

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE POSTGRADO



EXTRACCION Y CARACTERIZACION DEL
ACIDO KAINICO DE
Digenia simplex (Wulfen) C. Agardh.

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BOTANICA

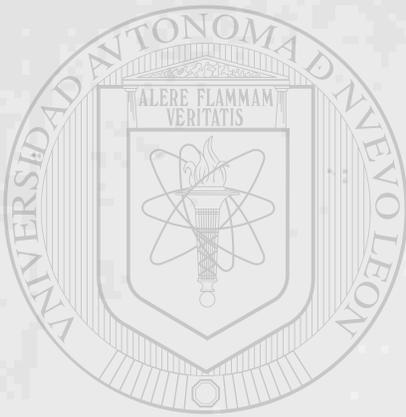
MARIA TERESA ARIZPE LEAL

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
DICIEMBRE, 1998

TM
OK102
A7
1998
c.1



1080087049



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE POSTGRADO



EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL
ÁCIDO KAINICO DE
Mugwort simplex (Wulfen) C. Agardh.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

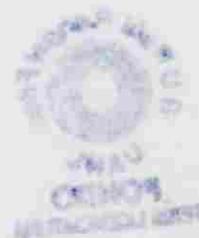
TESIS

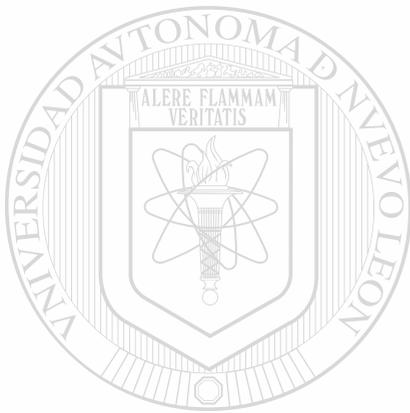
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BOTÁNICA

MARIA TERESA ARIZPE LEAL

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
DICIEMBRE, 1998





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE POSTGRADO



EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO
KAÍNICO DE *Digenia simplex*(Wulfen) C. Agardh.

TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BOTÁNICA.

MARIA TERESA ARIZPE LEAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO
KAÍNICO DE *Digenia simplex*(Wulfen) C. Agardh.**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BOTANICA**

PRESENTA:

MARIA TERESA ARIZPE LEAL

APROBADA

COMISION DE TESIS:

**PRESIDENTE
(DIRECTOR)**


DR. SALOMÓN JAVIER MARTÍNEZ LOZANO

SECRETARIO


DRA. LETICIA HAUAD MARROQUÍN

VOCAL


DRA. MA. JULIA VERDE STARR

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

DICIEMBRE DE 1998.

DEDICATORIA

A Dios:

Gracias porque me diste la oportunidad de realizar mis sueños.

A mi padre:

Sr. Nicandro Arizpe Rodríguez

Gracias por la enseñanza y confianza que me dedicaste.

A la memoria de mi querida madre:

Sra. Enedelia Leal de Arizpe

Gracias por todo tu amor, tus consejos, tu apoyo que dedicaste a mi vida y por los valores inculcados que jamás olvidaré.

A mi esposo:

Arq. Francisco Javier Salinas Cantú

Gracias por tus consejos, ayuda, comprensión, y por brindarme el apoyo para realizar mi trabajo.

A mis adoradas hijas:

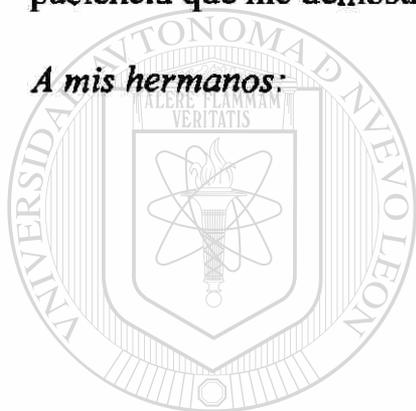
Alicia Enedelia

Diana Margarita

Ana Teresa

Gracias por el amor que siempre me han dedicado, por el impulso y la
paciencia que me demostraron.

A mis hermanos:



Elia

Honorina

María del Carmen

Y

Nicandro

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Gracias por la ayuda y consejos que sirvieron de apoyo a mi formación.®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial a la Rectoría de la Universidad Autónoma de Nuevo León por el interés y apoyo que brinda a sus maestros, incrementando de esta manera la superación académica.

Al Dr. Salomón Javier Martínez Lozano, ya que sin su dirección y apoyo no hubiera sido posible concluir mi trabajo.

A la Dra. Ma. Julia Verde Starr y la Dra. Azucena Oranday Cárdenas por el interés y apoyo que me brindaron en el desarrollo de la parte experimental.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

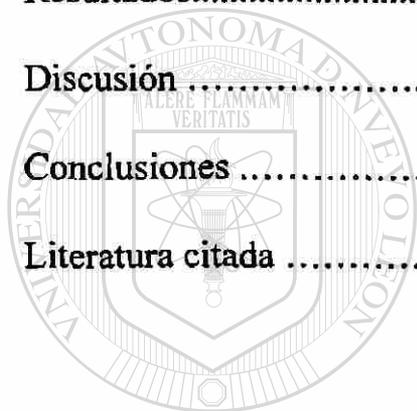
A la Dra. Leticia Hauad Marroquín, por su asesoría y consejos en la realización del mismo.

A la Dra. Ma. De los Angeles Peña del Río por su valiosa colaboración.

ÍNDICE:

Resumen	1
Introducción.....	2
Antecedentes	4
Descripción Botánica	18
Importancia	20
Originalidad y Justificación	21
Hipótesis	22
Objetivos	23
Descripción del área de estudio.....	24
Mapa del área de estudio	26
Fotografías del área de estudio.....	27
Material	29
Metodología	31
Extracción	32
Diagrama para la extracción	33
Resultados en Espectroscopía de RX	37

Biomasa	38
Tabla de valoración de biomasa	39
Gráfica de biomasa, pesos mínimos y máximos	40
Análisis Bromatológico.....	41
Gráfica de bromatología.....	42
Resultados.....	43
Discusión	44
Conclusiones	46
Literatura citada	48



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

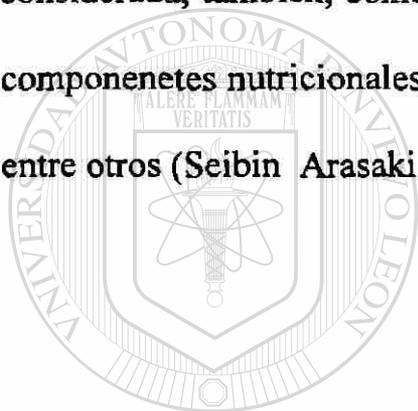
Digenia simplex es un vegetal marino con potencial alimenticio, su metabolito principal, el ácido kaínico, está evaluado como agente activo contra parásitos intestinales, así como herramienta útil en neurobiología. En el presente trabajo se caracterizó y cuantificó el ácido kaínico determinándose la concentración de éste en la planta, colectada en la Laguna Madre en el municipio de San Fernando, Tamaulipas. Una vez en el laboratorio se lavaron, para eliminar la arena, la epifauna y las epífitas. Una parte del material se utilizó para cuantificar la Biomasa, resultando con un 17.43%, peso seco, y la otra se deshidrató para la extracción del metabolito cuyo rendimiento fue de 0.729%. Así mismo se realizó un análisis bromatológico reportándose lo siguiente: Humedad 6.5%, Extracto etéreo 0.1%, Proteínas (% N x 6.25) 12.8%, Extracto libre de nitrógeno (CHO) 13.9%, Cenizas 52.2% y Fibra cruda 14.5%.

INTRODUCCIÓN

La flora algal de los mares de México es abundante y variada dado que se tienen más de diez mil kilómetros de costas. Estas plantas contienen una gran cantidad de metabolitos y algunos aminoácidos de importancia parasiticida, además presenta otros metabolitos de efecto antagónico contra hongos y bacterias (Martínez, 1995).

Digenia simplex está presente en el Mediterráneo, en las regiones más calurosas del Atlántico y Océano Indico, Japón, Filipinas y Australia. Se han encontrado grandes cantidades también en las costas de Florida y Golfo de México. Se ha utilizado por mucho tiempo dentro de la medicina, debido a su componente activo el cual es una mezcla de Ac.Kaínico y Ac. Allokaínico. Su carácter antihelmíntico o su aplicación en la medicina como agente vermífugo en el tratamiento contra *Ascaris*, *Oxyuris*, *Trichuris* y gusanos intestinales como la *Taenia* (Takemoto, T.,1957; Hoope, H., 1979; Chapman, V.J., 1970; Nisizawa, K., 1979).

La aplicación más común de *Digenia simplex* es utilizando el ácido kaínico, que de ella se extrae, el cual se administra a través de infusiones de las frondas secas en personas afectadas por parásitos intestinales. Los Japoneses utilizan ésta planta especialmente en niños, los cuales sufren enfermedades causadas por Nemátodos, Céstoda y Tremátodos. Es considerada, también, como un vegetal de potencial alimenticio debido a los componentes nutricionales como carbohidratos, calcio, fierro, fibra, proteína entre otros (Seibin Arasaki D. Agr. and T. Arasaki, D. Sc., 1983).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANTECEDENTES:

En 1953, Murakamy *et al.*, aisló el ácido kaínico, p.f. 250° (descomp.); $[\alpha]_D^{29} -14.8$ (agua), compuesto activo de *Digenia simplex* (Wulfen) Ag., alga roja ampliamente distribuida en las aguas subtropicales y tropicales del Mediterráneo, el Mar Rojo y el Océano Indico, en las regiones mas calurosas del Atlántico, Japón, Filipinas, Australia y en las costas de Florida, Golfo de México (Mc. Geer *et al.*, 1978). Fue nombrado primero como ácido digénico y subsecuentemente ácido kaínico, (Murakami *et al.*, 1953), después fue nombrada como kaininso, nombre japonés del alga. Su primer aislamiento fue por extracto acuoso de material seco y separación por cromatografía de capa fina con Alúmina, posteriormente se aisló de *Centroceras clavulatum*, un miembro de las Rhodophytas pertenecientes al mismo orden (Ceramiales) de *Digenia simplex*, por extracción con etanol al 70%, y sucesivas cromatografías de intercambio iónico en resinas (Impellizzeri *et al.*, 1975).

En algunas partes del mundo, las especies de algas marinas, como *Digenia simplex*, se usan en varias aplicaciones medicinales. (Chapman, V.J., 1970; Levring, T., 1969; Hoop, H.A. *et al.* 1979; Nisizawa, K. 1979). Por lo

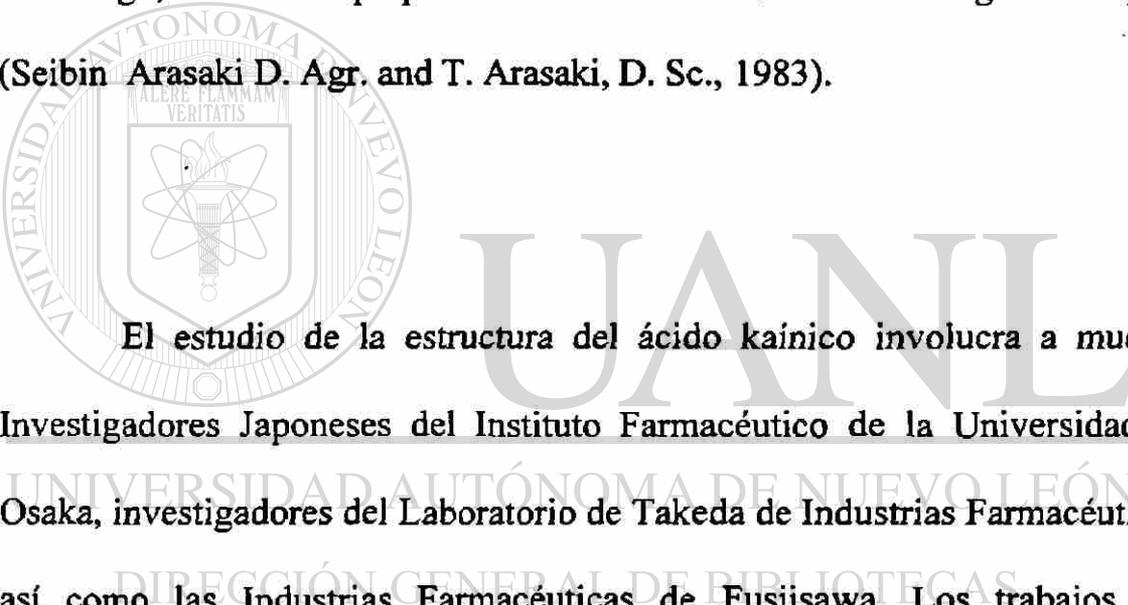
que muchos científicos trabajaron, con antibióticos extraídos de algas marinas, ya que son uno de los potenciales más prometedores en la producción de antibacteriales, antivirales y agentes antifungicidas. El tratamiento en éste tópico ha sido publicado por investigadores dedicados a la industria farmacéutica, considerando que el ácido kaínico es un potente vermífugo cuando es ingerido en la mañana, antes de cualquier alimento (Chapman, V.J. 1970; Constantine, G.H. 1977; Glombitza, K.W.1979; Hope, H.A. 1979; Michanek, G. 1979; Misra, A., Sinha, R. 1979; Nisizawa, K. 1979; Patterson, G.W. 1977). Merck lo menciona en el index contra nemátodos y como una herramienta útil en neurobiología. Una dosis de ácido kaínico entre 5-10 mg **dosis única** en el adulto, produce arriba de un 70% de reducción de parásitos, (Baslow, 1977).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

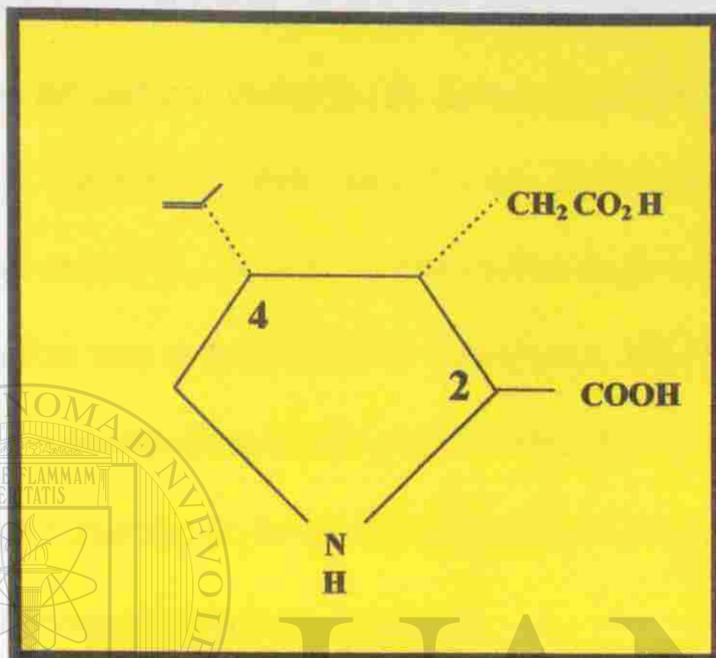
Sugimoto (1960), aplicó 20 mg del α -L-ácido kaínico en 5 dosis por cada niño de primer año de primaria, los cuales estaban infectados con parásitos intestinales causando una disminución, después de la dosis, en el número de huevos de gusanos excretados hasta de un 60.5% ,en los 43 individuos probados. Esta eficacia de ácido kaínico comprobó que es mucho mayor que las pruebas similares realizadas con Santonin en niños de 4°. Año de primaria.

En Japón *Digenia simplex* se recoge de aguas cálidas alrededor de Okinawa en el Mar Chino. El extracto obtenido ha sido aplicado en niños menores de 10 años afectados por parásitos intestinales, cuyos resultados han sido positivos, su aplicación debe ser moderada para que no tenga efectos colaterales. Una solución al 1.5% del ac. káinico presenta un fuerte efecto vermífugo, el cual es preparado con las frondas secas de *Digenia simplex* (Seibin Arasaki D. Agr. and T. Arasaki, D. Sc., 1983).



El estudio de la estructura del ácido káinico involucra a muchos Investigadores Japoneses del Instituto Farmacéutico de la Universidad de Osaka, investigadores del Laboratorio de Takeda de Industrias Farmacéuticas, así como las Industrias Farmacéuticas de Fusjisawa. Los trabajos son reportados en una serie de publicaciones en 1955 (Ueno, *et al.*, 1955a,b, ; Honjo *et al.*, 1955; Murakami *et al.*, 1955c,d; Miyasaki, *et al.* 1955a,b; Sanno *et al.*, 1955) , la parte experimental mas significativa está basada en la degradación química y sistemas de degradación de productos, asignando al ácido káinico la estructura de ácido 2 carboxi-3-carboximetil-4 isopropenil-pirolidina (Ueno *et al.* 1955 a,b).

La estereoquímica absoluta del ácido káinico fue basada en las evidencias anteriores. Las curvas de rotación específica, sugieren que pertenece a la serie L que determina la estereoquímica del carbono dos (C-2) (Morimoto, 1955f). Se dedujo la configuración del carbono tres (C-3) de la relación del *trans* entre el grupo carboxilo con el carbono dos (C-2) y el ácido acético de la cadena lateral en el carbono tres (C-3). Un anhídrido cíclico estable, se obtiene solo después de la inversión en la configuración del carbono dos (C-2) (Morimoto, 1955a,b,d,f). Finalmente se estableció la estereoquímica del carbono cuatro (C-4), considerando que el grupo isopropenyl debe ser *cis* con relación al grupo CH₂COOH como dos formas estables de la lactona por tratamiento con H₂SO₄ (Morimoto y Nakamori: 1956a,b). La estructura del ácido káinico fue confirmada por análisis de rayos X y de kainato de zinc hidratado (Watase y Nitta, 1957; Tanaka *et al.*, 1957).



Estructura del ácido kaïnico

ác. 2 carboxi-3-carboximetil-4 isopropilenpirrolidina

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Además del ácido kaínico *Digenia simplex* produce, en menores cantidades el ácido allokaínico con p.f.237° que difiere del ácido kaínico en la configuración del carbono cuatro (C-4). Este se aisló del líquido original del ácido kaínico mostrando débiles propiedades antihelmínticas (Morimoto, 1955f; Murakami, *et al.*, 1955c). La elucidación de la estructura está basada en la correlación con el ácido kaínico (Morimoto, 1955a; Murakami *et al.*, 1955d). Las evidencias importantes fueron deducidas de la identificación de los dihidroderivados del ácido allokaínico con el ácido isokaínico obtenido del ácido kaínico por tautomerización ácida.

Así mismo Morimoto (1955a) marca la diferencia del ácido allokaínico y del kaínico en la configuración del Carbono 4.

La estereoquímica absoluta del ácido allokaínico se dedujo del ácido kaínico, y de la formación de una lactona cíclica muy inestable la cual se obtuvo por tratamiento con H₂SO₄, considerando la relación *trans* del isopropenil y ácido acético (Morimoto y Nakamui, 1956 a,b; Auterhoff, H., 1961; Chapman, V. J., 1970).

OTRAS APLICACIONES

Como antiagregante plaquetario, el extracto crudo de *Digenia simplex*, en presencia del sodio-laminarin-sulfato. (Chopra *et al.*, 1969).

Su actividad antibiótica según Saito y Samejima (1955) quienes estudian los efectos inhibidores del ácido kaínico sobre la actividad antibiótica contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Proteus vulgaris* y *Escherichia coli*. La extracción de ácido kaínico se realizó con metanol al 80%, se concentró el extracto en un jarabe dividiendo la parte soluble y la parte insoluble. Las 2 fracciones se adicionaron a los cultivos de bacterias después de una dilución apropiada, (butanol: ácido: agua, 4:1:1 v/v) de 200 a 400 ppm, la parte soluble en *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* durante 24 y 48 horas observándose un efecto inhibidor positivo en los 2 períodos y la parte insoluble con diluciones de 200 y 2000 ppm durante 48 horas para *B. mesentericus*, *Micrococcus pyogenes* y *Proteus vulgaris*, resultando el efecto inhibidor positivo. El crecimiento de las cuatro enterobacterias en las muestras fueron evaluadas, en donde la sustancia inhibidora soluble emigra con un Rf valuada en 0.35 por cromatografía de papel.

Su valor nutricional ha sido evaluado en 100 g. de la muestra seca determina la presencia de ácido ascórbico, ceniza, fibra, carbohidratos, metionina, caroteno, tiamina, niacina, triptófanos, lisina, riboflavina, Ca, P, Fe, N,. (Heinz A. Hoppe, 1979; Tore Levring, 1969).

Como Insecticida, debido a los componentes volátiles presentes en *Digenia simplex*, los japoneses reportan la presencia, después del ácido kaínico, de metilmercaptanos, ac. fórmico, ac. acético, ac. propiónico, ac. butírico, ac. isovalérico, ac. palmítico, ac. n-capróico, ac. caprílico, ac. mirístico, ac. linólico, p-Cresol, furfural, α -metilfurfural, n-valeraldehído, benzaldehído, 1,8-cineol, D-limoneno, linalool (Seibin y Arasaki ,T. 1983).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Como droga neurotóxica, Sarkisian Matthew R. et al. (1997), en el hospital de niños, departamento de neurología, de la escuela médica de Harvard, probaron los efectos convulsivos al hacer administraciones múltiples de ácido kaínico en ratas, observando su comportamiento y el aprender espacial en función del cerebro, utilizado para determinar los efectos a largo plazo de las captaciones seriales durante la ontogenia en ratas, cuyas dosis se aplicaron 4 veces, intraperitonealmente, (i.p.), en intervalos de dos días, al

comparar los efectos se observó daño histológico, debido a las convulsiones causadas por la administración del ácido kaínico. En ratas con cerebro inmaduro el efecto causó captaciones con un tiempo de espera progresivamente más largo al inicio, pero disminuyendo severamente en las siguientes inyecciones, en contraste con las ratas adultas en las cuales causó severos daños después de cada una de las 4 inyecciones aplicadas. Esto muestra que una sola inyección de ácido kaínico causa un estatus prolongado de epilepsia, la cual persiste por varias horas, conduciendo a severos daños histológicos y de comportamiento en ratas adultas pero no en ratas con cerebro inmaduro las cuales están libres de daños patológicos y secuelas cognitivas.

Cook, M.T., and Crutcher, K.A. (1986), reportan que las células piramidales en el hipocampo de la rata no son destruidas por la administración del ácido kaínico intraventricular o intraperitonealmente. Pero al examinar las características neurotóxicas del ácido kaínico por vía intrahipocampal en ratas, causó una pérdida significativa en las células piramidales en ratas neonatales. Los estudios demuestran que las características neurotóxicas del ácido kaínico se muestran después de aplicar 1.0 microgramo, en 6 repeticiones, a ratas de 5 y 9 días de nacidas, causando

la muerte de las células piramidales en ambos. La susceptibilidad del ácido kaínico en neuronas piramidales aumenta en función de la edad de la rata. El hipocampo es más vulnerable al ácido kaínico en ratas adultas, incrementándose la sensibilidad de las células piramidales en el área CA3 el cual es paralelo al desarrollo, es decir una acción citotóxica directa vía receptores postsinápticos así como la sensibilidad creciente debido a la presencia de entradas de información excitatoria.

Sandor, P., et al. (1992) reportan que al administrar ácido kaínico en el alimento a ratas masculinas causa cambios del peso corporal, y disturbios del sistema motor, así mismo causa lesiones del globus pallidus (GP). Para reducir los daños, el ácido kaínico, fue aplicado electroforéticamente por medio de micropipetas de cristal (10-15 micrones), dando lugar a afagia y adipsia, y a una disminución rápida del peso corporal. Los animales lesionados mostraron disturbios motores permanentes y dificultades temporales en la orientación hacia los estímulos sensoriales. Concluyendo que la inducción del ácido kaínico causa destrucción selectiva de las neuronas del globus pallidus dando lugar a un desorden complejo en la motivación, sensorimotora, así como a los componentes metabólicos.

Zhang, X., et al (1997), reportan que una inyección del ácido kaínico en ratas provoca un ataque en sus extremidades, parecido a un ataque en el lóbulo temporal del humano, la forma mas común de la epilepsia humana. Se presenta en fases; se paraliza, se agita, se produce hiperactividad , se reanima, y se colapsa.

Guldin Wo. (1982), describe una nueva técnica para producir lesiones en las regiones locales y distantes del cerebro, afectando las neuronas corticales. En éste método se utilizaron ratas, a las cuales se les inyectó el ácido kaínico en tejido epidural en períodos de 2, 4, 6, y 8 días. Las lesiones locales corticales después de aplicar el ácido kaínico dieron lugar a un daño neural de la corteza subyacente, y a un número considerable de áreas dañadas, distante de la lesión local cortical.

Halonen T, et al. (1995), utilizaron Vigabatrin como uno de los medicamento que protegen contra el efecto neurotóxico del ácido kaínico inducido al hipocampo en ratas. El efecto neuroprotector del Vigabatrin (gamma-vinilo, GABA, VGB) fue probado (500 o 1000 mg/kg, i.p.) 24 horas antes de inducir la dosis del ácido kaínico (9 mg./ kg. i.p.). La dosis más alta

de VGB atenuó la severidad de las convulsiones ($P < 0.05$) pero no tenía ningún efecto en el desarrollo o generalización de convulsiones. De cualquier modo, VGB disminuye el daño neural inducido por el ácido kaínico. Esta droga se usa como antiepiléptica, en tratamientos como el síndrome de Lennox-Gastaut y síndrome Oeste (espasmos infantiles). Se puede administrar en el alimento y sus efectos son adormecimiento, fatiga, dolor de cabeza, trastornos estomacales, ganancia de peso y problemas de visión.

Hata M. y Nippon Yakurigaku Zasshi (1994), estudiaron los efectos al exponer una dosis (3 mg/kg disueltos en agua destilada) de ácido kaínico en ratas de 11 a 14 y de 17 a 19 días de gestación. Las alteraciones observadas fueron convulsiones espontáneas, y los resultados indicaron que la exposición a prenatales a una dosis de ácido kaínico, afecta el crecimiento y desarrollo de la conducta durante los periodos infantiles en ratas. Estas alteraciones en el crecimiento y conducta aparecen con una correlación entre los 13 a 18 días de vida fetal, que es el tiempo en el que hay desarrollo neurogénico en el hipocampo, hipotálamo y corteza cerebral.

Shytle RD. et al. (1995). Comprobaron que la administraron del ácido kaínico en el sistema general del cuerpo en ratas, produce un estatus de rigidez

seguida de convulsiones, aunque el ácido kaínico daña el sistema neurotransmisor, poco se sabe acerca de la posible influencia en su control o regulación. En éste estudio se utilizó la nicotina como un bloqueador al efecto que pueda causar la aplicación del ácido kaínico en el cerebro. Se utilizaron 2 grupos de ratas, al primero se les administró ácido kaínico (12.0 mg/kg) y a el segundo grupo fueron pretratadas con nicotina (0.5 mg/kg), y después de 15 minutos se les administró 12.0 mg/kg de ácido kaínico, entre los 45 y 120 minutos posteriores a la inyección de ácido kaínico, las ratas tratadas con nicotina exhibieron un efecto convulsivo significativamente menor, que el grupo no tratado con nicotina. La respuesta de la nicotina fue causar un potencial neuroprotector hacia la inducción de los efectos causados por el ácido kaínico.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Chastain J.E. Jr; et al. (1989), estudiaron el efecto del ácido kaínico y iones K^+ , Ca^{2+} y Na^+ , extracelularmente, implantándose en la corteza piriforme de la rata o hipocampo por medio de microdiálisis intracraneal. Cada una de las fibras utilizadas en la diálisis eran atadas e implantadas horizontalmente dentro de la corteza piriforme o hipocampo. Aproximadamente 24 horas mas tarde las fibras era difundidas 1 ml/min con solución de bicarbonato (Krebs-Ringer). Se tomaron muestras de la emanación , antes y después de la

administración del ácido kaínico (16 mg/kg, vía i.p), mostrando señales de letargo secuencial, llamadas wet-dog (sacudidas o convulsiones). Resultando que el ácido kaínico induce a un incremento extracelular de iones K^+ y una disminución de iones Ca^{2+} dentro del hipocampo. Y en la corteza piriforme el ácido kaínico incrementa los iones K^+ y Na^+ , lo cual responde con señales pre-convulsivas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

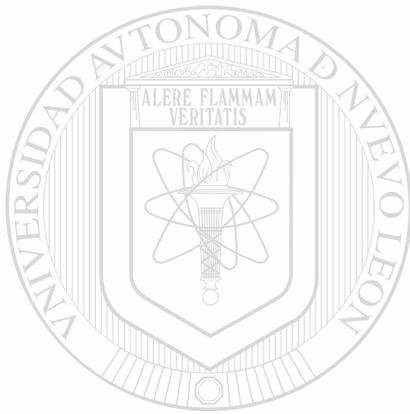
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Digenia simplex (Wulfen) C. Agardh 1823.

Plantas erectas, rojo-rosacéas, de hasta 21 cm de alto; ramificación dicotómica a irregular lateralmente, ejes cartilagosos, sin una célula apical bien desarrollada, ni estructurada polisifónica, de hasta 3 mm de diámetro, médula de grandes células incoloras rodeadas por corteza de pequeñas células pigmentadas; ejes principales con ramillas laterales cortas en espiral, usualmente simples y a veces con ramificación irregularmente alterna, las cuales miden hasta 1 cm de largo y tienen de 6-8 células pericentrales cubiertas por una corteza delgada y tricoblastos en sus ápices; tetrasporangios tetrahédricos en partes distales de las ramillas superiores, de 38-46 micras de diámetro, dichas ramillas irregularmente hinchadas y ecorticadas, cistocarpos ovoides, terminales y laterales sobre las ramillas, de 250-300 micras de diámetro. Encontrada sobre conchas de moluscos a poca profundidad y flotando libremente entre otras algas arrastradas por el oleaje, en otoño-invierno, epifitada comúnmente por varias algas como *Jania*, *Dermatolithon*, *Polysiphonia*, *Cladophora*, entre otras, observados especímenes vegetativos,

cistocárpicos y tetraspóricos; frecuente. Citada para las costas de Florida, Texas, México, Antillas. (Taylor, 1960).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IMPORTANCIA:

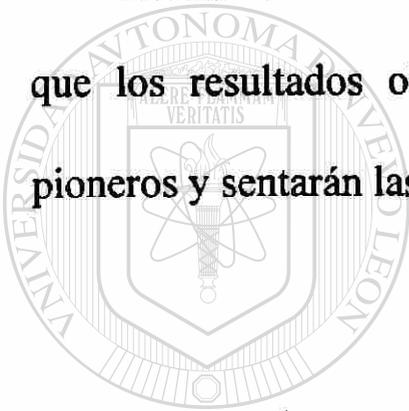
Digenia simplex es un vegetal de alto potencial vermífugo, alimenticio y neurotóxico, su valor se orienta hacia la industria farmacéutica ya que su metabolito, el ácido kaínico, es considerado como un producto muy valioso, por lo que se requiere ahondar su estudio, además de caracterizar y cuantificar su principio activo, contribuyendo en beneficio de la sociedad.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN:

No se ha realizado un trabajo de este tipo en México, por lo que los resultados obtenidos en la presente investigación serán pioneros y sentarán las bases para futuras investigaciones.



UANL

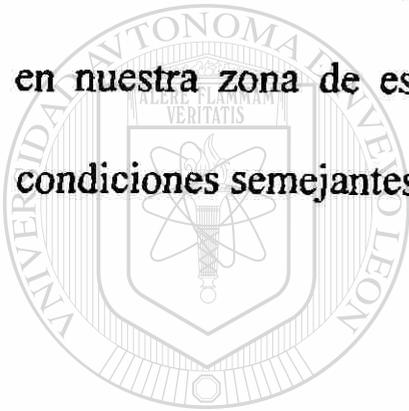
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

HIPÓTESIS

Se ha reportado que *Digenia simplex*, colectada en otros países contiene ácido kaínico, por lo que es factible que la planta colectada en nuestra zona de estudio también lo contenga ya que crece en condiciones semejantes.



UANL

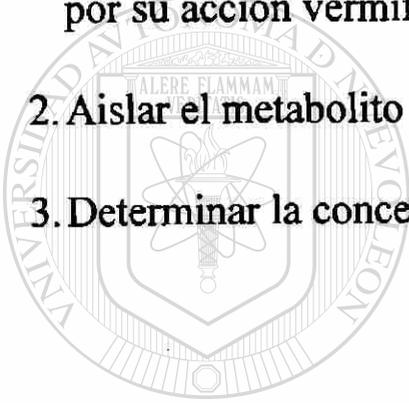
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

OBJETIVOS:

1. Realizar un estudio sistemático químico, bromatológico sobre un recurso natural con posibilidades de ser utilizado potencialmente por su acción vermífuga y fuente alimenticia.
2. Aislar el metabolito activo responsable de la acción vermífuga.
3. Determinar la concentración de ácido kaínico en el alga roja.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

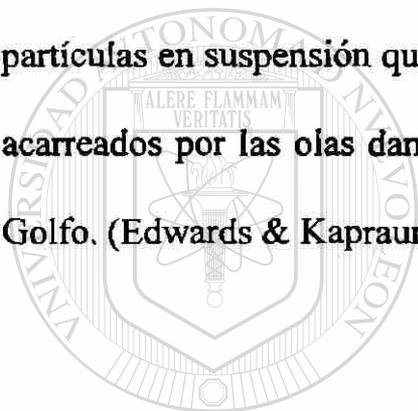
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO:

El área de estudio se encuentra situada entre los 24° 30' y 25° 18' latitud norte y 97° 60' y 98° 50' longitud oeste. Esta constituida por parte de la Laguna Madre, las barras de San Antonio y Los Americanos, las escolleras El Catán y Punta Piedra. Estas dos localidades son las únicas que presentan sustrato rocoso y el resto del litoral presenta un sustrato arenoso donde la flora se desarrolla fijándose a las conchas de animales, troncos de árboles y rocas aisladas. La temperatura promedio es entre los 20° y 24° C; la precipitación media anual es de 600-700 mm en la parte norte y en la parte sur de 700-1000 mm. El área presenta un clima semicálido-subhúmedo con lluvias escasas todo el año (Koopen modificado por García, 1982); los vientos predominantes la mayor parte del año son de sur-sureste; las mareas a finales de primavera y principios de verano sobrepasan la amplitud promedio; el nivel más alto ocurre en otoño en el mes de Octubre y el nivel más bajo se presenta en los meses de junio y julio.

La salinidad que presenta el agua es de alrededor de 36‰ y puede variar en las épocas de lluvia y en las desembocaduras de los ríos: en la Laguna Madre se han registrado salinidades del 100‰ (Hum, 1961).

El agua es turbia con visibilidad baja debido al movimiento de las partículas en suspensión que el oleaje produce, la arena y los sedimentos son acarreados por las olas dando una turbidez característica más alta que la del Golfo. (Edwards & Kapraun, 1973).



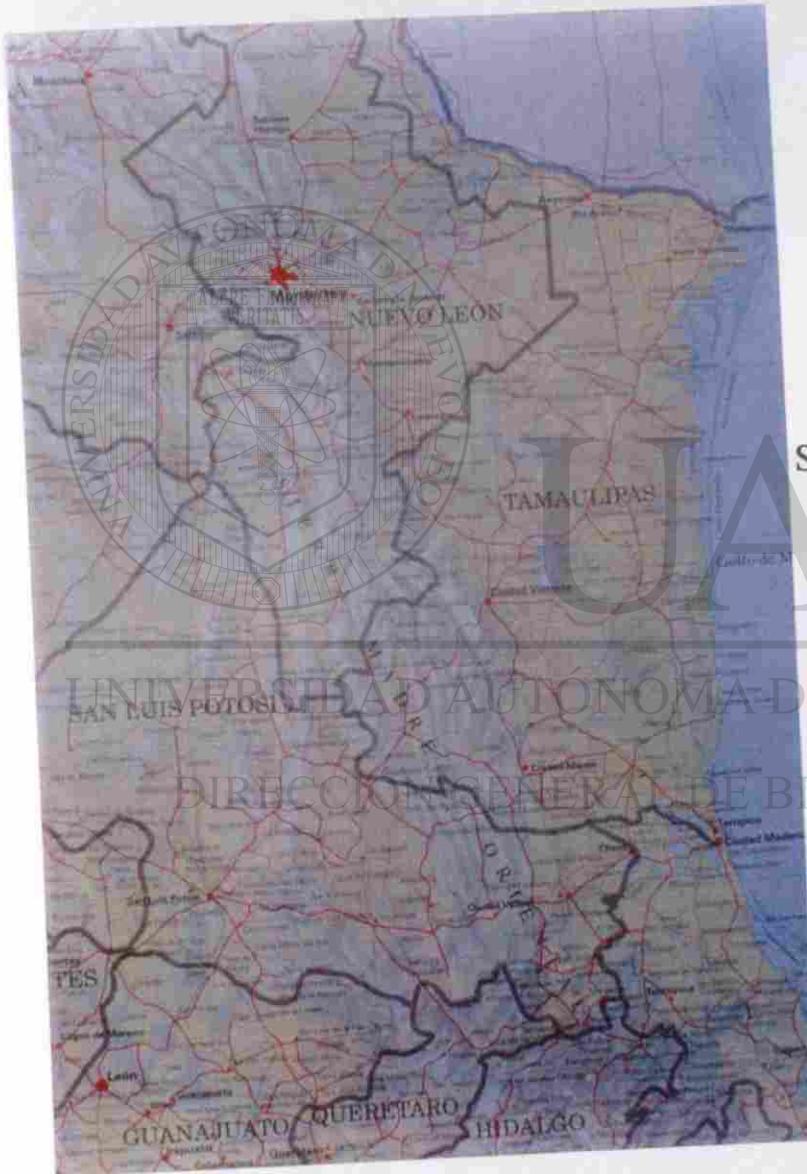
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MAPA DEL ÁREA DE ESTUDIO:



← Laguna Madre,
San Fernando, Tamaulipas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

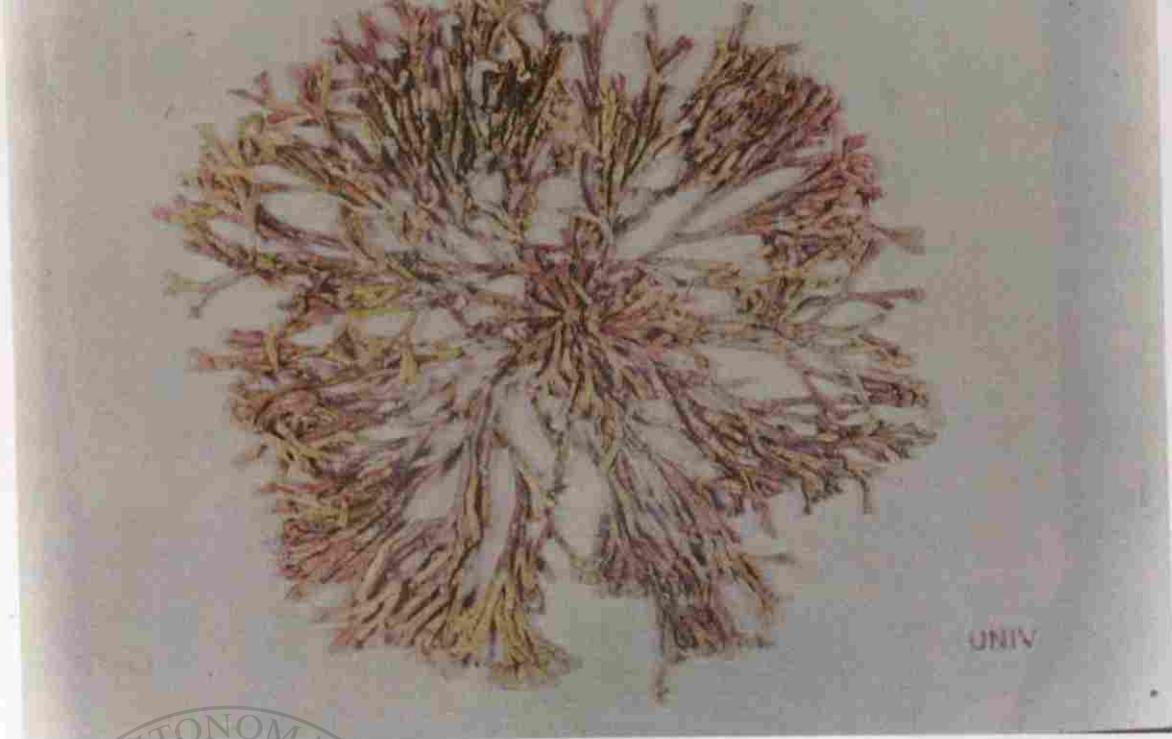


Fig. 1a. Viasta Panorámica de *Digenia simplex*



Fig. 1b. Vista Panorámica de *Digenia simplex*

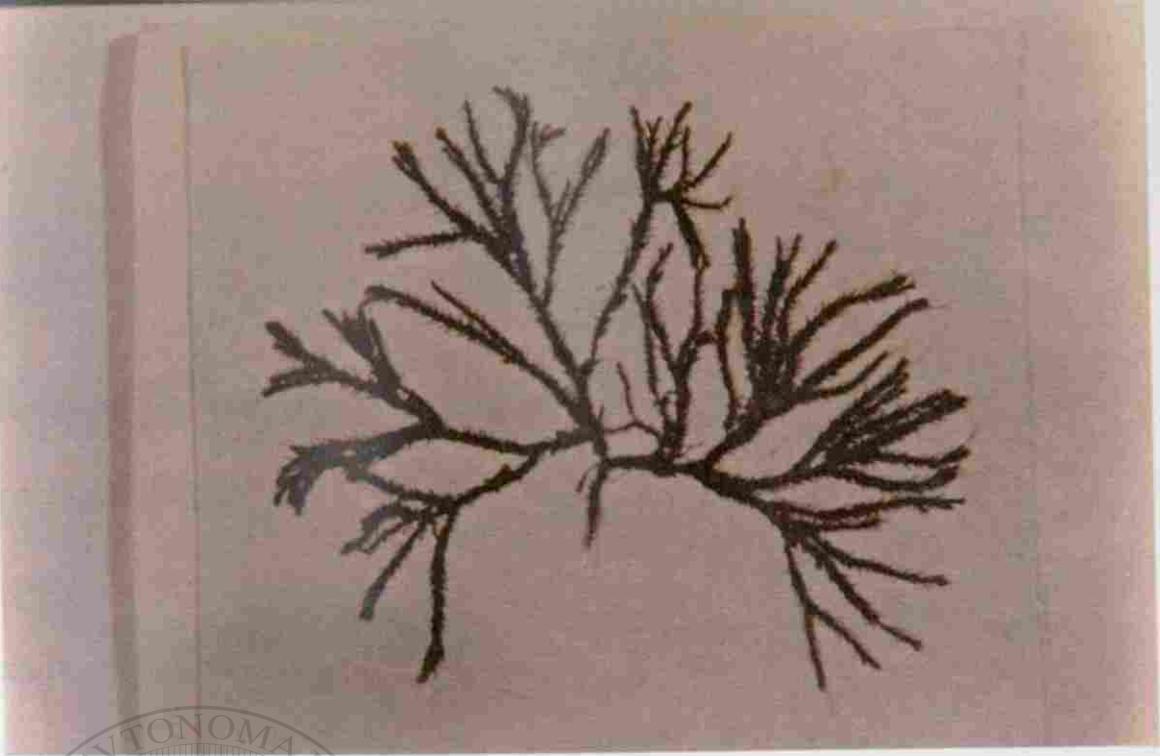


Fig. 1c. Vista Panorámica de *Digenia simplex*



Fig. 2. Vista Panorámica de *Digenia simplex* adherida al extracto rocoso.

MATERIAL:

Plantas de *Digenia simplex*

Bolsas de plástico

Hielo

Estufa

Vasos de precipitado

Bureta graduada

Pipeta graduada

Matraz bola

Mechero

Rotavapor

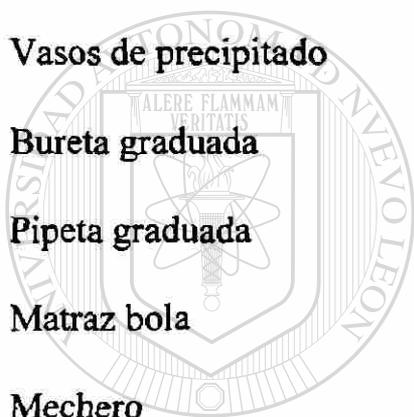
Papel filtro

Molino

Balanza

Aparato para destilación bajo presión reducida

Aparato soxhlet



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Difractómetro de RX SIEMENS D-5000, Radiación $\text{CuK}\alpha$, filtro de Ni,

$\lambda = 1.5418\text{\AA}$.

Aparato para medir punto de fusión Electrothermal 9100

Polarímetro Carl Zeiss

Metanol al 90%

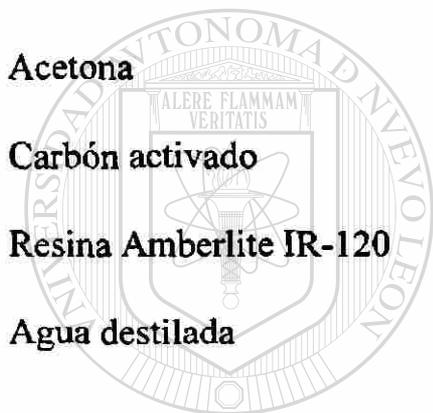
Etanol al 90%

Acetona

Carbón activado

Resina Amberlite IR-120

Agua destilada



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

METODOLOGÍA:

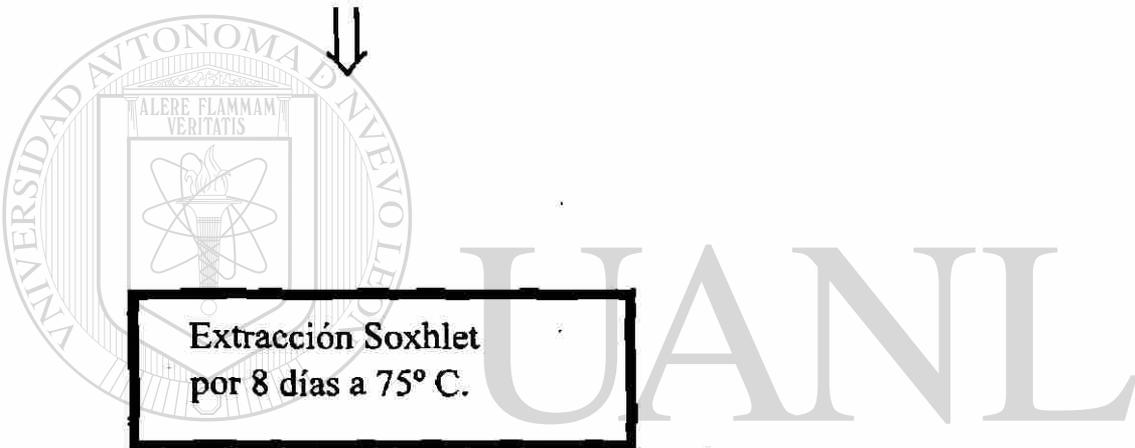
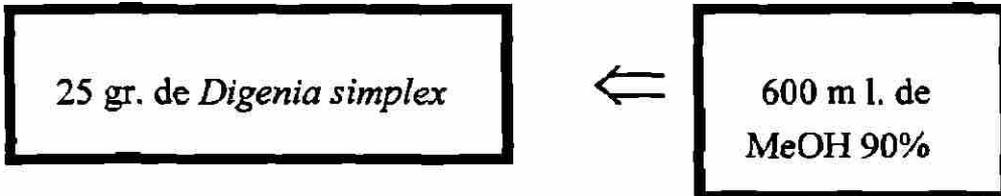
Se colectaron las muestras de la planta 2 veces, durante la época de verano, se lavaron en agua de mar y posteriormente con agua dulce, fueron transportadas al laboratorio en bolsas con hielo para impedir la pérdida de metabolitos o la descomposición de las mismas. Una vez en el laboratorio se lavaron, para eliminar la arena, la epifauna y las epifitas. Una parte del material se utilizó para cuantificar la Biomasa, la otra se deshidrató para preparar el extracto y realizar el análisis bromatológico.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

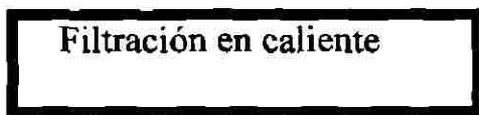
EXTRACCIÓN:

A 10 muestras trituradas de *Digenia simplex* cada una con 25 gr. se le agregaron 600 ml. de metanol al 90%, colocándose las muestras en un soxhlet durante 8 días, regulando la temperatura de 75°C; se filtraron en caliente y se redujo el metanol a 2 volúmenes en un rotavapor hasta obtener un líquido espeso, se agregó agua destilada para asegurar la precipitación de pigmentos insolubles; y en una cama de carbón activado se hizo pasar la solución para su purificación y separación de los pigmentos insolubles; se recristalizó con etanol al 90 %; se filtró y se recogió el sólido; a los cristales se les agregó etanol purificándose a través de una columna de amberlite IR-120 para eliminar las sales, posteriormente se evaporó el etanol recogiendo los cristales y pesándolos.

DIAGRAMA PARA LA EXTRACCIÓN
(Kawaguchi, 1953) modificado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Concentración a 2 volúmenes
en un Rotavapor



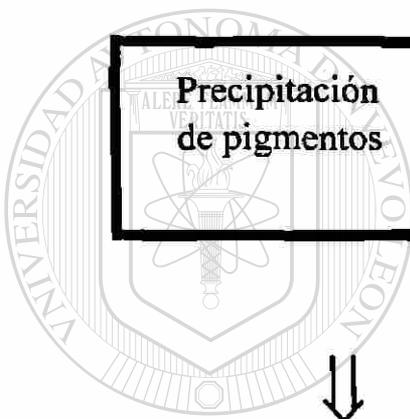
H₂O destilada

Precipitación
de pigmentos



Carbón activado

Separación de
pigmentos

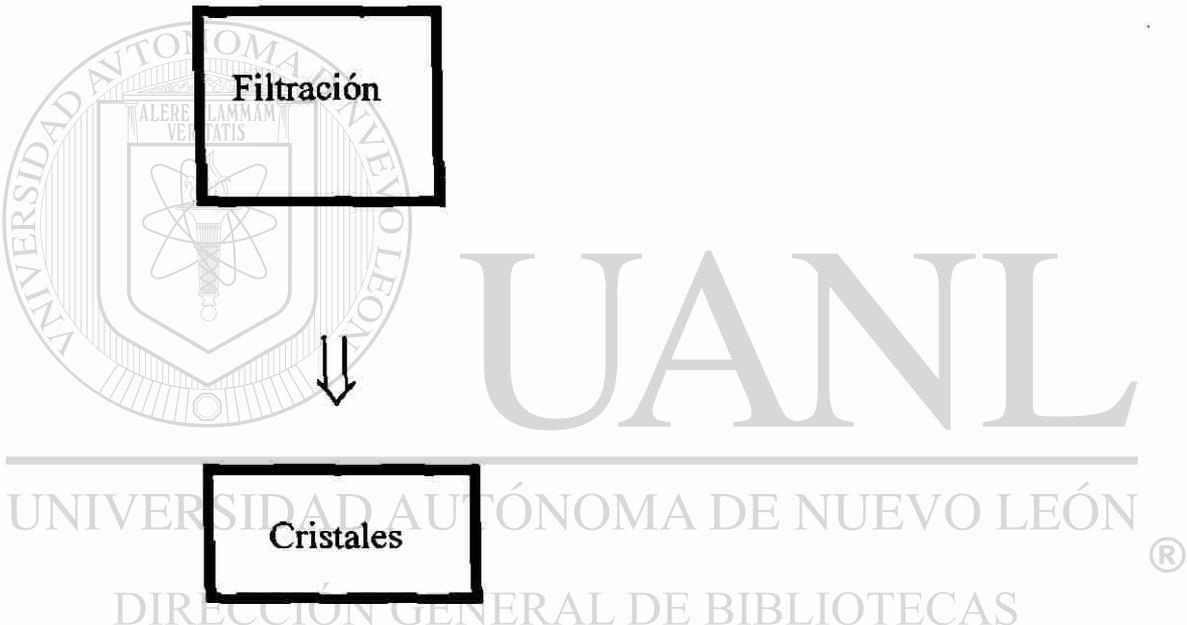
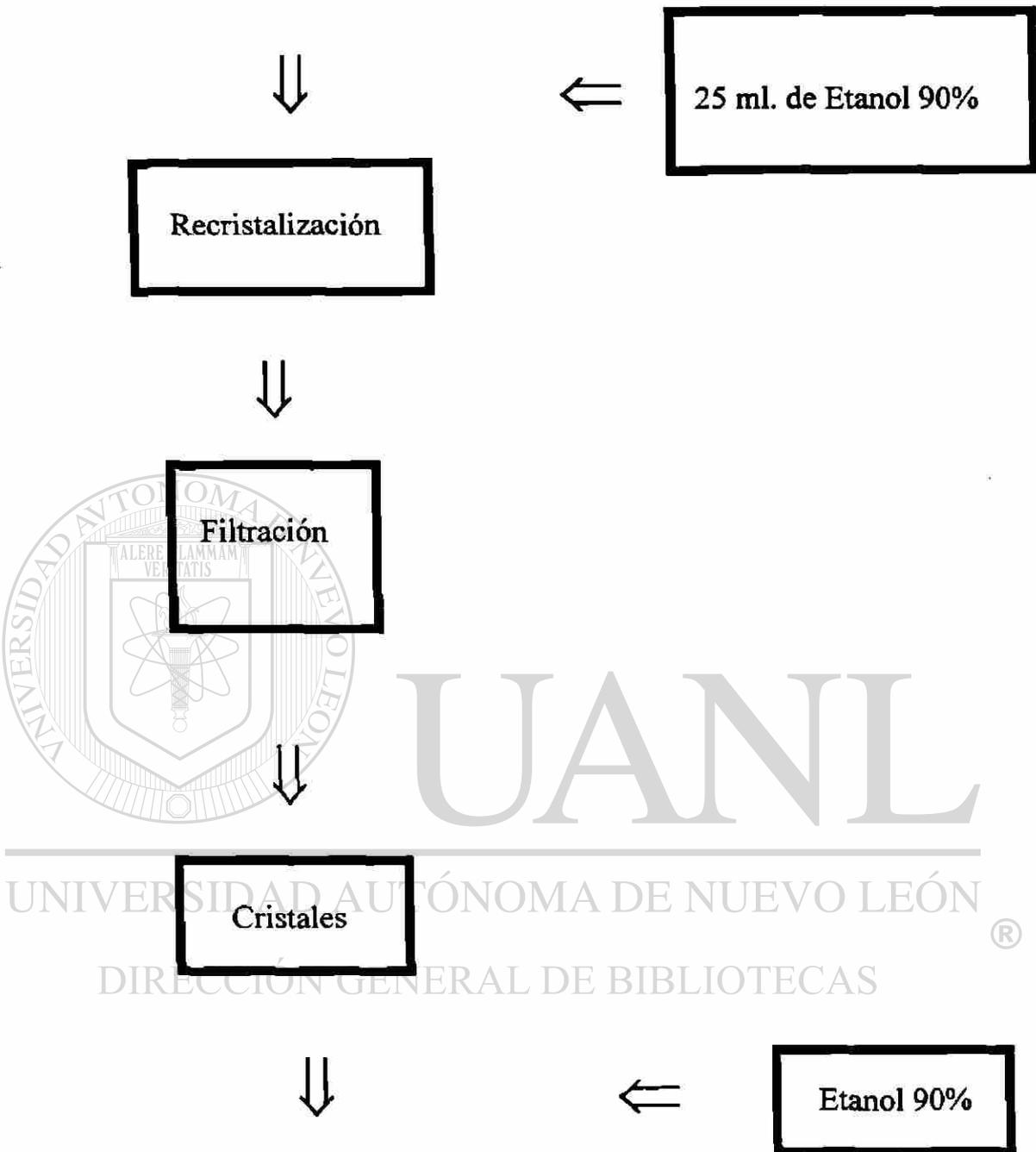


UANI

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



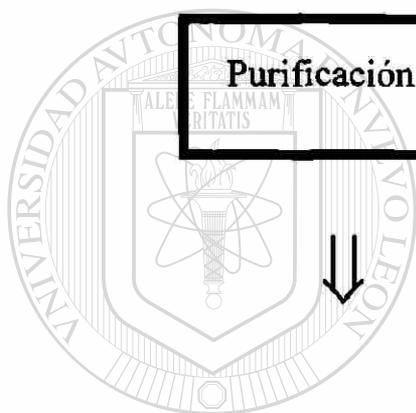
Columna de
Amberlite IR-120



Purificación



Evaporación del etanol
y recoger los cristales.



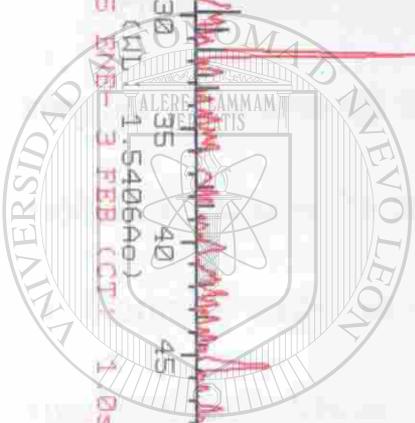
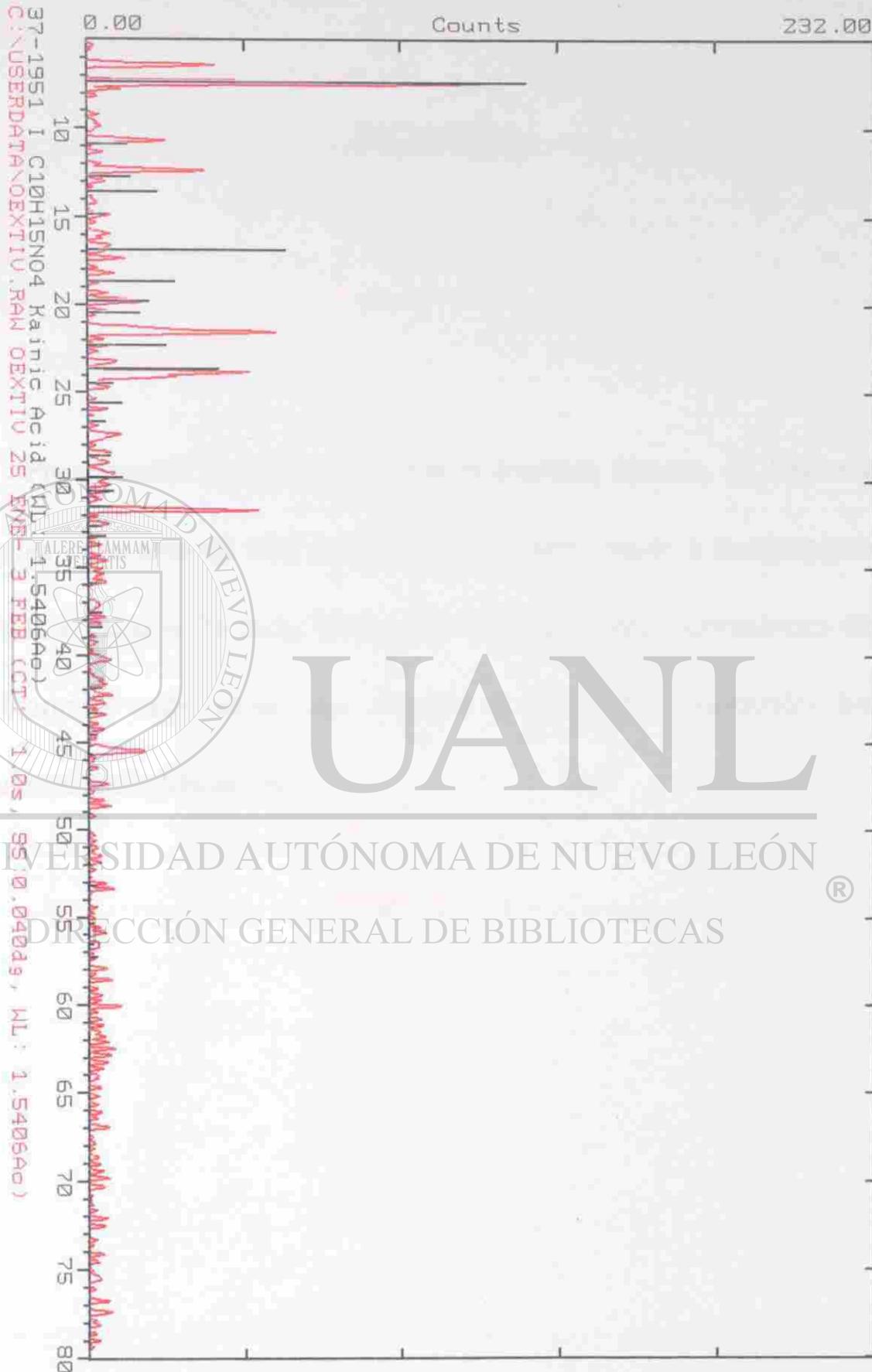
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

Z-Theta - Scale UANL-Facultad de Ciencias Químicas, Left Goniometer 14-Mar-1998 15:32



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIOMASA:

Previamente lavadas se pesaron 6 muestra frescas, de *Digenia simplex* cada una de 100 gramos y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 15 días, después se realizaron las valoraciones de la biomasa cada tercer día durante 4 períodos, resultando los siguientes cuantificación:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA:

VALORACIÓN DE BIOMASA

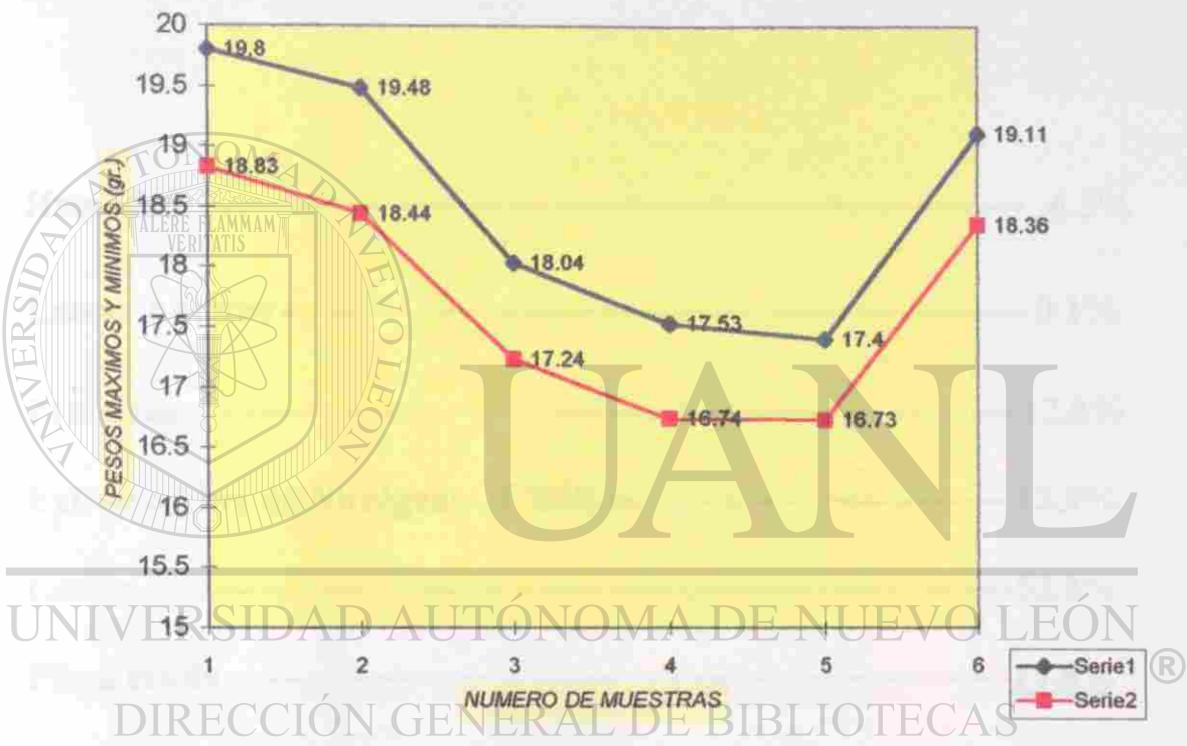
MUESTRAS:

DIAS/MUESTRAS	1	2	3	4	5	6
1°	19.80	19.48	18.04	17.53	17.40	19.11
3°	19.62	19.10	17.79	17.43	17.03	18.84
5°	18.85	18.46	17.30	16.75	16.42	18.44
7°	18.83	18.44	17.24	16.74	16.37	18.36
Máximos	19.80	19.48	18.04	17.53	17.40	19.11
Mínimos:	18.83	18.44	17.24	16.74	16.73	18.36

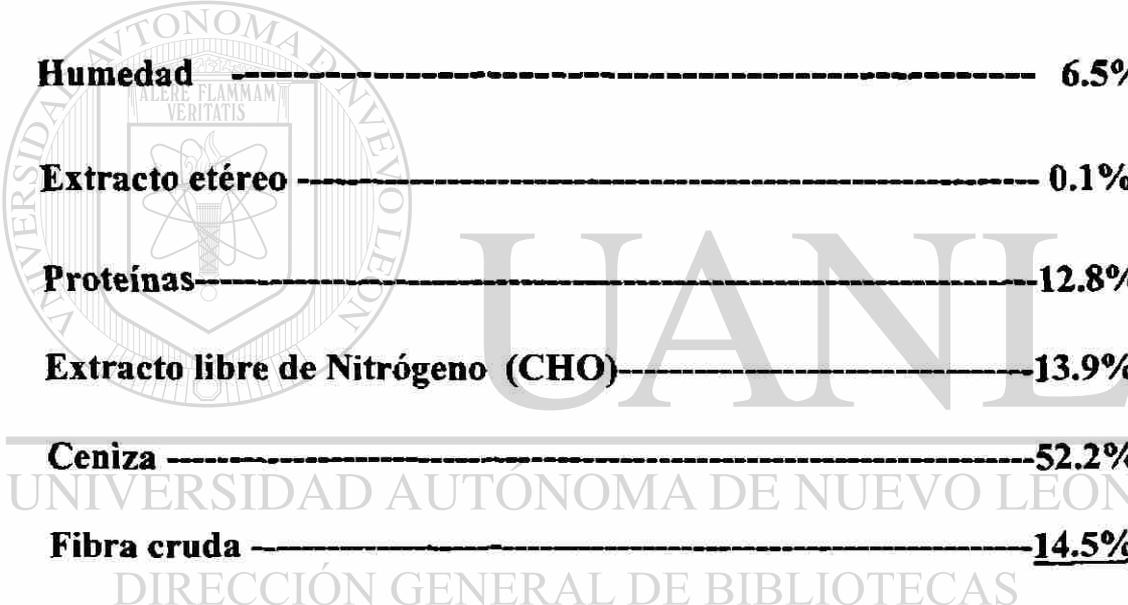
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESULTADO DEL ANÁLISIS DE LA BIOMASA EN EL
TRATAMIENTO DE MUESTRA SIDA 100
Día 10 de Julio de 2010

CUANTIFICACION DE BIOMASA EN *Digenia simplex* $\bar{X}=17.43$

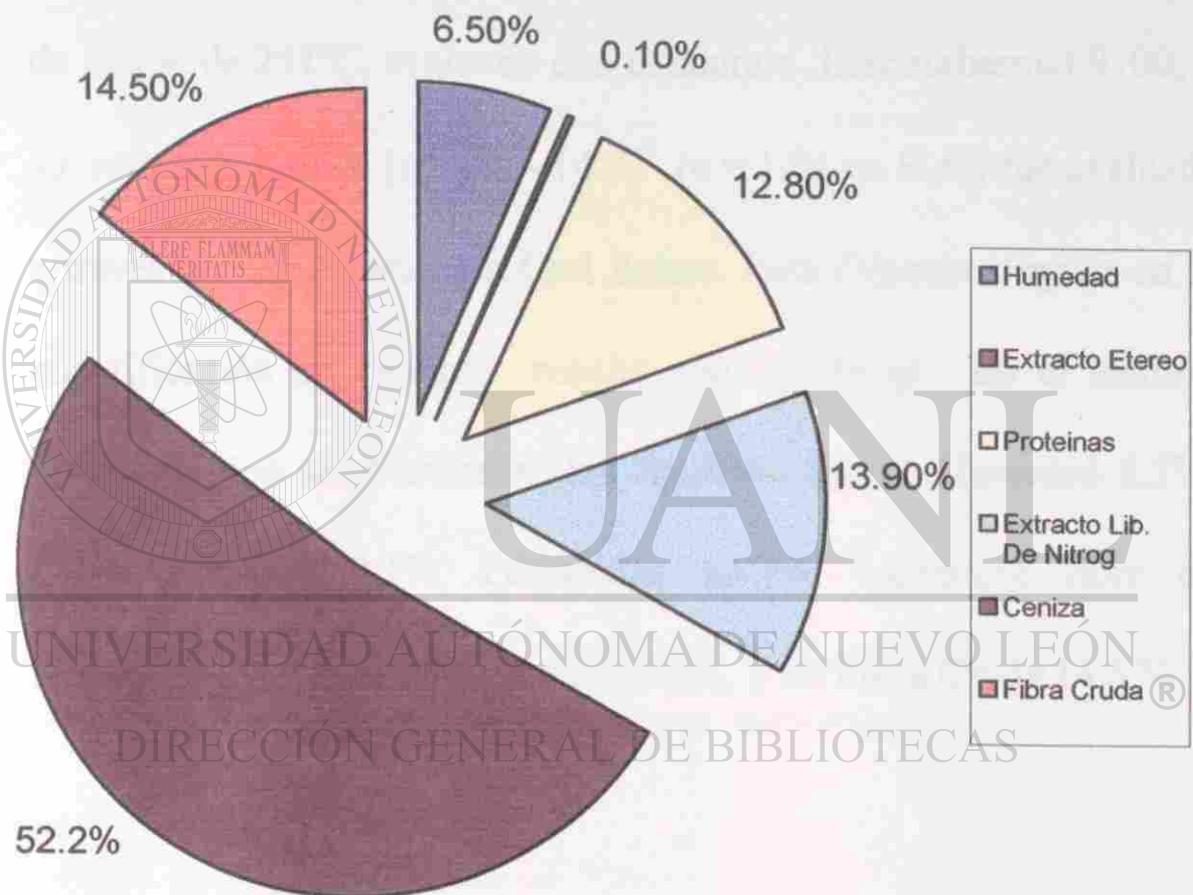


RESULTADOS DEL ANÁLISIS BROMATOLÓGICO EN
100 gr. DE MUESTRA SECA EN
Digenia simplex:



Humedad	6.5%
Extracto etéreo	0.1%
Proteínas	12.8%
Extracto libre de Nitrógeno (CHO)	13.9%
Ceniza	52.2%
Fibra cruda	14.5% [®]
	100 %

GRÁFICA DE BROMATOLOGÍA:



RESULTADOS:

En los análisis realizados a la planta de *Digenia simplex*, se obtuvo un rendimiento de 0.792%, de ácido káinico, con un punto de fusión de 251°C, evaluado con el aparato Electrothermal 9100, y su rotación óptica $[\alpha]_D^{20} -14.8^\circ$ ($c = 1.01$ en H_2O) fue evaluada a través de un polarímetro Carl Zeisse. Para *Digenia simplex* en la cuantificación de biomasa resultó con 17.43 gr. En el análisis bromatológico se obtuvieron los siguientes datos: Humedad 6.5%, Extracto etéreo 0.1%, Proteínas 12.8%, Extracto libre de Nitrógeno (CHO) 13.9%, Ceniza 52.2%, y de Fibra Cruda 14.5 %.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DISCUSIÓN:

Digenia simplex es una planta Rodophyta que crece en diversas partes del mundo, Mar Mediterráneo, Mar Rojo, Océano Indico, Filipinas, Australia, donde es utilizada con fines medicinales, las condiciones ecológicas del litoral Tamaulipeco son muy similares a las regiones mencionadas, donde crece en forma abundante en los meses calientes del verano.

El ácido kaínico obtenido de ésta planta presenta un rendimiento del 0.792% coincidiendo nuestros resultados con los reportados en la literatura (Kawaguchi, et al. 1953). Y su determinación se llevó a cabo por medio de Rayos X obteniendo resultados similares a los reportados por Watase y Nitta, 1957.

El método utilizado para la obtención de éste metabolito se basó en los métodos (Kawaguchi, et al. 1953), haciendo modificaciones en el tiempo de la extracción y en la concentración de los solventes ya que con la metodología original no se podía extraer el metabolito, probablemente debido a que los

solventes utilizados no eran muy puros y a la gran cantidad de sales que se eliminaron de la planta.

Respecto al valor nutricional de esta planta es factible que esta planta contenga una gran variedad de minerales por su alto contenido de ceniza, proteínas y carbohidratos coincidiendo estos resultados con los obtenidos por Heinz et al. en 1983.

La bibliografía no menciona con exactitud las cantidades de planta que debe utilizarse al preparar una infusión ni hace una diferencia entre adultos y niños, por lo que no debe aplicarse a mujeres embarazadas ya que se ha comprobado que afecta a los prenatales (Hata M. y Nippon Yakurigaku Zasshi 1994),

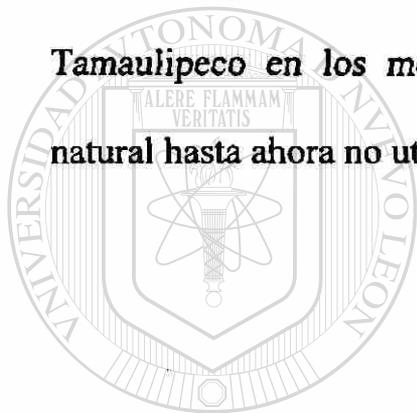
CONCLUSIONES:

El rendimiento, 0.792% , de ácido kaínico presente en *Digenia simplex* hace atractiva su extracción del ácido kaínico para dar la mejor aplicación que pueda satisfacer el uso a nuestra comunidad. La aplicación en los aspectos antihelmíntico, nutricional y neurotóxico de éste metabolito, eleva la importancia de realizar mas investigaciones del mismo, como la lucha contra enfermedades que ponen en riesgo la salud del ser humano.

En México *Digenia simplex* no se utiliza debido a que la gente no la conoce. Por lo que se recomienda divulgar sus propiedades entre las personas que se dedican al negocio de las plantas medicinales y la hagan llegar a la población de bajos recursos, sobre todo la que radica en las zonas costeras.

Es importante realizar estudios respecto a las cantidades de planta recomendadas para el ser humano (adulto y niño) y la cantidad de dosis, ya que dado el efecto neurotóxico se requiere conocerla con exactitud.

Es recomendable aprovechar el Potencial económico que representa *Digenia simplex* ya que su metabolito principal tiene gran valor económico en el mercado y considerando que esta planta crece abundantemente en el Litoral Tamaulipeco en los meses calientes de verano constituyendo un recurso natural hasta ahora no utilizado.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LITERATURA CITADA:

1. Auterhoff, H, 1961: Kainic acid. Die Japanische Pharmakopoe Vol, 1961. Deutsche Apothekerzeitung 104 (16).
2. Baslow, M.H., 1977: Marine Pharmacology Krieger, New York pp 69-70.
3. Chastain JE Jr; Samson F., Nelson SR., Pazdernik T., 1989: Kainic acid-induced seizures: Changes in brain extracellular ions as assessed by intracranial microdialysis. Department of Pharmacology, Toxicology, and Therapeutics, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS 66103, United States. LIFE-SCI. 45/9 (811-817).
4. Chapman, V.J., 1970: Sea Weeds and their uses, 2nd. Ed. Methuens, London, 304 pp.
5. Chopra, R.N., Chopra, I.C. Varma, B.S. 1969: Glossary of Indian Medicinal Plants. CSIR, New Delhi.
6. Constantine, G.H., 1977: The Marine Plant Biomase of the Pacific Northwest: a Potential Economic Resource. Oregon State University Press, Corvallis, 289-299.
7. Cook, M.T., and Crutcher, K.A., 1986: The injection of Intrahippocampal of the kainic acid produces loss significant pyramidal of the cell in rats neonatal. Neurology, 18 (1): 79-92.

8. Edwards, P & D. Kapraun, 1973: Benthic marine algal ecology in the Por Aransas, Texas area. *Contr. Mar. Sci. Univ. Tex.* 17: 15-52.
9. García, E. 1982. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. Ed. UNAM. México.
10. Glombitza, K.W., 1979 : *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter, Berlin. New York, 303-342.
11. Guldin Wo, Markowitsch Hj, 1982: A comparison of the actions intracerebral of the kainic acid and of the sour ibotenic. *Methods Of J. Neurosci Ja*; 5 (1-2): 83-93.
12. Halonen T., Miettinen R., Toppinen A., Tuunanen J., Koti T., Riekkinen Pj., 1995: *Vigabatrin protects against kainic acid-induced neural damage in the rat hippocampus*. *Neurosci Lett* 195:13-16.
13. Hata M. y Nippon Yakurigaku Zasshi, 1994: Effects of maternal exposure to a single dose of kainic acid on the functional development of the brain in the rat. Department of Pharmacology, Tokyo University School of Medicine, Tokyo, Japan. *Jul*; 104(1):7-18.
14. Heinz A. Hoppe. ,Tore Levring, Yukio Tanaka., 1979: *Marine Algae in Pharmaceutical Science* Ed. Walter de Gruyter. Berlin. New York, 25-119.
15. Honjo, M., Myamoto, M., Ueyanagi, J., Nawa, H., and Uchibayashi, M.

- 1955: *Yakugaku Zasshi* 75, 853-856: *Chem.Abs.* 50, 4120 (1956).
- 16.Hoppe, H.A., 1979: *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter, Berlin. New York, 25-119.
- 17.Humm, H.J., 1961. *Algae of the southern Gulf of Mexico*. *Proc. Intl.Seaweed Symp.* 4:202-206.
- 18.Impellizzeri, G., Mangiafico, S., Oriente, G., Piattelli, M., Sciuto, S., Fattorusso, E., Magno, S., Santacroce, G., and Sica, D., 1975: Kainic acid *Phytochemistry* 14, 1549-1557.
- 19.Kawaguchi, Kazuhiro., Shozo Yamada y Suken Miyama (Osaka Munic. Hyg. Lab.), 1953: Kainic acid *Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries* 19, 481-6.
- 20.Levring, T., Hoopes, H., Schmid, O.J., 1969: *A survey of Research and utilization*. Cram. The Gruyter & Co., Hamburg, 425 pp.
-
- 21.Martínez, Lozano, Salomón, 1995: Efecto de un extracto de algas y varios fitorreguladores sobre el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L. var. gigant) pág.4.
- 22.McGeer, E.g., Olney, J. W., and McGeer, P. L., eds., 1978: "Kainic Acid as a Tool in Neurobiology". Raven Press, New York.
- 23.Michanek, G., 1979: *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 237-242.

24.Misra, A., Sinha, R., 1979: Marine Algae in Pharmaceutical Science.

Walter de Gruyter, Berlin, New York, 237-242.

25.Miyasaki, M., Sugawa, T., Morimoto, H., Uchibayashi, M., Tanaka, K.,
and Tatsuoka, S., 1955a: Yukugaku Zasshi 77, 580-585; Chem Abstr. 51,
16424.

26.Miyasaki, M., Honjo, M., Sanno, Y., Uchibayasahi, M., Tanaka, K., and
Tatsuoka, S., 1955b: Yakugaku Zasshi 77, 586-588; Chem. Abstr. 51
16425.

27.Morimoto, H., 1955a,; Yakugaku Zasshi 75, 901-905; Chem. Abstr.
50, 1904 (1956).

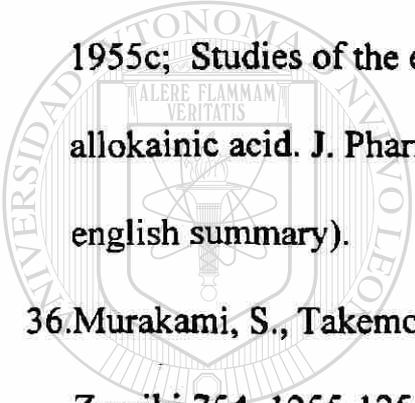
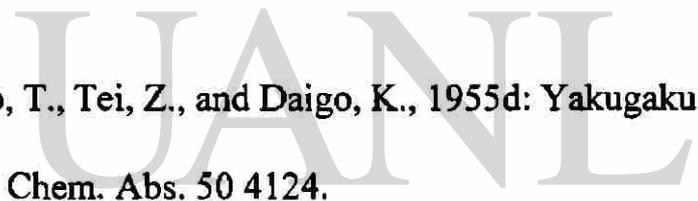
28.Morimoto, H., 1955b, Yakugaku Zasshi 75, 905-909; Chem. Abstr. 50,
4904 (1956).

29.Morimoto, H., 1955c, Yakugaku Zasshi 75, 909-913; Chem. Abstr. 50,
4905 (1956).

30.Morimoto, H, 1955d, Yakugaku Zasshi 75, 914; Chem. Abstr. 50, 4905
(1956).

31.Morimoto, H., 1955f, Yakugaku Zasshi 75, 941-943; Chem. Abstr. 50,
4907 (1956)

32.Morimoto, H. and Nakamori, R., 1956a, Proc. Jpn. Acad. 32, 41-44.

33. Morimoto, H., and Nakamori, R., 1956b: *Yakugaku Zasshi* 76, 294-298;
Chem. Abstr. 50, 137867.
34. Murakami, S., Takemoto, T. and Schivisu, Z., 1953: Studies of the
effective principles of *Digenia simplex*, I. Separation of the effective
fraction by liquid chromatography, II. On the Digeniaside *J. Pharm. Soc.*
Japan, 73: 1026-1029 (In Japanese with english summary).
35. Murakami, S., Takemoto, T., Zheng, R-C., Daigo, K. and Takagi, S.,
1955c; Studies of the effective principles of *Digenia simplex*, X. On alfa-
allokainic acid. *J. Pharm. Soc. Japan*. 75: 1252-1255 (In Japanese with
english summary).
36. Murakami, S., Takemoto, T., Tei, Z., and Daigo, K., 1955d: *Yakugaku*
Zasshi 75, 1255-1257; Chem. Abs. 50 4124.
-
37. Nisizawa, K., 1979: *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de
Gruyter, Berlin. New York, 243-264.  
38. Patterson, G.W., 1977: *The Marine Plant Biomass of the Pacific*
Northwest: a Potential Economic Resource. Oregon State University Press,
Corvallis, 271-287.
39. Saito, K. & Sameshima M., 1955: Studies on the antibiotic action of
algae extracts Part 3, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 29: 427-429 (1955) (In

Japanese with english summary).

- 40.Sandor, P., Hajnal, A., Jando, G., Karadi, Z. y Lenard, 1992: Application of L. Microelectrophoretic of the kainic acid in the pallidus of the globus: Disturbance in behavior of food. Bull.Del Res.Del Brain, 28-751-6.
- 41.Sanno, Y., Kurita, A., and Imai, K., 1955: Kainic acid Yakugaku Zasshi 75, 1461-1466; Chem.Abstr. 50, 10708.
- 42.Sarkistian Matthew R., Pushpa Tandon, Shao Liu, Yili Yang, Ariyuki Hori, Gregory L. Holmes and Carl E. Stafstrom, 1997: Epilepsia, Volumen 38, Number 11, November, Department of Neurology, Harvard Medical School, Children's Hospital, and Division of Pediatric Neruology Tufts.
- 43.Seibin Arasaki, D. Agr. and Teruko Arasaki, D.Sc., 1983: Low calorie, High Nutrition. Vegetables from the sea. Japan Publications, Inc.
-
- 44.Shytle RD; Borlongan CV; Sanberg PR., 1995: Nicotine blocks kainic acid-induced wet dog shakes in rats. Division of Neurological Surgery, University of South Florida, Tampa, USA. Neuropsychopharmacology; VOL 13, ISS 3, pag 261-264.
- 45.Sugimoto, Y. 1960; Takeda Products Manual, : p.170-171. Takeda Industrial Parmaceutical Co., Osaka, Japan.
- 46.Tanaka, K., Miyamoto, M., Honjo, M., Morimoto, H., Sukawa, T.,

Uchibayashi, M., Sanno, Y., and Tatsuoka, S., 1957: *Proc. Jpn. Acad.* 33, 47-52.

47. Taylor, William R., 1960: *Marine Algae of the Easter Tropical and Subtropical Coast of the Americas*, University of Michigan Press.

48. Ueno, Y., Nawa, H., Ueyanagi, J., Morimoto, H., Nakamori, R., and Matsuoka, T., 1955a: *Yakugaku Zasshi* 75, 807-811; Amino Acid from Marine algae *Chem. Abs.* 50, 4115.

49. Ueno, Y., Nawa H., Ueyanagi, J., Morimoto, H., Nakamori, R., and Matsuoka, T., 1955b: *Yakugaku Zasshi* 75, 811-814; Amino Acid from Marine Algae *Chem. Abs.* 50, 4115.

50. Watase, H., Tomie, Y., and Nitta, I., 1957: Kainic acid. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 30, 889-890.

51. Zhang, X.; Gelowitz, D.L.; Lai, C.T.; Boulton, A.A.; Yu, P.H., 1997: Gradation of kainic acid induced rat limbic seizures and expression of hippocampal heat shock protein-70. Department of Psychiatry, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. *SO. Eur J. Neurosci*, April, 9(4): 760-9.A.B.

