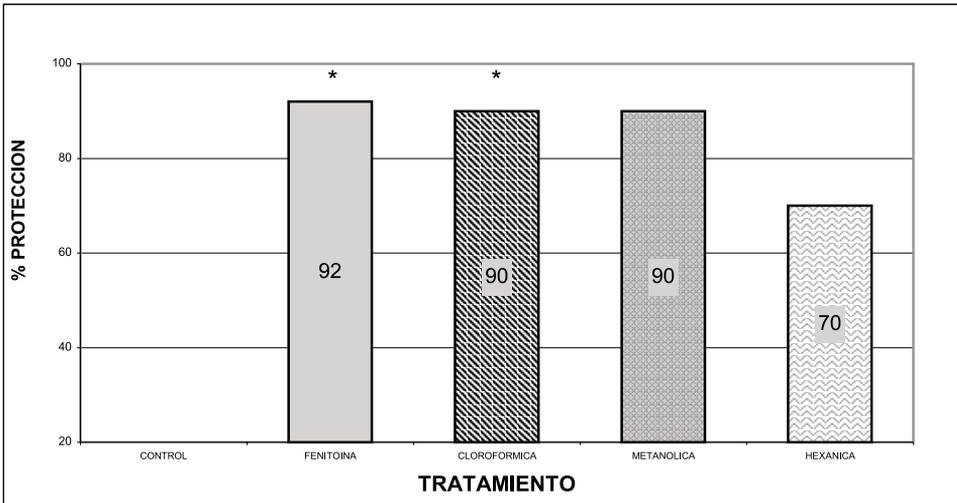


* $p < 0.05$.

Figura 7. Efecto de las fracciones clorofórmica 500 mg/Kg, acuosa 500 mg/Kg, metanólica 200 mg/Kg y hexánica 100 mg/Kg y diazepam 0.5 mg/Kg, sobre la frecuencia de entrada y el tiempo de permanencia en las zonas abiertas del *LCE*. Los datos se expresan como el promedio \pm (EMS).

Modelo del electrochoque

Tanto en el modelo del *LCE* como en el electrochoque la fracción que presenta mayor actividad es la clorofórmica, no obstante la fracción metanólica proveniente de la clorofórmica presenta resultados también interesantes (figura 8).



* $p \leq 0.05$, χ^2 .

Figura 8. Efecto de las fracciones primarias clorofórmica, metanólica y hexánica (500 mg/kg v.o.) y fenitoína (10 mg/kg, vo) en el modelo de convulsión inducida por electrochoque en ratones.

DISCUSIÓN

En este estudio se verificó la actividad sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y fracciones de *Hygrophila tyttta* que dan cuenta del potencial ansiolítico y anticonvulsivante de esta especie. Con el extracto etanólico se observó cierta actividad en los modelos de laberinto en cruz elevado y electrochoque mientras que la respuesta en los modelos de nado forzado pentilentetrazol y sueño inducido con pentobarbital fue negativa. El hecho de que el extracto posea actividad en el modelo del electrochoque pero a la vez carezca de ésta frente a pentilentetrazol sugiere que los mecanismos de tipo benzodiazepínico/gabaérgico no estarían implicados en su mecanismo de acción, ya que generalmente diazepam y análogos suelen ser activos frente a esos dos modelos de convulsión (17). De otro lado, aunque la mayoría de las sustancias depresoras suelen potenciar el sueño inducido con pentobarbital, con el extracto no se observó este efecto lo cual podría considerarse como una ventaja frente a sustancias que

actúan como ansiolíticos o como anticonvulsivantes pero que a la vez producen somnolencia, considerándose éste como uno de sus principales efectos secundarios. No obstante son necesarios ensayos adicionales para poder asegurar lo anteriormente expuesto.

Al avanzar en el fraccionamiento fitoquímico se observa un incremento significativo en la respuesta, a diferencia de lo que se suele obtener con no pocas especies, cuya actividad decrece en la medida en que se avanza en su purificación. Esto sugiere que la actividad de *Hygrophila tyttha* podría concentrarse en determinados metabolitos.

Dados los resultados obtenidos con el extracto, las fracciones se evaluaron en los modelos de laberinto en cruz elevado y electrochoque obteniendo en los dos modelos resultados muy interesantes con la fracción clorofórmica. Esto lleva a pensar que las moléculas responsables de los efectos centrales podrían estar concentradas en esta fracción y que corresponderían a compuestos de una polaridad mediana. Es necesario continuar con el estudio fitoquímico bioguiado para lograr aislar e identificar las moléculas responsables de la actividad farmacológica y posteriormente tener una aproximación a su mecanismo de acción.

Cabe anotar que la especie utilizada en esta investigación corresponde con precisión a *Hygrophila tyttha* y no a *Justicia pectoralis*, especie que en otras latitudes también es conocida como "amansatoros", "amansamachos" o "amansaguapos" y tiene usos populares similares. Si bien hay estudios con especies del género *Hygrophila* que dan cuenta de diversos efectos farmacológicos como: antinociceptivas, antioxidantes, hipoglicemiantes, antibacteriales y antitumorales (18, 19) son muy escasos hasta la fecha los que reportan efectos sobre el sistema nervioso central (20).

En conclusión, los experimentos realizados en este trabajo con la especie *Hygrophila tyttha* describen un perfil ansiolítico y anticonvulsivante que apoyan su uso etnobotánico. Es necesario continuar con su estudio fitoquímico bioguiado para lograr aislar e identificar las moléculas responsables de su actividad farmacológica y sus posibles mecanismos de acción.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo económico de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia. Los autores agradecen al Grupo de Investigación "Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas" del Departamento de Farmacia y al profesor Edgar Linares del Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

REFERENCIAS

1. WHO (World Health Organization), 1998. Quality Control methods for medicinal plant materials. Geneva Indian, *Journal of Medical Research*, July, (1999).
2. M.S. Butler, The role of natural product chemistry in drug discovery, *Journal of Natural Products*, **67**, 2141 (2004).
3. P.Vuorelaa, M.Leinonenb, P.Saikkuc, P.Tammela, J.P. Rauhad, T. Wennberge y H. Vuorela, Natural products in the process of finding new drug candidates, *Current Medical Chemistry*, **11**, 1375 (2004).
4. J.Posada-Villa, S. Aguilar-Gaxiola, C. Magaña y L.Gómez, Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados preliminares del estudio nacional de salud mental, Colombia 2003, *Revista Colombiana de Psiquiatría*, **XXXIII** (3) (2004).
5. G. Pradilla, E. Boris, A. Vesga, E. Fidias y E. León-Sarmiento, Grupo GENECO, Estudio neuroepidemiológico nacional (EPINEURO) colombiano, *Revista Panamericana de Salud Pública*, **14**, 2 (2003).
6. A. Sanabria, "Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae", Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia. Bogotá (1983). pp 63-85.
7. D.C. Rueda, "Evaluación fitoquímica y de actividad central preliminar de la especie vegetal *Hygrophila tyttha*", trabajo de grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia (2005).
8. A.J. Lapa, C.Souccar, M.T Lima-Landman, M.S Castro y C.M de Lima. "Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Caracterização farmacológica da atividade farmacológica no sistema nervoso central. Sociedade brasileira de plantas medicinais", Setor de produtos naturais, Departamento de Farmacología, UNIFESP/ EPM. SBPC- Fortaleza-CE. (2005).
9. T.S. Minoru, H.Takeda y T. Matsumiya, Protective effects of 5-HT_{1A} receptor agonists against emotional changes produced by stress stimuli are related to their neuroendocrine effects, *British Journal of Pharmacology*, **134**, 585 (2001).

10. N. Henderson, M. Turri, J. DeFries y J. Flint, QTL Analysis of multiple behavioral measures of anxiety in mice, *Behavior Genetics*, **34**, 3 Mayo (2004).
11. C. Salmun, S. Morato y A.C. Roque-da-Silva, Anxiety-like behavior in rats: a computational model, *Neural Networks* **13**, 21 (2000).
12. R. Lister, The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse, *Psychopharmacology*, **92**, 180 (1987).
13. C. Queiroz, J. Leite y L.E. Mello, "Modelos experimentales en epilepsia", SBPC/Labjor, Brasil (2002)
14. W.J. Giardino, Models of epilepsy: Electroshock and chemical induced convulsions in the mouse, *Current Protocols in Pharmacology*, 5.22.1-5.22.22 (2000).
15. A. Frazer, D.A Morilak, GAT should animal models of depression model, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **1**, 9 (2005).
16. R.D. Porsolt, G. Antón, N. Blavet y M. Jalfre, Behavioural despair in rats, a new model sensitive to antidepressant treatments, *European Journal of Pharmacology*, **47**, 379 (1978)
17. R. Gordon, M. Gels y W. Diamantis, Interaction of felbamate and diazepam against maximal *electroshock* seizures and chemoconvulsants in mice, *Pharmacology Biochemical-Behavior*. **40**(1), 109-13 (1991).
18. P. Shanmugasundaram y S. Venkataraman, Anti-nociceptive activity of *Hygrophila auriculata*(schum) heine, *African Journal Traditional CAM* , **2**(1), 62 (2005)
19. P. Shanmugasundaram y S. Venkataraman, Hepatoprotective and antioxidant effects of *Hygrophila auriculata* (K. Schum) Heine Acanthaceae root extract, *Journal of Ethnopharmacology*, **104**(1-2), 124 (2006)
20. J.Borg, J.Toazara, H.Hietter, M.Henry, G.Schmitt y B. Luu, Neurotrophic effect of naturally occurring long-chain fatty alcohols on cultured CNS neurons, *FEBS Letters* **213**(2), 406 (1987)
21. A. Mrad de Osorio y C.A. Cardozo de Martínez, "Utilización de Animales de Laboratorio en la Experimentación Biológica", Instituto de Biotecnología y Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (2000).