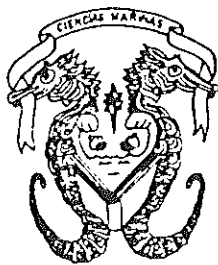


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

DETERMINACION DE ACIDO KAINICO EN
Centroceras clavulatum



TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
OCEANOLOGO
PRESENTA
SONIA ARACELI SOTO RODRIGUEZ

ENSENADA, B.C., MARZO DE 1988

RESUMEN. -

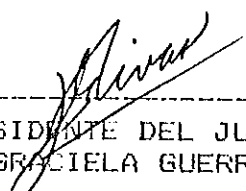
Se analizó químicamente a *Centroceras clavulatum* (alga roja de la familia Ceramiaceae) para determinar estacionalmente el contenido de ácido kainico. La metodología utilizada consta de dos secciones: una para el análisis proximal y la otra para el análisis químico. Esta última consistió principalmente en Cromatografía de Intercambio Iónico, Electroforesis y Cromatografía en papel para la determinación de ácido kainico y el resto de aminoácidos. Las cuantificaciones se llevaron a cabo por técnicas colorimétricas. El análisis proximal muestra diferencias significativas entre las tres estaciones debido probablemente al método de recolección y condiciones del medio ambiente mientras que el análisis químico arrojó un rendimiento de ac. kainico de 186.54 mg/Kg en peso seco para la muestra de otoño'85 que fue aproximadamente 7 veces más que el de verano'86. En cuanto a los aminoácidos libres de *C. clavulatum* en otoño'85 fue donde se encontró el porcentaje más alto (12.19%) comparados con verano'85 (1.9%) y verano'86 (2.7%). Los aminoácidos predominantes en general fueron: alanina, glicina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico. La importancia del ácido kainico radica en su propiedad antihelmíntica y sobre todo por sus múltiples aplicaciones en Neurobiología donde se utiliza como un potente neuroexcitador.

La presente Tesis constituye el primer trabajo generado por el Proyecto de Investigacion Docente -- "Aprovechamiento del Potencial Farmacologico de las Costas de Baja California", adscrito al Area de Quimica de la Facultad de Ciencias Marinas y en cuyas instalaciones se desarrollaron todas las actividades experimentales. Asimismo, representa al Programa --- "KAINICO", pionero de este Proyecto.

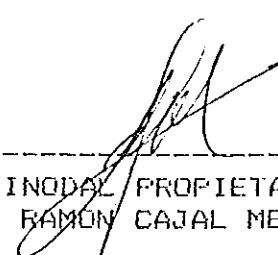
DETERMINACION DE ACIDO KAINICO EN
Centroceras clavulatum

TESIS
QUE PRESENTA:
SONIA ARACELI SOTO RODRIGUEZ.

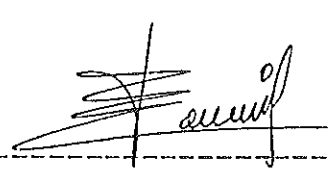
APROBADA POR:



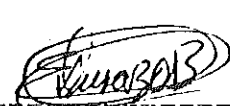
PRESIDENTE DEL JURADO
O.F.B. GRACIELA GUERRA RIVAS



SINODAL PROPIETARIO
OC. RAMON CAJAL MEDRAND



SINODAL PROPIETARIO
QUIM. IRMA SORIA MERCADO



SINODAL SUPLENTE
O.F.B. EDUARDO DURAZO B.



SINODAL SUPLENTE
OC. GUADALUPE G. DE BALLESTEROS

A MIS PADRES,

EFRAIN Y MARIA DEL CARMEN

POR SU INFINITO APOYO MORAL

EN TODO MOMENTO,

A MIS HERMANOS, ESPECIALMENTE A MIREYA

QUIEN SUPO COMPRENDER Y APOYAR TODOS MIS

SUENOS,

A LA MAESTRA GRACIELA,

POR SU GRAN PACIENCIA,

DEDICACION Y APOYO EN LA REALIZACION DE

ESTE TRABAJO, GRACIAS AMIGA, POR SIEMPRE

Y PARA SIEMPRE,

GRACIAS A TODOS LOS MIEMBROS DEL PROYECTO

"APROVECHAMIENTO DEL POTENCIAL FARMACOLOGICO

DE ESPECIES MARINAS DE LAS COSTAS DE BAJA

CALIFORNIA" QUE DE ALGUNA U OTRA MANERA

CONTRIBUYERON EN ESTE TRABAJO,

ESPECIALMENTE A

IRMA, ARTURO, SALVADOR Y CARMEN

GRACIAS A ELLOS EL TRABAJO SALIO ADELANTE.

A MIS AMIGOS, ESPECIALMENTE A

ANA MARIA.

CONTENIDO

	Pag.
INDICE DE FIGURAS	iii
INDICE DE TABLAS	iv
1.0 INTRODUCCION.....	1
1.1 Antecedentes	6
1.1.1 Descripción de la especie bajo estudio	12
1.2 Objetivo	15
2.0 MATERIALES Y METODOS	
2.1 Localización del área de recolección	16
2.2 Recolección e identificación de la especie.....	19
2.3 Transporte y tratamiento inicial	19
2.3.1 Secado, molido y almacenado de la parte I	20
2.4 Análisis Proximal	
2.4.1 Humedad	22
2.4.2 Cenizas	22
2.4.3 Proteínas	22
2.4.4 Lípidos	23
2.4.5 Fibra Cruda	23
2.4.6 Carbohidratos	24
2.5 Análisis Químico.	
2.5.1 Extracción con solventes orgánicos	24
2.5.2 Eliminación de lípidos	25
2.5.3 Purificación parcial del extracto crudo (Intercambio Catiónico)	25
2.5.4 Separación de aminoácidos libres (Intercambio Aniónico)	26
2.5.5 Análisis de fracciones	26
2.5.6 Cuantificación de ácido kaínico	27
2.5.7 Identificación y cuantificación del resto de aminoácidos	28
3.0 RESULTADOS.	
3.1 Análisis proximal	29
3.2 Análisis químico	
3.2.1 Determinación de ácido kaínico	31
3.2.2 Determinación de aminoácidos libres	33
3.2.3 Cuantificación de aminoácidos libres	39
4.0 DISCUSIONES.	44
5.0 CONCLUSIONES.	54

6.0 RECOMENDACIONES. 56
7.0 BIBLIOGRAFIA. 57
8.0 ANEXO 64

INDICE DE FIGURAS.

	Pag
1.- Estructura del ácido kainico.....	7
2.- <u>Centroceres clavulatum</u> (Según Abbott y Hollenberg,1976)	13
3.- Localización del área de estudio	17
4.- Diagrama de flujo para la cuantificación de ácido kainico y el resto de aminoácidos en <u>C. clavulatum</u>	21
5.- Curva de calibración para ácido kainico	32
6.- Patrón típico de aminoácidos para los extractos de:verano'85(a), otoño'85(b) y verano'86(c)	38
7.- Curva de calibración para aminoácidos totales	41
8.- Porcentaje de aminoácidos libres en peso seco de <u>C. clavulatum</u> distribuidos por grupos para las estaciones de verano'85, otoño'85 y verano'86. Los números romanos asignados representan los mismos grupos de la tabla V	43
9.- Aminoácidos relacionados estructuralmente con el ácido kainico	67
10.- Variación anual del costo en dólares (E.U.A.) por gramo de ácido kainico puro. (Según SIGMA Chemical Co.)	68

INDICE DE TABLAS.

	Pag
I.- Análisis proximal en materia seca de <u>C. clavulatum</u>	30
II.- Contenido de ácido kainico en <u>C. clavulatum</u>	31
III.- Aminoácidos detectados en <u>C. clavulatum</u>	34
IV.- Aminoácidos predominantes identificados de <u>C. clavulatum</u> en orden descendente de concentración	36
V.- Contenido de aminoácidos libres de <u>C. clavulatum</u> divididos en grupos	40
VI.- Mezcla estándar de aminoácidos	65
VII.- Valores de Rf observados para cada aminoácido identificado en <u>C. clavulatum</u>	66

1.0 INTRODUCCION

Desde tiempos remotos, las algas marinas han sido aprovechadas por el hombre. Su uso se inició en los países asiáticos principalmente en China y Japón (Tseng,1984; Nisizawa,1979).

Por poseer una gran variedad de propiedades que hacen factible su utilización en campos muy diversos, las algas marinas han despertado interés en algunas industrias, entre ellas se encuentran la industria alimenticia, agrícola, de ficocoloides y farmacéutica.

La utilización de las algas marinas con propósitos medicinales no es nueva, y probablemente su papel en este campo es más variado que lo que comunmente se conoce. Muchas culturas, en especial las asiáticas, reportan poderes curativos de ciertas algas, sobre todo marinas, aprovechando estas propiedades para elaborar medicinas populares. Los estudios más antiguos y detallados sobre este aspecto provienen de "Materia Medica" de Shen-nung, un documento que data de 2700 A.C. (Hoppe,1979; Nisizawa,1979). Según la antigua literatura china, desde hace más de 20 siglos este país ha utilizado con efectividad especies como Laminaria japonica y Sargassum

fusiforme en el tratamiento de bocio, escrófula y edemas (Tseng, 1984). Desde hace 10 mil años los japoneses han utilizado tradicionalmente algas marinas. Como lo demuestran las reliquias de esas épocas, los nativos conocían muy bien especies como Eisenia bicyclis, Hizikia fusiformis y Undaria pinnatifida (Nisizawa, 1979).

Los japoneses prepararon varios antihelmínticos a partir de Digenea simplex: uno llamado "Macnim" y el otro "Helminol" (Tseng, 1944). Por su parte la literatura China reporta una preparación denominada "Zhegucai" -donde esta alga es el principal ingrediente- usada también como medicamento antihelmíntico (Tseng, 1984).

El creciente interés de los investigadores por los productos farmacéuticos algales se demuestra por la gran cantidad de estudios que se han llevado a cabo en tiempos recientes en diferentes partes del mundo. Una revisión de la Medicina popular china culminó con un enlistado en el que figuran 32 especies de algas marinas que en forma de "remedios caseros" pueden curar diversas enfermedades como escrófula, parasitismo, bronquitis, hemorroides, enfermedades de las vías urinarias, etc. (Ibid). Una recopilación detallada del tipo de enfermedad y especie es la de Hoppe (1979) donde se citan algunas algas con acción

neurotrópica (Caulerpa lamorouxii), antirreumática (Ascophyllum nodosum), hipocolesterolémica (Sargassum muticum) y antidiarréica (Chondrus crispus) entre otras.

Otras obras más amplias son la Farmacología Marina publicada por Baslow (1977) y la serie Productos Naturales Marinos editada por Scheuer desde 1978. Esta última incluye avances en el aislamiento, purificación e identificación de compuestos químicos de especies marinas, señalando para algunos casos sus posibilidades de uso farmacéutico (Scheuer, 1983).

Entre los grupos de investigación más prominentes se cuenta el japonés quienes iniciaron la investigación de los componentes activos de Digenea simplex alrededor de 1950 (Nisizawa, 1979) que había sido usada por más de mil años como antiparasítico (Fattorusso y Piattelli, 1980), alcanzando particular importancia en la erradicación de Ascaris sp. en el Japón de la postguerra (Takemoto, 1978). Los preparados de D. simplex utilizados por los japoneses eran muy efectivos y no provocaban reacciones secundarias adversas en el humano, pero si presentaban difícil ingestión por su olor y sabor desagradables. Buscando eliminarlos Murakami y col. en 1953 trabajaron con extractos de D. simplex logrando aislar al "ácido digénico"

-posteriormente llamado ácido kainico- como el responsable de la actividad antiparasítica.

Un grupo estadounidense perteneciente al California Sea Grant College Program ha incluido en los últimos años un tema denominado "Nuevos Productos Marinos", cuyos objetivos de aislar nuevos compuestos químicos y buscar su actividad farmacológica se realizaron a través del Programa de Química Marina y Farmacología. Desde 1980, más de diez compuestos potencialmente útiles han sido descubiertos (Fenical, 1982).

Otro grupo, realizador de uno de los estudios más extensos en el campo de la Farmacología Marina, es el de la prestigiada firma comercial de Laboratorios Suizos La Roche mediante su RRIMP: Roche Research Institute of Marine Pharmacology. Agrupando a numerosos científicos de diferentes disciplinas, se investigó la posibilidad de elaborar medicamentos a partir de algas marinas. De 159 especies estudiadas, obtuvieron nuevas sustancias activas, propiedades farmacológicas no reportadas previamente y especies con prometedora actividad, pero cuyos principios activos hasta ahora no terminan de estudiarse (Baker, 1984).

El presente trabajo constituye un paso más en este campo para vincular poco a poco a las Ciencias Marinas con el sector productivo, a diferencia de la antigüedad, cuando las algas que se utilizaban como drogas medicinales eran parte de las tradiciones populares transmitidas de generación en generación.

1.1 ANTECEDENTES . --

El ácido kainico se obtuvo por primera vez a partir de extractos acuosos de Digenea simplex que fueron adsorbidos en una columna de alúmina con formación de una sal de plata y finalmente cristalización (Murakami y col., 1953).

Durante el aislamiento, Murakami y col. (1953) encontraron que una administración oral de la fracción que contenía ácido kainico causaba una expulsión del 67.7% de parásitos intestinales. El ácido kainico ya purificado mostró actividad de alrededor del 70% en dosis de 10-20 mg.

Debido a la gran importancia que adquirió por su efectividad el ácido kainico, Ueno y col. (1955) se dedicaron a determinar su estructura química, caracterizándolo como un iminoácido cuya fórmula molecular es $C_{10}H_{16}O_4N$. Paralelamente, Murakami y col. (1955), hicieron detecciones colorimétricas de kainico sobre cromatogramas en papel encontrando que se colorea de amarillo con ninhidrina, como prolina e hidroxiprolina y que también, como éstos, produce coloración característica con vainillina, isatina y aloxán haciendo posible distinguirlo de otros aminoácidos. Así mismo, Satoda y col. (1957) desarrollaron un método colorimétrico para la determinación

cualitativa del ácido kainico basándose en su reacción con aloxán.

Finalmente Ueno y col. (1957) realizaron la síntesis química del ácido kainico, a través de la cual confirmaron su estructura (fig.1):

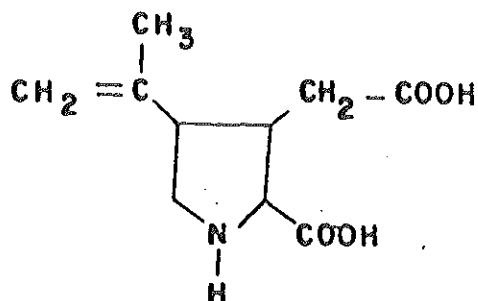


FIG. 1.
ACIDO KAINICO
(*C. clavulatum*.)

Sugimoto en 1960 (citado por Takagi, 1967 y por Nisizawa, 1979) realizó un bioensayo preliminar para observar el efecto antihelmíntico del ácido kainico en niños de edad escolar. El experimento consistió en la administración de una dosis de 20 mg a 43 alumnos de una escuela primaria. El 60.5% de los alumnos mostraron un decremento en el número de huevos de gusanos parásitos, mientras que el 39.5% estaba libre de dichos huevos. La eficacia del ácido kainico fue mucho mejor comparada con santonina.

Tamura (1962) encontró que los extractos acuosos de *D. simplex* provocan una fuerte parálisis motora en *Ascaris*.

sp. de cerdo. Menciona que el ácido kaínico inhibe la deshidrogenasa muscular del parásito de manera que bloquea su respiración tisular, causando su desprendimiento de la pared del huésped.

No solamente el ácido kaínico es activo, su derivado kainato de dietilendiamina también tiene acción frente a los helmintos parásitos del intestino de la gallina: en dosis de 100 mg/Kg la desparasita totalmente de Ascaridia galli (Berenguer, 1969).

Muchos investigadores (Younken, 1967; Der Marderosian 1967, 1979; Martin y col., 1973; Takagi, 1975; Baslow, 1977; Hasimoto, 1978; Hoppe, 1979; Scheuer, 1983, etc.) han citado al ácido kaínico como un antiparasítico potente.

En The Merck Index (1983) se menciona también al ácido kaínico de D. simplex como un antihelmintico. Cita además, dos medicamentos en los que este compuesto es el principio activo: "Digenin" y "Helminol".

En la actualidad existe en México un medicamento denominado DIGESAN (vermífugo), elaborado por los Laboratorios Takeda, constituido por ácido kaínico y santonina como los principales ingredientes que se administra en dosis única en el tratamiento de ascariasis, oxiuriasis y tricocefalosis. La dosis requerida de ácido kaínico es de 5 mg por adulto, mientras que para santonina

es de 50 mg/adulto (Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 1987).

Plenamente identificado y ampliamente reconocido dentro de la Farmacología, como antihelmíntico, durante mucho tiempo se desconoció la actividad del ácido kaínico que le ha atraído nuevo interés y que no fué descubierta sino hasta la década de los años 70. Esta acción se relaciona con su neurotoxicidad, que ocasiona efectos secundarios que recientemente se han observado e incluido en la bibliografía sobre productos farmacéuticos (Ibid).

Basándose en la observación de Tamura (1954, citado por Shinozaki, 1978) de que el ácido kaínico mostraba un fuerte efecto de vómito sobre perros a los que se les administraba ácido kaínico de D. simplex, Shinozaki (1970) examinó el efecto de este compuesto sobre la corteza cerebral de rata, encontrando que posee una potente acción excitatoria sobre las neuronas cuando se aplica directamente sobre ellas. Olney y col. en 1974 (citado por Shinozaki, 1978) propusieron que éste se debía a una alteración de las cargas iónicas y la permeabilidad de la membrana celular. A partir de estos hechos, se inició entre los neurólogos una serie de estudios tendientes a aprovechar al ácido kaínico en sus investigaciones, dado

que éste puede dañar selectivamente a las neuronas inyectándolo sobre varias regiones del cerebro de diferentes animales de experimentación en cantidades entre los 0.5 nmoles-10 nmoles lo cual significa que las bajas concentraciones de ácido kainico requeridas lo hacen altamente útil en la investigación biomédica.

Johnston y col. (1974) extrajeron algunas conclusiones sobre el mecanismo de transmisión del impulso nervioso; McGeer y col. (1978) observaron que produce alteraciones enzimáticas; McGeer y col. (1978b) midieron el tamaño de las lesiones en las neuronas después de inyectarlas con ácido kainico. Fibiger (1978) y Divac y col. (1978) (citado por Fibiger, Ibid) encontraron que inyectado en las áreas del cerebro relacionadas con la memoria y el aprendizaje, causaba deficiencias en ambos procesos. Basándose en toda esta información, McGeer (1978) afirma que el kainico causa destrucción selectiva de ciertas regiones de las células nerviosas, por lo que puede ser usado para producir modelos animales de enfermedades que involucran pérdida o daño de neuronas en lugares específicos del cerebro como la Corea de Huntington, anoxia, demencia senil y epilepsia.

Recientemente Impellizzeri y col. (1975), en un estudio realizado en las costas del Este de Sicilia encontraron

ácido kaínico en Centroceras clavulatum. A partir de extractos etanólicos se obtuvo un rendimiento de 1.5 mmoles/Kg en peso seco. Hoppe(1979) menciona la utilización de C.clavulatum como medicina popular desde tiempos antiguos sobre todo en el Este de Asia.

1.1.1 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE BAJO ESTUDIO.

Centroceras clavulatum (Fig.2) llamada también Ceramium clavulatum es una alga roja del orden de las Ceramiales (familia Ceramiaceae) altamente variable.

Se caracteriza por sus células subrectangulares arregladas en hileras regulares y por tener espinas nodales de una a tres células. La mayoría de las formas de especie son regularmente dicotómicas. La parte apical de un par dicotómico tiende a curvarse como pinzas, la longitud del talo varía entre 6-9 cm. dependiendo de la estación del año. Sus ramificaciones son abundantes y dan la impresión de un "mechón".

Presenta reproducción vegetativa, las ramificaciones viejas se mueren separándose de la base, apareciendo nuevas más tarde. Produce tetrasporas, mientras que la reproducción sexual es por alternancia de generaciones trifásica (Abbott y Hollenberg, 1976).

Centroceras clavulatum, se distribuye en el mesolitoral superior e inferior sobre rocas cubiertas de arena, algunas veces en pequeñas pozas de marea o bien epifita sobre algunas algas como Codium sp. y Corallina sp.

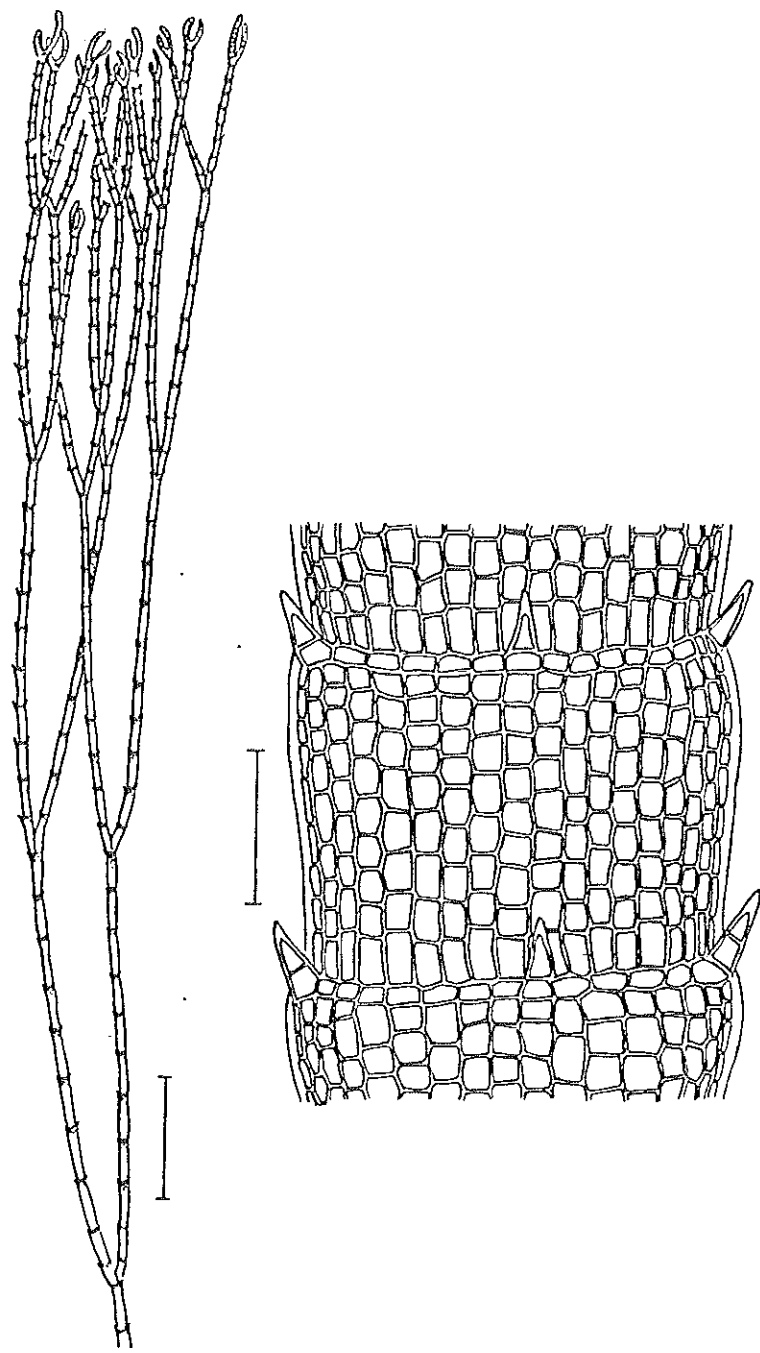


FIG. 2 *Centrocercas clavulatum*.
(Según Abbott y Hollenberg, 1976)

Se le puede encontrar en zonas protegidas y expuestas al oleaje.

Tiene una amplia distribución en todo el mundo, principalmente en todo California desde Santa Cruz hasta Callao, Perú donde se le considera localidad tipo (Smith, 1962; Abbott y Hollenberg, 1976). También se ha encontrado en Arabia (Basson, 1979), Las Antillas (Price y John, 1979), Este de Sicilia (Cormaci y col., 1984), Florida, donde en este último lugar puede alcanzar longitudes entre 10-20 cm. (Woelkerling, 1976). En México, se distribuye tanto en el Pacífico como en el Golfo de México (Garza-Barrientos y col., 1984), la Península de Yucatán (Huerta-Murquiz y col., 1987), etc. En Baja California, se ha encontrado C. clavulatum en las costas del Pacífico (Dawson, 1946; 1962; Borquez-Garcés, 1982; Urbieta-González, 1982; Aguilar-Rosas, 1982) como en el Golfo de California (Norris, 1975). Dentro de la Bahía de Todos Santos Aguilar-Rosas (1980) reporta su distribución en San Miguel y Villa de las Rosas y Aguilar-Rosas (1980) en el Estero de Punta Banda.

1.2 OBJETIVO.

Determinar la variación estacional de ácido kaínico en el alga roja Centroceras clavulatum en la zona comprendida entre Punta Morro y Playitas en la Bahía de Todos Santos, Baja California, México.

2.0 MATERIALES Y METODOS.

2.1 Localización del area de recolección .-

La Bahía de Todos Santos está localizada a 60 millas náuticas al sur de la frontera México-Estados Unidos, sobre la costa Oeste de la Península de Baja California, entre los $31^{\circ} 40'$ y $31^{\circ} 56'$ latitud Norte y $116^{\circ} 36'$ a $116^{\circ} 50'$ longitud Oeste (Fig.3). Abarca un área de 25,000 hectáreas con 18 Km. de largo y 14 Km. de ancho (Secretaría de Marina, 1974).

Al suroeste está limitada por Punta Banda y las Islas Todos Santos, al norte por Punta San Miguel y al oeste por el Puerto de Ensenada, Baja California, con pequeñas salientes a lo largo de la costa (Ibid).

Punta Morro es una de las salientes más cercanas al Puerto, la playa desde aquí hasta Ensenada es rocosa con una entrada a una colina de diorita intrusiva en dirección oeste de la ciudad. Al sur de Punta Morro se encuentra una playa de bolsillo (conocida comúnmente como "Playitas"), zona protegida constituida de roca ígnea extrusiva, donde el ciclo de playas se manifiesta periódicamente. Durante el

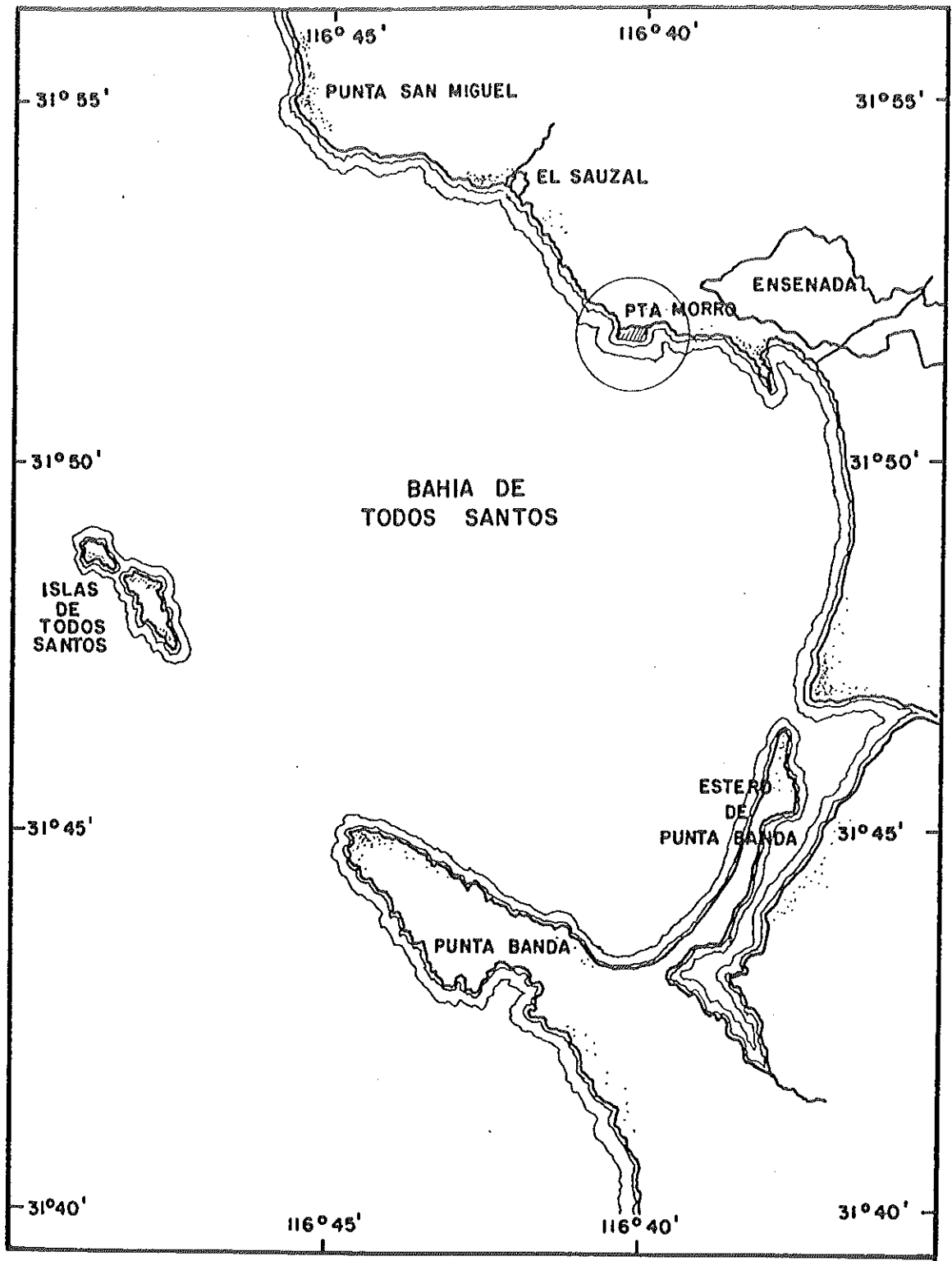


FIG. 3 LOCALIZACION DEL AREA DE ESTUDIO

periodo de erosión (invierno) dominan las condiciones de tormenta, la playa se encuentra cubierta por cantos rodados, mientras que en periodos de depositación (verano) se cubre totalmente de arena (Ibid).

Los criterios utilizados para seleccionar la estación de colecta fueron los siguientes:

- 1) Tamaño del manto algal
- 2) Accesibilidad a la zona de recolección
- 3) Distancia del área de estudio al laboratorio, en base a la disponibilidad de transporte.

La estación de colecta se ubicó en la zona comprendida desde Punta Morro (enfrente del faro) hasta poco antes del inicio de la playa arenosa de Playitas. El sustrato es rocoso en la zona de Punta Morro (zona de alta energía), disminuyendo hacia el sur la energía y por lo tanto las rocas están cubiertas de arena.

2.2. Recolección e identificación de la especie.-

La recolección de la especie se efectuó durante los meses de agosto de 1985 (verano'85), octubre de 1985 (otoño'85) y agosto de 1986 (verano'86) de la zona comprendida entre el mesolitoral medio e inferior. La cantidad de muestra varió dependiendo de la estación del año colectándose de 1-2 Kg de material fresco.

Segun Aguilar-Rosas (1987) la especie recolectada corresponde a Centroceras clavulatum, cuya clasificación es la siguiente:

División: Rhodophyta

Clase: Floridophyceae

Orden: Ceramiales

Familia: Ceramiaceae

Género: Centroceras

Especie: clavulatum.

2.3. Transporte y tratamiento inicial.-

Inmediatamente después de colectadas, las algas se transportaron en hielo al laboratorio en donde se lavaron

con agua dulce, luego se escurrieron y limpiaron manualmente para remover materia orgánica, epifitas y otros contaminantes. Posteriormente se separaron en 2 partes: una para el análisis proximal (parte I) y la otra para el análisis químico (parte II).

Todas las actividades descritas en este punto y los siguientes se realizaron para las 3 muestras (verano '85, otoño '85 y verano '86), según se muestra en la figura 4.

2.3.1. Secado, molido y almacenado de la Parte I.-

Las algas se secaron, al aire libre y después en estufa a 40°C por un espacio de aproximadamente 6 hrs, con el objeto de facilitar la molienda y reportar los resultados en base al peso seco.

Después del secado se molieron finamente en un molino de cuchillas. La harina de algas se tamizó para trabajar con un determinado tamaño de partícula (0.5 mm) y posteriormente se almacenaron en recipientes de polietileno.

2.4. ANALISIS PROXIMAL.-

Todas las determinaciones del análisis proximal se realizaron en base al peso seco del alga y de acuerdo a los métodos descritos por la A.O.A.C. (1975).

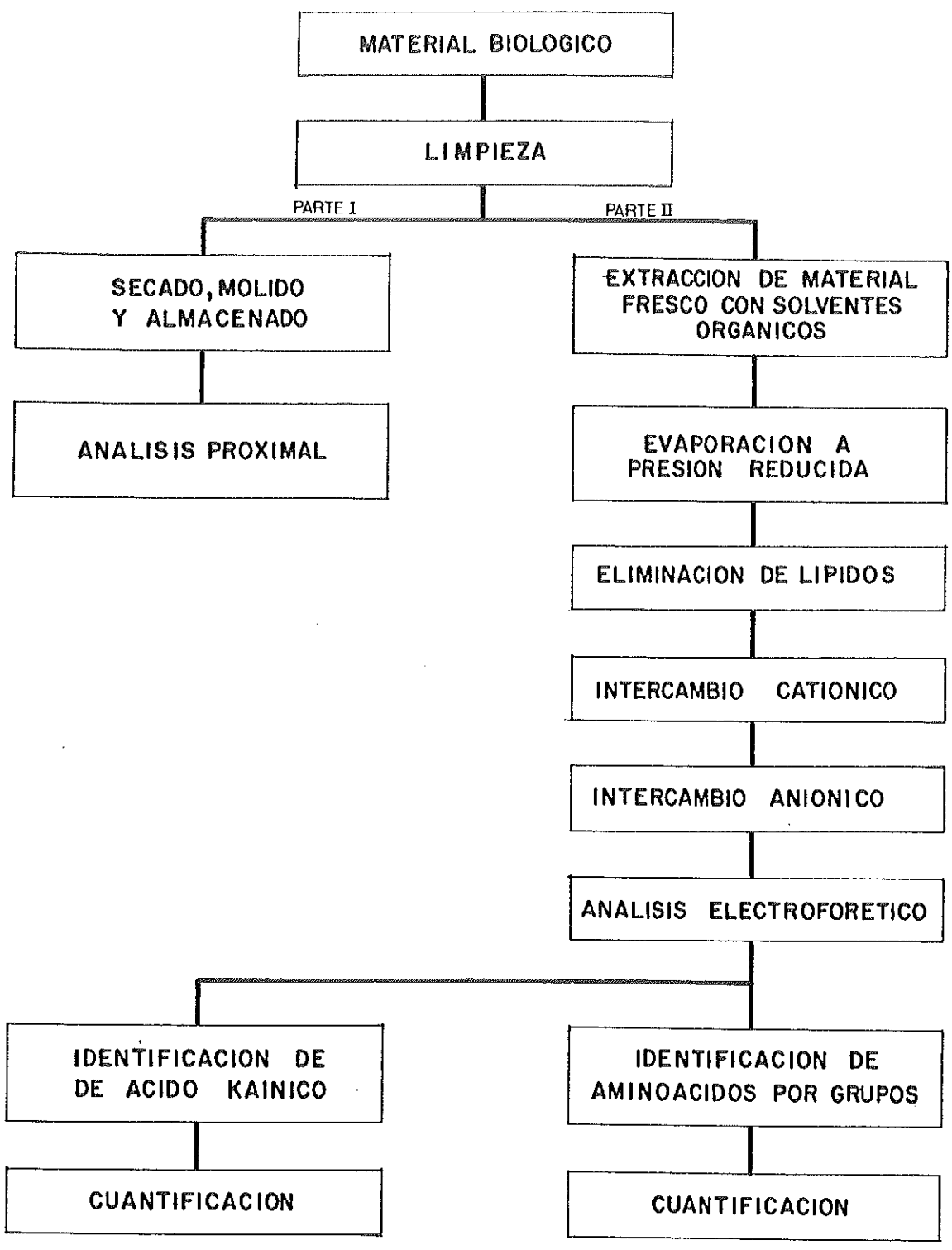


FIG. 4 DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA CUANTIFICACION DE ACIDO KAINICO Y EL RESTO DE AMINOACIDOS EN *C.clavulatum*

2.4.1. Humedad.-

La determinación de humedad se efectuó sometiendo las muestras a $100-110^{\circ}\text{C}$ durante 4 hrs., realizando la cuantificación por diferencia en pesos.

2.4.2. Cenizas.-

Una vez determinado el porcentaje de humedad, se procedió a calcular el contenido de minerales presentes en el alga. Se consideran como cenizas al material remanente después de una combustión total de la materia orgánica. Para esto se colocó la muestra en una mufla a $500-550^{\circ}\text{C}$ durante 12 hrs, cuantificándose el porcentaje de cenizas por diferencia en pesos.

2.4.3. Proteínas.-

Se realizó de acuerdo al método Micro-Kjeldhal, que se basa en la destrucción total de la materia orgánica por digestión de la muestra en ácido sulfúrico concentrado en presencia de CuSO_4 y K_2SO_4 .

Posteriormente se destila el digerido en una solución de ácido bórico 4% donde se capta el amoníaco; el ión borato formado se valora después con ácido clorhídrico 0.01N. Así, el ácido consumido es equivalente

al amoniaco y por lo tanto al contenido de nitrógeno orgánico en la muestra. El porcentaje de proteínas se obtiene multiplicando el porcentaje de nitrógeno orgánico por el factor 6.25.

2.4.4. Lípidos.-

Se determinaron mediante la extracción de la muestra con cloroformo como solvente, durante 8 hrs. utilizando para ello el extractor de lípidos Soxhlet. Los lípidos se cuantificaron por la diferencia en peso inicial y final del matraz receptor una vez evaporado completamente el solvente.

2.4.5. Fibra Cruda.-

El método consiste en determinar el material remanente, insoluble (polisacárido fibroso) propio de la pared celular que queda después de una hidrólisis drástica, para lo cual se mantiene a la muestra a reflujo en H₂SO₄ 1.5% durante 30 minutos y después en NaOH 2.5% durante el mismo periodo de tiempo.

Luego se somete a una temperatura entre 100-110 C por 4 hrs. en estufa y por 12 hrs. a 450-500°C en mufla. El

contenido de fibra cruda se obtiene por la diferencia en pesos.

2.4.6 Carbohidratos.-

Se determinaron restando la suma de los porcentajes de humedad, cenizas, proteínas, lípidos y fibra cruda al 100%.

2.5. ANALISIS QUIMICO.-

2.5.1. Extracción con solventes orgánicos.-

La parte II del material biológico, se maceró con mortero en etanol al 70%. El macerado se sometió a extracción por agitación continua utilizando un agitador mecánico por un período de aproximadamente 20 hrs.

El extracto etanólico se filtró, utilizando gasa comercial para separar la fibra y después al vacío.

Posteriormente se evaporó al mínimo volumen bajo presión reducida y se obtuvo un concentrado para cada muestra, que se almacenó a 4° C con el fin de evitar la proliferación de microorganismos.

2.5.2. Eliminación de lípidos.-

El extracto concentrado se centrifugó varias veces a 10,000 RPM durante 10 minutos (Ultracentrifuga IEB-20A) para eliminar partículas en suspensión, lavándose el residuo con agua desionizada en cada ocasión.

Después de esta clarificación, se procedió a la eliminación de los lípidos mediante extracción con mezclas de éter-etanol en una proporción de (9:1).

2.5.3. Purificación parcial del extracto crudo .-- (Intercambio Catiónico)

Una pequeña cantidad de extracto clarificado y desgrasado se aplicó a una resina de intercambio catiónico, Dowex 50W, H⁺, eluyendo con NH₄ OH 4M para obtener la Fracción de Aminoácidos (FAA) (Copper, 1977). Además de las muestras de cada estación se aplicó este procedimiento a una mezcla estándar de aminoácidos (Tabla VI, Anexo) preparada en base a la composición reportada para Centroceras clavulatum del Mediterráneo (Impellizzeri y col., 1975).

2.5.4. Separación de aminoácidos.- (Intercambio Aniónico)

La fracción de aminoácidos (incluida la mezcla de estándares sometida previamente a Intercambio Cationico) se aplicó a una resina de Intercambio Aniónico (AG1, MeCOO⁻). La elución de los aminoácidos se llevó a cabo mediante un gradiente de pH usando ácido acético (Ibid).

De cada muestra se obtuvieron alrededor de 300 fracciones que se colectaron con la ayuda de un Colector de Fracciones Automático (Activator # 74740).

Todas las fracciones se evaporaron a sequedad; posteriormente se recuperaron en el mínimo volumen de agua desionizada para su análisis electroforético y cromatográfico, así como su cuantificación de aminoácidos.

2.5.5. Análisis de fracciones.-

Cada fracción fue sometida a electroforésis en papel usando como estándar la mezcla de aminoácidos mencionada en el punto 2.6.3.. Esto permitió agruparlas, reuniendo en una sola todas aquellas que mostraron los mismos resultados. De esta manera se redujo el número de fracciones, teniendo varias de un sólo componente y otros con dos o más. Para

confirmar el número de componentes en estas nuevas fracciones se aplicó análisis bidimensional acoplando la electroforésis con cromatografía.

Se probaron varios reveladores para aminoácidos como ninhidrina, vainillina, aloxán e isatina. En base a los resultados se seleccionó ninhidrina como el mejor revelador.

2.5.6. Cuantificación de Acido Kainico.-

Una vez que se identificó por análisis bidimensional al ácido kainico usando el estándar correspondiente (Sigma) se procedió a la cuantificación mediante la técnica colorimétrica de Troll y Cannan (1952) que consiste en la reacción de un iminoácido con ninhidrina formando un derivado rojo que se extrae en benceno transformándose rápidamente en un compuesto amarillo al cual se le mide la absorbancia a una longitud de onda de 440 nm. Previamente se obtuvo la ecuación de la recta a partir de una curva de calibración con la ayuda de un espectrofotómetro ultravioleta-visible Bausch & Lomb (Spectronic 70).

2.5.7. Identificación y cuantificación del resto de aminoácidos.-

Las fracciones agrupadas previamente (diferentes del ácido kaínico) se sometieron repetidamente a análisis bidimensional usando estándares de aminoácidos para lograr la identificación de cada componente. Luego se cuantificaron mediante el método colorimétrico de Plummer (1981) previa obtención de la curva de calibración utilizando el espectrofotómetro señalado anteriormente.

3.0 RESULTADOS. —

3.1 ANALISIS PROXIMAL.

La tabla I muestra la naturaleza química de Centroceras clavulatum durante verano'85, otoño'85 y verano'86. En general, el orden descendente de los constituyentes principales fue el siguiente: carbohidratos, cenizas, fibra cruda, proteínas y lípidos.

El contenido de minerales determinado como cenizas fue casi el doble para verano'85 (40.39 %) comparado con verano'86 (22.49 %). Sin embargo las variaciones en proteínas y lípidos de una estación a otra fueron mínimas. Para proteínas se encontró un rango de 2.16-3.51 % siendo el valor más bajo el de verano'86 y el más alto el de verano'85. En cuanto a los lípidos las fluctuaciones fueron todavía menores con un máximo de 1.5 % para verano'86 y un mínimo de 0.61 % para verano'85.

El porcentaje de fibra cruda se comportó más o menos uniforme durante las 3 estaciones con una diferencia máxima de aproximadamente 4 % entre el valor mayor (12.18 %) que corresponde a verano'86 y el menor para verano'85 con 8.28%.

Los valores de carbohidratos fueron más altos para la muestra de otoño '85 con 57.46 % y los más bajos para verano '85 ya que presenta un porcentaje de 42.44 %.

TABLA I.- ANALISIS PROXIMAL EN MATERIA SECA DE *C. clavulatum*

COMPONENTE (%)	VERANO '85		OTOÑO '85		VERANO '86	
	MEDIA	DESV. STD.	MEDIA	DESV. STD.	MEDIA	DESV. STD.
CENIZAS	40.39	0.63	17.06	0.15	22.49	0.60
PROTEINAS	3.51	0.45	2.64	0.17	2.16	0.28
LIPIDOS	0.61	0.04	0.62	0.07	1.15	0.27
FIBRA CRUDA	8.28	0.49	11.21	0.46	12.18	1.32
CARBOHIDRATOS	42.44	2.37	57.46	0.47	52.57	3.08

3.2 ANALISIS QUIMICO.

3.2.1 Determinación de ácido kainico.-

La tabla II presenta el contenido de ácido kainico en *C. clavulatum* durante verano'85, otoño'85 y verano'86 expresado en peso fresco y seco.

La cuantificación de ácido kainico se determinó a partir de la curva de calibración de la fig. 5. Se observa una gran diferencia entre las 3 estaciones siendo la muestra de otoño en la que se encontró la mayor concentración (186.54 mg/Kg en peso seco) seguida por verano'86 con un 2.7 mg/Kg en peso seco. La muestra de verano'85 únicamente presentó muy bajas concentraciones.

TABLA II.- CONTENIDO DE ACIDO KAINICO EN *C.clavulatum*

CONTENIDO ESTACION	mg/kg DE PESO FRESCO	mg/kg DE PESO SECO	μ mol/kg DE PESO SECO
VERANO'85	T	T	T
OTOÑO'85	18.430	186.540	875.0
VERANO'86	0.276	2.7	13.0

T = TRAZAS

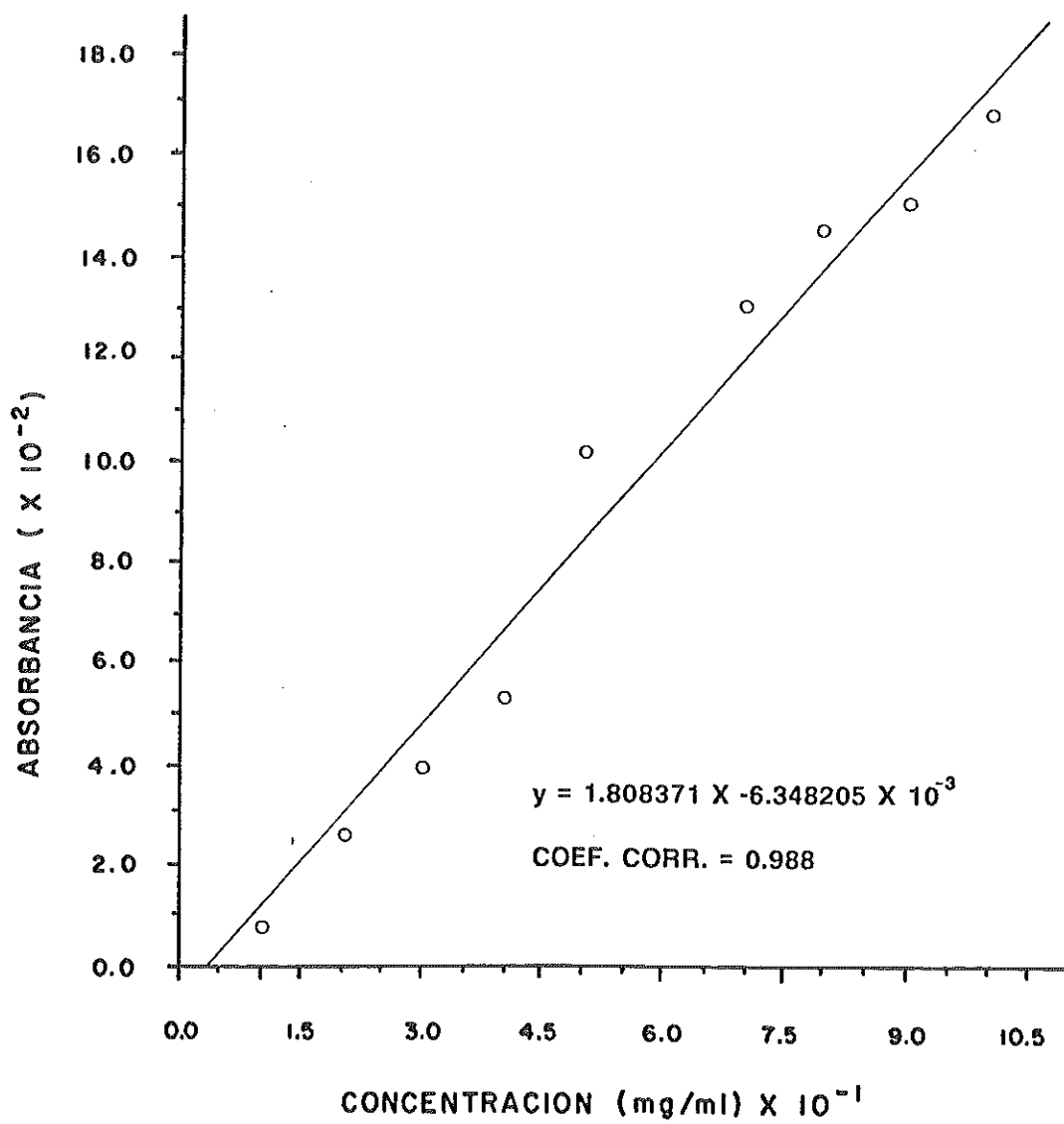


FIG.5 CURVA DE CALIBRACION PARA ACIDO KAINICO

3.2.2 Determinación de aminoácidos libres.

En la tabla III se enlistan los aminoácidos determinados para *C. clavulatum* en cada estación analizada. El número total de aminoácidos encontrado en el extracto de verano'85, otoño'85 y verano'86 fue de 18, 16 y 23 respectivamente. En el extracto de verano'86 se detectó glicina, alanina, serina, prolina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico y ácido kaínico con la probable presencia de valina, treonina e histidina. Para el extracto de verano'85 se encontraron a alanina, glicina, serina, treonina, prolina, lisina, ac. glutámico, ac. aspártico y ac. kaínico y se detectaron otros 9 aminoácidos que no fueron identificados. La muestra de otoño'85 mostró glicina, alanina, serina, lisina, ac. glutámico, ac. aspártico y ac. kaínico con la presencia dudosa de treonina, además de 8 aminoácidos no identificados.

TABLA III AMINOACIDOS DETECTADOS EN *C. clovulatum*

AMINOACIDO	VERANO'85	OTOÑO'85	VERANO'86
VAL	-	-	*
GLI	+	+	+
ALA	+	+	+
SER	+	+	+
TRE	+	*	*
PRO	+	-	+
LIS	+	+	+
HIS	-	-	*
GLU	+	+	+
ASP	+	+	+
KAI	+	+	+
NO IDENTIFICADOS	+(9)	+(8)	+(12)
TOTAL	18	16	23

+ = PRESENCIA

- = AUSENCIA

* = PRESENCIA DUDOSA

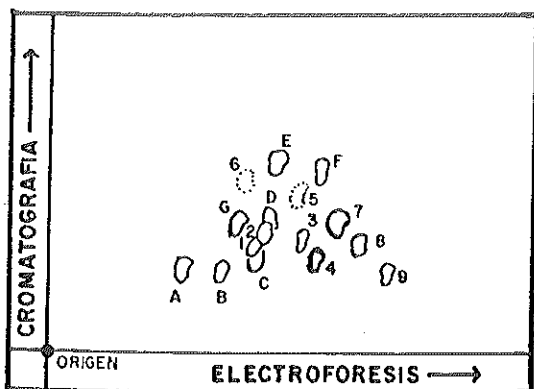
() = INDICAN EL NUMERO. DE AMINOACIDOS NO IDENTIFICADOS

La tabla IV muestra a los aminoácidos predominantes - identificados- colocados en orden descendente de concentración para las 3 muestras. Determinados a nivel semicuantitativo, éstos fueron alanina, glicina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico. Se observa una similitud de aminoácidos entre los extractos de otoño '85 y verano '86 ya que ambos presentan la misma secuencia de (alanina, serina) y (ac. glutámico, ac. aspártico) con la única diferencia de que glicina y ácido kaínico no son predominantes para verano '86. La muestra de verano '85 también posee el mismo orden en los aminoácidos ácidos pero no así para los neutros donde existe una relación inversa (alanina, glicina, serina) con respecto a las otras 2 estaciones.

TABLA IV AMINOACIDOS PREDOMINANTES IDENTIFICADOS EN *C. clavulatum* EN ORDEN DESCENDENTE DE CONCENTRACION.

MUESTRA	AMINOACIDOS NEUTROS	AMINOACIDOS ACIDOS
VERANO '85	ALA GLI SER	GLU ASP
OTOÑO '85	ALA SER GLI	GLU ASP KAI
VERANO '86	ALA SER	GLU ASP

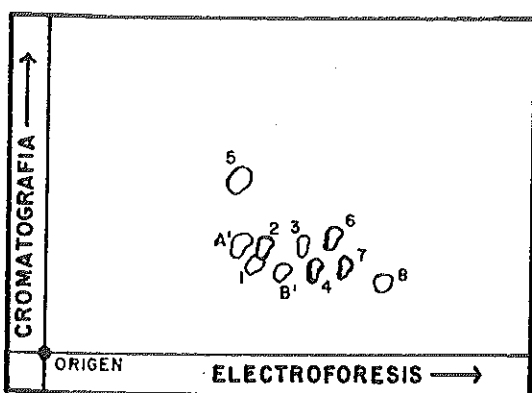
En la fig. 6 se presentan los cromatogramas con las posiciones de los aminoácidos encontrados en cada extracto. Cada mapa fue construido a partir de las posiciones relativas de los aminoácidos por cromatografía en papel y electroforésis así como por los Rf reportados en la tabla VII (Anexo). Los aminoácidos que aquí se muestran son los mismos que se reportan en la tabla III, los esquemas se construyeron para facilitar la visualización de la variación estacional. En esta figura se puede observar claramente la similitud entre los patrones de ambos veranos, aun cuando el extracto de verano '86 muestra 5 aminoácidos más que el de verano '85. También puede apreciarse la diferencia con la muestra de otoño '85.



(a) VERANO '85

1=ASP	4=SER	7=ALA
2=GLU	5=PRO	8=GLI
3=TRE	6=KAI	9=LIS

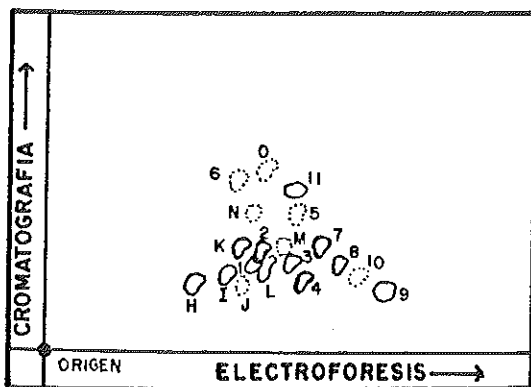
A,B..... G = NO IDENTIFICADOS



(b) OTOÑO '85

1=ASP	4=SER	7=GLI
2=GLU	5=KAI	8=LIS
3=TRE	6=ALA	

A', B' = NO IDENTIFICADOS



(c) VERANO '86

1=ASP	5=PRO	9=LIS
2=GLU	6=KAI	10=HIS P
3=TRE P	7=ALA	11=VAL P
4=SER	8=GLI	

H, I O = NO IDENTIFICADOS

FIG. 6 PATRON TÍPICO DE AMINOACIDOS PARA EL EXTRACTO DE VERANO '85 (a), OTOÑO '85 (b) Y VERANO '86 (c).

3.2.3 Cuantificación de aminoácidos libres.-

La tabla V muestra los porcentajes de aminoácidos libres encontrados en *C. clavulatum* expresado en peso fresco y seco para los 3 extractos. Los aminoácidos se cuantificaron por grupos de acuerdo al método de Plummer (1981), a partir de la curva de calibración para aminoácidos totales (fig.7). Se observa que la muestra de otoño'85 alcanzó el contenido más alto con 12.89 % seguida por la de verano'86 (2.72 %) y la de verano'85 (1.95 %). En cuanto a los grupos, el grupo I (aminoácidos neutros más no identificados) predominó en las 3 estaciones. Los aminoácidos no identificados (grupo II) obtuvieron un valor relativamente bajo (1.5%) para verano'86; el grupo III (aminoácidos ácidos más no identificados) fue mayor en otoño'85 (4.6 %) siendo el menor el de verano'85 (0.029 %). También se observan diferencias entre el contenido de aminoácidos en peso fresco y seco en un orden de aproximadamente 10 entre las 3 estaciones.

TABLA V. - CONTENIDO DE AMINOACIDOS LIBRES DE *C. clavulatum* DIVIDIDOS EN GRUPOS

ESTACION	GRUPO	PESO FRESCO (mg %)	PESO SECO (mg %)
VERANO'85	I	190.11	1924.20
	II	—	—
	III	2.95	29.83
	TOTAL	193.06	1954.02
OTOÑO'85	I	811.33	8211.81
	II	—	—
	III	462.68	4682.98
	TOTAL	1274.01	12894.79
VERANO'86	I	162.32	1642.90
	II	15.55	157.37
	III	90.73	918.34
	TOTAL	268.60	2718.61

GRUPO I = AMINOACIDOS NEUTROS + NO IDENTIFICADOS

GRUPO II = AMINOACIDOS NO IDENTIFICADOS

GRUPO III = AMINOACIDOS ACIDOS + NO IDENTIFICADOS

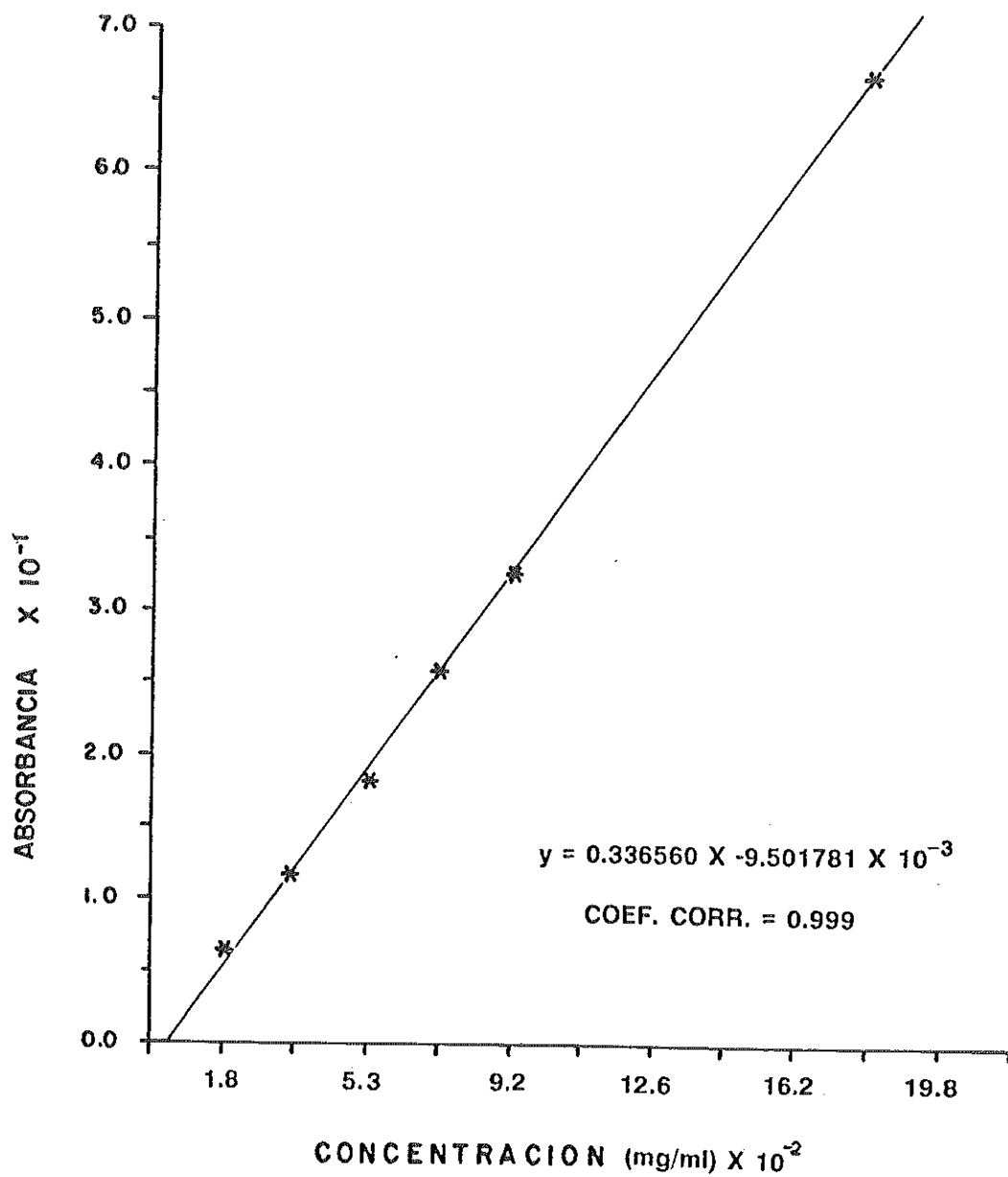


FIG. 7 CURVA DE CALIBRACION PARA AMINOACIDOS TOTALES

La figura 8 muestra los porcentajes de aminoácidos libres en peso seco distribuidos por grupos para las 3 estaciones analizadas. Los porcentajes se tomaron de los resultados de la tabla V, aquí se presenta de una manera más clara las diferencias porcentuales entre las muestras así mismo para los grupos de aminoácidos. El grupo II está representado únicamente en el extracto de verano '86, en cambio los grupos I y III aparecen en las tres estaciones. Puede notarse la abundancia tanto de aminoácidos neutros como de ácidos en la muestra de otoño '85 a diferencia de las otras 2 muestras.

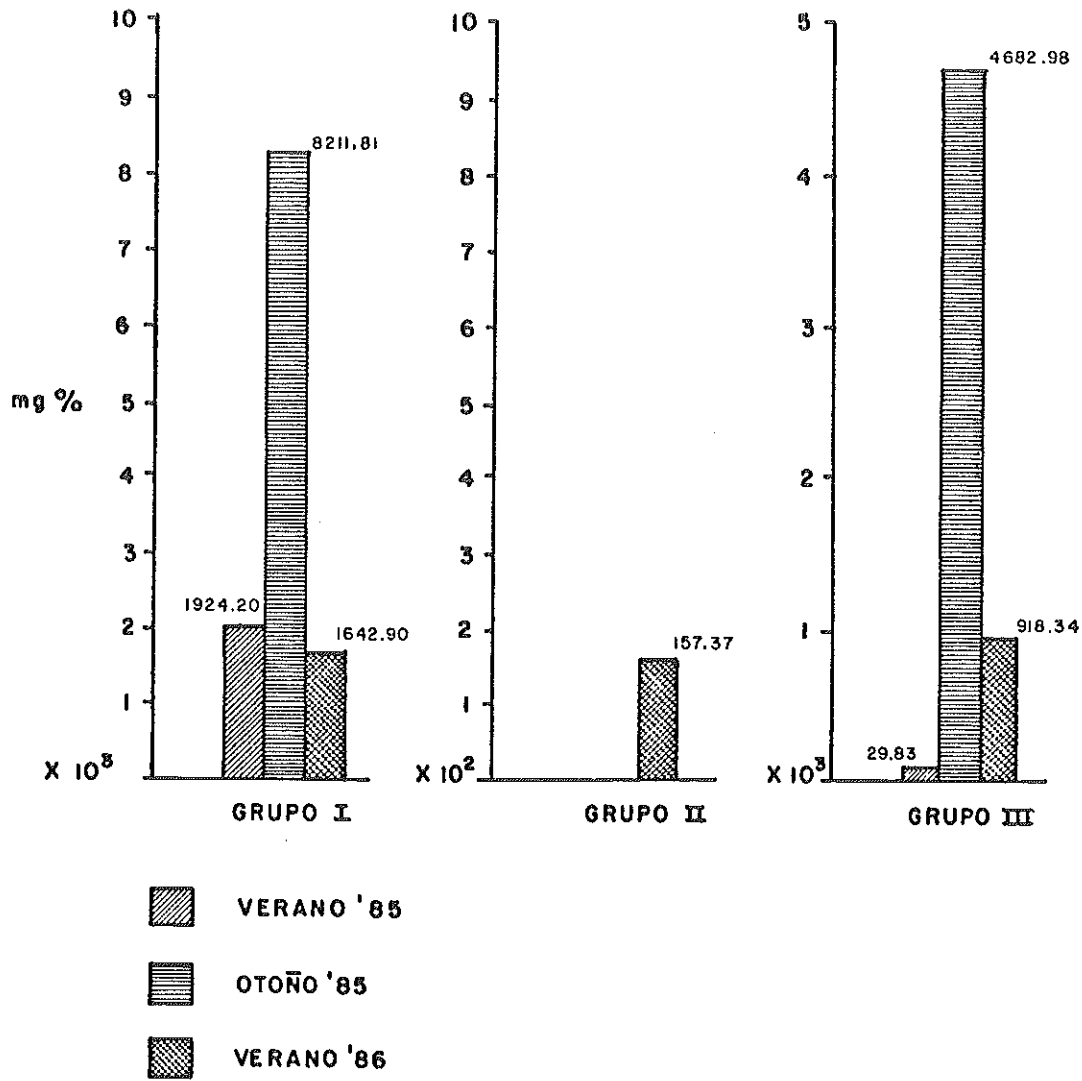


FIG. 8 PORCENTAJE DE AMINOACIDOS LIBRES EN PESO SECO DE *C. clavulatum* DISTRIBUIDOS POR GRUPOS PARA LAS ESTACIONES DE VERANO '85, OTOÑO '85 Y VERANO '86, LOS NUMEROS ROMANOS ASIGNADOS REPRESENTAN LOS MISMOS GRUPOS DE LA TABLA V

4.0 DISCUSIONES.

4.1 ANALISIS PROXIMAL.

La tendencia a disminuir el porcentaje de cenizas y proteínas de un verano a otro que muestra C. clavulatum según la tabla I contrasta con la tendencia inversa que se observa en el porcentaje de lípidos y fibra cruda. Claramente se observa estacionalidad de los macroconstituyentes en esta tabla. Sin embargo, no se descarta la posible influencia de los cambios en el medio ambiente marino ni las variaciones en el método de colecta; aunque esto último no fue evaluado para afirmarlo categóricamente.

Los estudios de análisis proximal sobre especies del género Centroceras son muy escasos, aún entre especímenes de la misma familia (Ceramiaceae). Por ésta razón es difícil disponer de dicha información, pues la mayoría de los trabajos de este tipo se realizan principalmente en algas reconocidas comercialmente.

Sin embargo, si comparamos la media de los porcentajes de los macroconstituyentes de la tabla I, observamos que el valor de 26.65% de cenizas para C. clavulatum se aproxima al valor reportado de 27.4% para Rhodymenia palmata

(Stephenson, 1974) y al porcentaje de 30.35 obtenido por Florville-Alejandre (1987) para Gracilaria lemaneiformis.

El contenido proteico de la especie estudiada fue relativamente bajo (valor medio es de 2.77%) considerando que la mayoría de las algas rojas son ricas en proteínas, como lo reportan Stephenson (1974) y Florville-Alejandre (1987), además de Chang-Lee (1983), INDO-PACIFIC (1965) y otros.

El porcentaje medio de lípidos (0.79%) es muy inferior en comparación con el elevado valor de Pterocladia capillacea de 8.21%, encontrado por Chang-Lee (1983), sin embargo es más cercano a valores por debajo del 1% reportados por INDO-PACIFIC (1965) para algunas Rhodophytas como Gracilaria sp. e Hypnea sp.

Llama la atención el alto contenido de fibra cruda, material estructural característico de la pared celular, considerando que en general, las Rhodophytas poseen bajo contenido del componente estructural celulosa en la pared celular (Dawes, 1986). El porcentaje medio obtenido para C. clavulatum de 10.56 es muy alto comparado con el reportado por Stephenson (1974) para Rhodymenia palmata (2.1%) y el valor encontrado en Gracilaria verrucosa de 2.2% (Chang-Lee, 1983).

Por último, en cuanto al contenido de carbohidratos de C. clavulatum el valor promedio para las 3 estaciones fue de 50.82 % que puede considerarse muy elevado con respecto al 38.69 % obtenido por Florville-Alejandre (1987) para Gracilaria lemæiformis, sin embargo algunas rhodophytas han alcanzado valores arriba del 50 % del total de los macroconstituyentes, como Gracilaria coronopifolia con 58.4 % y Gelidium sp. que posee 50.13 % (INDO-PACIFIC, 1965) que son valores más cercanos a los obtenidos para Centroceras clavulatum.

4.2 CONTENIDO DE ACIDO KAINICO.

La variación estacional del ácido kainico (KAI) es evidente en la tabla II. Estos hallazgos son similares a los estudios de estacionalidad realizados por Mohsen y col. (1975) quienes demostraron que el contenido de aminoácidos proteicos libres y combinados en una rodophyta, una phaeophyta y una clorophyta, varían ampliamente entre una estación y otra. Takagi y col. (1967, citado por Fattorusso y Piattelli, 1980) encontraron lo mismo para Chondrus ocellatus. Según Mohsen y col. (1975), este tipo de observaciones es indicativo de la periódica incorporación

de aminoácidos a otras estructuras de mayor complejidad, principalmente las proteínas. Esta afirmación, válida para los aminoácidos más comunes, podría invalidarse para el KAI, ya que éste no ha sido encontrado en proteínas ni formando parte de otras estructuras. Sin embargo, se sabe que la mayoría de los aminoácidos no proteicos son derivados de los α -aminoácidos hallados en las proteínas (Lehninger, 1982), por lo que las variaciones de KAI podrían estar relacionados con la variación de los aminoácidos proteicos, en la forma en la que lo determinara su metabolismo. Este -hasta la fecha- no ha sido publicado, aunque se han reportado otros iminoácidos en *C. clavulatum* como el ácido baikiánico (BAI) y el ácido piperídico (PIP) (Fig. 9, Anexo) que se relacionan estructuralmente con el KAI (Impellizzeri y col., 1975) y que podrían estar también relacionados metabólicamente.

Otro factor involucrado en la producción de KAI podría ser la localización geográfica de los especímenes. Esta afirmación se apoya en el hecho de que la concentración encontrada para *C. clavulatum* de la Bahía de Todos Santos fue de 0.875 mmoles/Kg con base al peso seco, mientras que en la misma especie de la costa Este de Sicilia fue de 1.5 mmoles/Kg de peso seco (Ibid), es decir, aproximadamente el doble.

Como se mencionó en los antecedentes, la propiedad antihelmíntica del ac. kainico está, desde hace tiempo, plenamente reconocida. Si expresamos la concentración encontrada en C. clavulatum de la Bahía de Todos Santos en otras unidades, podemos facilitar algunos cálculos: ésta fue de 186.54 mg/Kg peso seco. Considerando que se requieren aproximadamente 5mg/adulto en dosis única para la erradicación de parásitos intestinales, entonces de cada Kg de alga seca se podría obtener la cantidad necesaria para el tratamiento de 37 pacientes.

El precio del producto antihelmíntico disponible en el mercado (DIGESAN) -alrededor de 1000 pesos- (1987) resulta bajo comparado con el esfuerzo invertido para el aislamiento del KAI de C. clavulatum ya que la técnica utilizada (Intercambio Iónico) es laboriosa, sumándose a esto el monitoreo constante de aminoácidos a través de todo el experimento. Sin embargo hay que recordar que fue realizado con fines exploratorios y que no necesariamente debe repetirse en su totalidad a nivel industrial, pues en éste siempre se busca disminuir los costos en la elaboración de un producto. Una purificación parcial del KAI disminuiría el trabajo y los costos sin modificar su acción antihelmíntica, por lo que podría utilizarse para hacer preparaciones médicas. Otra alternativa viable sería la obtención de extractos crudos para usarlos de la misma

manera. En ambos casos, habiendo realizado estudios previos para demostrar que ninguno de los componentes adicionales es nocivo para la salud.

Por otro lado, existen también en el mercado otros antihelmínticos, aunque de menor potencia. Lo conveniente, por lo tanto, sería comparar los costos de elaboración de éstos medicamentos con los costos de los preparados de KAI mencionados anteriormente.

Si por su menor rentabilidad frente a otros antihelmínticos el KAI pudiera ser desplazado, no sucede lo mismo en su uso como herramienta en Neurobiología.

Hasta la fecha se han descubierto muchos compuestos capaces de producir lesiones selectivas sobre las neuronas, lo que permite, como se planteó con anterioridad, nuevas oportunidades de avance en ésta ciencia. Sin embargo, el KAI ha mostrado ser el más potente neuroexcitador de todos ellos por lo que a partir de 1970 se han incrementado sus estudios sin que hasta ahora haya otro que cause la naturaleza e intensidad de sus efectos. Para ser usado en este campo, las sustancias deben ser de alta pureza, con la calidad requerida, la casa SIGMA Chemical Co. produce KAI cuyo precio ha variado con respecto al tiempo (fig. 10, Anexo). Si bien en nuestro país no existe mercado para el ac. kainico como herramienta en Neurobiología -sólo un investigador lo utiliza (López Colomé, 1986), nuestras

condiciones económicas son tales que podría plantearse un proceso corto de aislamiento y exportarse a países industrializados para una purificación total.

4.3 CONTENIDO DE AMINOACIDOS LIBRES.

Los aminoácidos identificados presentados en la tabla III coinciden con los obtenidos por Impellizzeri y col. (1975) para Centroceras clavulatum del Mediterráneo, con la única diferencia de que ellos no detectaron histidina, pero sí trazas de arginina, que no se encontró en este estudio. Los aminoácidos no identificados podrían estar relacionados con los aminoácidos libres no comunes considerando la abundancia de éstos en esta especie: ácido baikiánico, ácido pipercolico, citrulina, L-sulfóxido de metionina, taurina, etc. (Ibid). Sus posiciones en los cromatogramas de la fig.6 sugieren una naturaleza acídica para unos, mientras que otros presentan características de aminoácidos neutros. Sin embargo, con este tipo de análisis no es posible asignar estructuras químicas.

Una observación importante y que era de esperarse en base a la bibliografía, es la escasez de aminoácidos básicos. Sólo se detectó lisina e histidina, en bajo

contenido e inclusive la presencia de histidina es dudosa. Estos resultados concuerdan con los de Impellizzeri y col. (1975) para C. clavulatum que se caracteriza por trazas de arginina, ausencia de histidina y baja concentración de lisina; así mismo Ji y col. (1980) encontraron lo mismo para Porphyra yezoensis. Por su parte, Takagi (1967) reporta que Laurencia nipponica no contiene arginina e histidina, con mínima concentración para lisina.

Por otra parte, comparando el extracto de otoño con el de verano (considerando el número máximo de aminoácidos) en esta misma fig. 6, puede apreciarse la diferencia. C. clavulatum posee mayor variedad en los extractos de verano que en el de otoño, de la misma manera que Cystoceira barbata y a diferencia de Laurencia papillosa, que presenta un mayor número en otoño (Mohsen y col., 1975). Esto reafirma la proposición de Mohsen (Ibid) de que las variaciones cualitativas no sólo dependen de la estación, sino también de la especie en particular.

Los resultados de la tabla IV concuerdan con el grupo de Impellizzeri y col., quienes encontraron en C. clavulatum que alanina, ac. glutámico, glicina y ac. aspártico fueron los aminoácidos libres proteicos más abundantes. Por su parte Fattorusso y Piattelli (1980) proponen que en general la composición de las algas se

caracteriza por bajas concentraciones de aminoácidos básicos y una dominancia de alanina, ac. glutámico y ac. aspártico. Lewis (1965) en una revisión bibliográfica sobre el contenido de aminoácidos libres en algas marinas de la India reporta lo mismo que los anteriores investigadores.

Por otro lado, Ji y col. (1980) encontraron que alanina, ac. glutámico y ac. aspártico son los aminoácidos más abundantes en *Porphyra yezoensis*, proponiendo que éstos aminoácidos deben ser muy activos en el metabolismo durante el crecimiento del alga. Fattorusso y Piattelli en 1980 propusieron que la abundancia de aminoácidos neutros (principalmente alanina), ac. glutámico y ac. aspártico en la mayoría de las algas se debe a su relación con el metabolismo de los ácidos tricarbóxicos. Lo anterior es aceptable si se toma en cuenta las características estructurales de éstos aminoácidos y el papel de ésta ruta metabólica en la obtención de energía por células aeróbicas, ya que:

- a) La estructura de alanina facilita su introducción al ciclo (vía piruvato) con una ligera modificación (Lehninger, 1982).
- b) Acido glutámico y ácido aspártico se introducen más directamente por puntos específicos al ciclo (Ibid)

La variación estacional en el contenido total de los aminoácidos libres de *C. clavulatum* aparece en la tabla V

La diferencia entre ambos veranos, aunque no fue muy grande (aproximadamente 0.7%) podría deberse a la diferencia en la cantidad de material biológico tratado.

Aunque estos resultados cuantitativos no coinciden con los de otros investigadores, pueden señalarse ciertas relaciones: Mohsen y col. (1975) también encontraron que el contenido de aminoácidos libres más alto se presentó en la muestra de otoño (3.0%) seguido por verano (1.8%) para Laurencia papillosa y Enteromorpha intestinalis con 2.4% y 1.8% para otoño y verano respectivamente y concluyen que los aminoácidos son más abundantes en otoño e invierno que en primavera y verano, similar a lo que se encontró en C. clavulatum. Los resultados de la tabla V podrían explicarse en base a la asimilación de aminoácidos por macroalgas ya que la mayoría de las algas se desarrollan más rápidamente durante primavera y verano, incorporando de alguna manera los aminoácidos libres en el metabolismo. Por otra parte estos resultados son diferentes a los que reporta Mohsen y col. (1975) para Cystoceira barbata que posee un mayor contenido de aminoácidos libres durante verano que en otoño.

5.0 CONCLUSIONES .

A pesar de que el presente trabajo sobre C. clavulatum se considera preliminar pueden obtenerse algunas conclusiones que darán la pauta para posteriores estudios:

- 1) Se observaron variaciones estacionales en el contenido de carbohidratos, cenizas, proteínas, lípidos y fibra cruda.
- 2) Centroceras clavulatum del área de estudio mostró variación estacional en el contenido de ácido kaínico siendo el de la muestra de otoño el más elevado (186.54 mg/Kg peso seco) y el de verano '85 el más bajo.
- 3) La obtención de ácido kaínico en grandes cantidades por Intercambio Iónico sería un proceso largo y tedioso.
- 4) En cuanto a los aminoácidos libres alanina, glicina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico resultaron los predominantes.
- 5) La mayor concentración de aminoácidos libres se encontró en muestras de otoño, aunque la variedad fue mayor durante verano.

6.0 RECOMENDACIONES.

Algunas recomendaciones prácticas son las siguientes:

Las dificultades en la recolección de Centroceras clavulatum por su tamaño y distribución sugiere la creación de cultivos de ésta especie para obtener ejemplares libres de contaminantes, para investigar las condiciones óptimas de desarrollo y también para preservar el recurso.

Por otro lado, sería conveniente analizar químicamente las especies más abundantes del género Centroceras con el objeto de detectar en ellas ácido kaínico, además de realizar estudios de variación geográfica en C. clavulatum tendientes a determinar el rendimiento máximo y seleccionar el lugar más adecuado para su extracción.

La búsqueda de otros métodos químicos diferentes del Intercambio Iónico para obtener los mismos resultados, pero a su vez más prácticos a nivel industrial, también es recomendable.

Una alternativa del ácido kaínico como antihelmíntico sería en la administración en forma de extractos semicrudos o fracción de aminoácidos.

En Neurobiología, la obtención de ácido kaínico a partir de Centroceras clavulatum podría ser rentable considerando las dosis requeridas en cada experimento. Para

esto se requiere un alto grado de pureza del ácido kaínico por lo tanto se podría realizar una purificación parcial del extracto crudo y exportarse como tal a países industrializados para su purificación total.

7.0 BIBLIOGRAFIA.

- ABBOTT, I. A. y G.J. Hollenberg. 1976 Marine Algae of California. Stanford Univ. Press. Stanford, Ca.
- AGUILAR-ROSAS, L.E. 1980 Algas Bentónicas de la Bahía de Todos Santos, Baja Calif. Tesis. Esc. Sup. de Ciencias Marinas. U.A.B.C. Ensenada, Baja Calif.
- AGUILAR-ROSAS, R. 1980 Algas Bentónicas y Fanerógamas del Estero de Punta Banda, Baja California Durante Verano y Otoño. Tesis. Esc. Sup. de Ciencias Marinas U.A.B.C. Ensenada, Baja Calif.
- AGUILAR-ROSAS, R. 1987 Comunicación personal. Fac. de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja Calif.
- AGUILAR-ROSAS, M. A. 1982 Un Estudio Sobre las Algas Marinas Bentónicas de Baja California. Tesis. Esc. Sup. de Ciencias Marinas. U. A. B. C. Ensenada, B.C.
- A.O.A.C. 1975 Official Methods of Analysis. 12th ed. Ass. of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- BAKER, J.T. 1984 Seaweeds in pharmaceutical studies and applications. Hydrobiologia 116-117:29-40.
- BASLOW, M.H. 1977 Marine Pharmacology. A Study of Toxins and Other Biologically Active Substances of Marine Origin. Robert E. Krieger Publ. Co., N. Y.
- BASSON, P.W. 1979 Marine algae of the Arabian Gulf coast of Saudi Arabia. Bot. Mar. vol. XXII Fasc.2 p.65-82.
- BERENQUER, J. y J.M. Selva 1967 Actividad del kainato de dietilendiamina frente a los helmintos parásitos intestinales de la gallina. Rev. Iber. Parasit. 27(1/2):25-37. Biol. Abstr. 26784(1969).

- BORQUEZ-GARCÉS, E. 1982 Estudio Estacional de las Algas Bentónicas Desde Punta Santo Tomás Hasta Punta China, Baja California, México. Tesis. Esc. Sup. de Ciencias Marinas. U.A.B.C. Ensenada, B. C.
- COOPER, T.G. 1977 The Tools of Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- CORMACI, M., A. Duro y G. Furnaci 1984 On reproductive phenology of Ceramiales (Rhodophyta) of East of Sicily. Bot. Mar. vol. XXVII p.95-104.
- CHANG-LEE, M.V. 1983 Análisis Químico y Propiedades Físicas de los Agares de Gracilaria verrucosa y Pterocladia capillacea. Tesis. Esc. Sup. de Ciencias Marinas U.A.B.C. Ensenada, Baja Calif.
- DAWES, C.J. 1986 Botánica Marina. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México.
- DAWSON, E.Y. 1946 A Guide to Literature and Distributions of Marine Algae of Pacific Coast of N.A. Memoirs of the Southern California Academy of Sci. vol. 3, No.1 p.101.
- DAWSON, E.Y. 1962 Marine Red Algae of Pacific Mexico. V Ceramiales: Ceramiaceae, Delesseriaceae, Allan Hancock Pacific Expedition, 26.
- DER MARDEROSIAN, A. 1968 Current status of drugs compounds from marine sources. En: Freudenthal, H.D. (Ed). Drugs From the Sea. Mar. Tech. Soc. Washington, D.C. p. 19-66.
- DER MARDEROSIAN, A. 1979 Marine Pharmacology. Focus on algae and microorganisms. En: Hoppe, H.A. et al. (Eds) Marine Algae in Pharmaceutical Science. Walter de Gruyter. Berlin, p. 165-202.

- FATTORUSSO, E. y M. Piatteli 1980 Amino acids from marine algae. En: Scheuer, P. (Ed.). Marine Natural Products. Chemical and Biological Perspectives. vol. III. Academic Press, Inc., N.Y. p. 95-140.
- FENICAL, W. 1980-82 Chemical studies of tropical marine algae and coelenterates. Marine Chemistry and Pharmacology Program. En: Biennial Report Calif. Sea Grant College Program. Report No. R-CSGCP-013 p. 195-200.
- FIBIGER, H.C. 1978 Kainic acid lesions of the striatum: a pharmacological and behavioral model of Huntington's disease. En: McGeer, E. et al. (Eds). Kainic Acid as a Tool in Neurobiology. Raven Press. N.Y., p. 161-176.
- FLORVILLE-ALEJANDRE, R.T. 1987 Estimación del Efecto de Hidrólisis Química Ácida en Agar de Gracilaria lemaneiformis. Tesis. Fac. de Ciencias Marinas. U.A.B.C. Ensenada, B.C.
- GARZA-BARRIENTOS, A.M., S. Martínez Lozano y M.A. Escalante 1984 Contribución al conocimiento de las algas marinas bentónicas de Ciudad Madero, Tamaulipas, México. Phycol. Lat.-Amer. 2 p.103-125.
- HASIMOTO, Y. (Ed) 1979 Marine Toxins and Other Bioactive Marine Metabolites. Japan Scientific Soc. Press. Tokyo.
- HOPPE, H.A. 1979a Marine algae and their products and constituents in pharmacy. En: Hoppe, H.A. et al. (Eds) Marine Algae in Pharmaceutical Science. Walter de Gruyter. Berlin. p. 25-120
- HUERTA-MURQUIZ, L., A.C. Mendoza-González y L.E. Mateo-Cid

1987 Avance sobre un estudio de las algas marinas de la Península de Yucatán. *Phytologia* vol.62 No.1 p. 23-53.

IMPELLIZZERI, G., G. Mangiafico, G. Oriente, M. Piattelli, S. Sciuto, E. Fattorusso, S. Magno, C. Santacroce y D. Sica. 1975 Amino acids and low-molecular-weight carbohydrates of some marine red algae. *Phytochem.* 14:1549-1557.

INDO-PACIFIC Fisheries Council Regional Studies. 1965 Use of seaweeds directly as human food. No. 2 F.A.O. Regional Office for Asia and the Far East. Bangkok, Thailand.

JOHNSTON, G.A., D.R. Curtis, J. Davies y R.M. McCulloch 1974 Spinal interneurone excitation by conformationally restricted analogues of L-glutamic acid. *Nature* 248: 804-805.

LEHNINGER, A. 1982 *Bioquímica*. 2a. Edición. Editorial Omega. Barcelona, España.

LEWIS, E.J. 1965 A review on protein, peptide and free amino acid contents of indian marine algae. *Proc. Natl. Inst. Sci. India.* 30: 296-308.

LOPEZ-COLOME, A.M. 1986 Comunicación personal. Instituto de Fisiología Celular. U.N.A.M.

MARTIN, D. F. y G. M. Padilla (Eds) 1973 *Marine Pharmacognosy. Actions of Marine Biotoxins at Cellular Level*. Acad. Press, Inc., N.Y.

MCGEER, E.G., P.L. McGeer y K. Singh. 1978 Kainate-induced degeneration of neostriatal neurons: dependency upon corticostriatal tract. *Brain Research*, 139:381-383.

MCGEER, P.L., E.G. McGeer y T. Hattori. 1978 Kainic Acid as a Tool in Neurobiology. En: McGeer, E. et al. (Eds). *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. Raven Press.

N. Y., p. 123-138.

- MOHSEN, A.F., A.M. Kharboush, A.F. Khaleafa, A. Metwalli y Y. Azab. 1975 Amino acid pattern and seasonal variation in some marine algae from Alexandria Bot. Mar. vol. XVIII:167-178.
- MURAKAMI, S., T. Takemoto, Z. Shimizu y K. Daigo. 1953 Effective principle of *Digenea simplex*. Japan J. Pharm. and Chem. 25: 571-574. Chem. Abstr. 58,4774 (1963).
- NISIZAWA, K. 1979 Pharmaceutical studies on marine algae in Japan. En: Hoppe, H.A. et al. (Eds) Marine Algae in Pharmaceutical Science. Walter de Gruyter. Berlin, p. 243-263.
- NORRIS, J.N. 1975 Marine Algae of the Northern Gulf of California. A dissertation submitted in partial satisfaction of the requirements for the degree of Ph. D. in Biology. Univ. Santa Barbara, Cal.
- OLNEY, J.W. 1978 Neurotoxicity of excitatory amino acids. En: McGeer, E. et al. (Eds) Kainic Acid as a Tool in Neurobiology. Raven Press. N. Y., p. 95-122.
- PLUMMER, D. 1981 Bioquímica Práctica. Editorial McGraw-Hill Latinoamericana, S.A. México.
- PRICE, J.H. y D.M. John 1979 The marine benthos of Antigua (Lesser Antilles) II. An annotated list of algal species. Bot. Mar. vol. XXII p. 327-331.
- ROSENSTEIN, E. 1987 Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. F.L.M. 33a Ed. Mexicana., México.
- SATODA, I., N. Mitsumory S. Matsuo. 1956 Colorimetric detection and determination of kainic acid. Yakugaku Kenkyu 28:648-661. Chem. Abstr. 17, 15893-4 (1957).

- SCHEUER, P. 1983 (Ed) Marine Natural Products. Chemical and Biological Perspectives. vol. V. Academic Press, N.Y.
- SECRETARIA DE MARINA 1974 Estudio Geográfico de la Región de Ensenada, B. C. Dir. Gral. de Ocenografía y Señalamiento Marítimo. México, D.F.
- SHINOZAKI, H 1970 Actions of several antihelmintics and insecticides on rat cortical neurones. Brain Research. 24:368-371.
- SHINOZAKI, H. 1978 Discovery of novel action of kainic acid and related compounds. En: McGeer, E. et al. (Eds). Kainic Acid as a Tool in Neurobiolog. Raven Press. N. Y., p. 17-36.
- SMITH, G. 1969 Marine Algae of the Monterey Peninsula California. Stanford Univ. Press. Stanford, Ca.
- STEPHENSON, W.A. 1974 Seaweeds in Agriculture & Horticulture 3ra. ed. Rareaver Publ. Valley, Ca.
- TAKAGI, M., K. Oishi y A. Okumura. 1967 Free amino acid composition of some species of marine algae. Bull. of Jap. Soc. of Sci. Fish. vol. 33(7):669-671.
- TAKAGI, M. 1975 Seaweeds as Medicine. En: Tokida, J. e . Hirose, H. (Eds). Advance in Phycology in Japan. Dr. W. Junk Publ. The Hague. Japan, p.321
- TAKEMOTO, T 1978 Isolation and structural identification of naturally occurring excitatory amino acids. En: McGeer, et al. (Eds). Kainic Acid as a Tool in Neurobiology. Raven Press. N. Y. p. 1-16
- TAMURA, S. 1962 Antihelmintic effect of kainic acid and similar compounds. I. Effect of this compound on the motion of worms and histochemical studies. Yakugaku Zasshi 82:1604-1610. Chem. Abstr. 58(1963).

- TROLL, W. y R. K. Cannan. 1953 A modified photometric ninhydrin method for the analysis of imino acids. J. Biol. Chem. 200:803-811.
- TSENG, C.K. 1944 Utilization of seaweeds. Sci. Monthly. 59:37-46.
- TSENG, C.K. 1984 Chinese seaweeds in herbal medicine. Hydrobiologia 116-117:152-154.
- UENO, Y., H. Nawa, J. Ueyanagi, H. Morimoto, R. Nakamori y T. Matsuoka. 1955 Active components of *Digenea simplex* and related compounds. I. Structure of kainic acid. J. Pharm. Soc. Japan 75:807-811.
- UENO, Y., K. Tanaka, J. Ueyanagi, H. Nawa, Y. Sanno, M. Honjo, R. Nakamori, T. Sugawa, M. Uchibayashi, K. Osugi y S. Tatsuoka 1957 Proc. Jpn. Acad. 33:53-58
- URBIETA-GONZALEZ, E. 1982 Estudio Estacional de las Algas Bentónicas de las Costas del Ejido Eréndira, B.C. Tesis. Esc. Sup. de Ciencias Marinas. U.A.B.C. Ensenada, B.C.
- WINDHOLZ, M. (Ed) 1983 The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 10th. ed. Merck & Co., Inc. U.S.A.
- WOELKERLING, W. 1976 South Florida Benthic Marine Algae: Keys and comments. Madison Wisconsin Univ., Miami, Flo.
- YOUNGKEN, H.W. 1968 Sources of drugs from the sea and drug screening. En: Freudenthal, H.D. (Ed). Drugs from the Sea. Marine Technology Society. Washington, D.C., p.15-17.

S. O. ANEXO

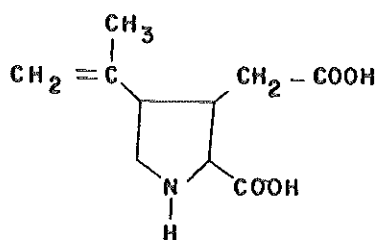
TABLA VI MEZCLA ESTANDAR DE AMINOACIDOS.

AMINOACIDO	MOL/100 MOLES
TRE	4.4
SER	1.3
GLU	8.3
PRO	31.6
GLI	2.7
ALA	34.44
LIS	1.7
ASN	7.8
ASP	2.63
KAI	5.17

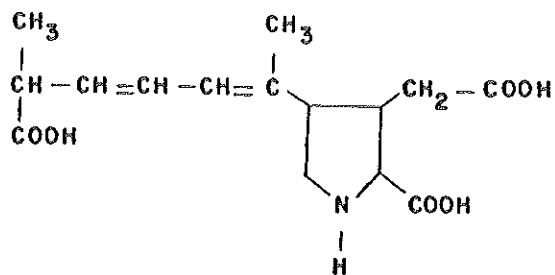
TABLA VII.- VALORES DE Rf OBSERVADO PARA CADA AMINOACIDO IDENTIFICADO EN *C. clavulatum*.

TIPO DE AMINOACIDO	AMINOACIDO	Rf OBSERVADO (MUESTRA)	Rf OBSERVADO (ESTANDAR)
BASICOS	LIS	0.165	0.165
	HIS	0.246 *	0.201
NEUTROS	GLI	0.288	0.282
	ALA	0.385	0.388
	SER	0.285	0.284
	TRE	0.358	0.328
	PRO	0.475	0.403
ACIDOS	GLU	0.339	0.334
	ASP	0.271	0.274
	KAI	0.586	0.587

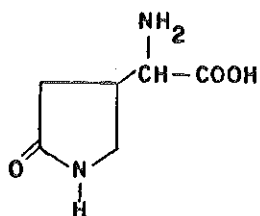
* VALOR DE Rf DUDOSO



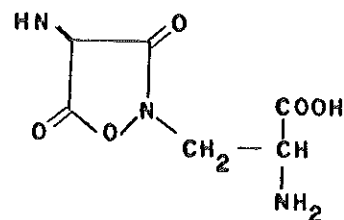
ACIDO KAINICO
(*C. clavulatum.*)



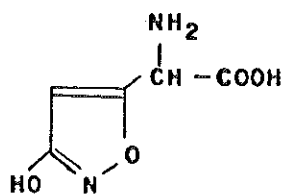
ACIDO DOMOICO
(*chondria armata.*)



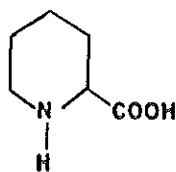
ACIDO TRICOLOMICO
(*Tricoloma muscarium.*)



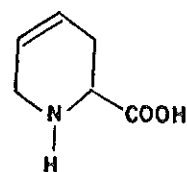
ACIDO QUISCUALICO
(*Quiscualis indica.*)



ACIDO IBOTENICO
(*Amanita strobiliformis.*)



ACIDO PIPECOLICO
(*C. clavulatum.*)



ACIDO BAIKIANICO
(*C. clavulatum.*)

FIG. 9 AMINOACIDOS RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON EL ACIDO KAINICO.

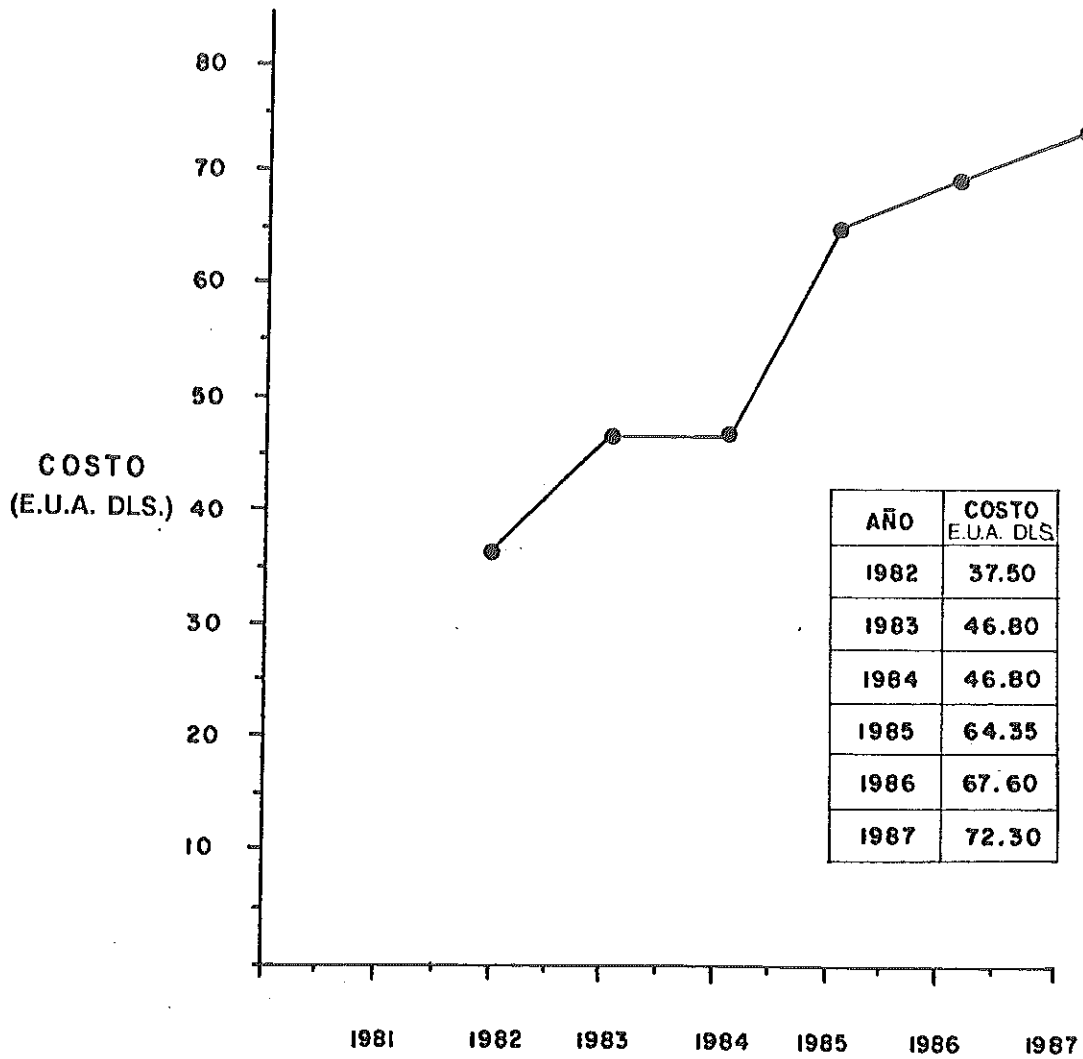


FIG. 10 VARIACION ANUAL DEL COSTO EN DOLARES (EUA) POR GRAMO DE ACIDO KAINICO PURO (SEGUN SIGMA CHEMICAL CO.)

