

## **Detección de alcaloides en la piel de cuatro especies de anfibios ecuatorianos (Anura: Dendrobatidae)**

**Isabel Cipriani & Miryan Rivera**

Laboratorio de Citogenética de Anfibios, Escuela de Ciencias Biológicas,  
Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador,  
isabel\_cipriani@yahoo.com, mriverai@puce.edu.ec

**RESUMEN:** La familia Dendrobatidae agrupa al conjunto de ranas venenosas que en su mayoría comparten coloración aposemática y presencia de alcaloides en la piel. Los alcaloides producidos por estos anfibios, son extraordinariamente tóxicos y han mostrado características químicas y farmacológicas muy interesantes.

La extracción de los alcaloides se realizó mediante un proceso de maceración con metanol y una partición ácido-base. El análisis de las muestras purificadas se realizó por cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS).

En este estudio se logró identificar 25 clases de alcaloides y se clasificaron alrededor de 40 en base a reportes bibliográficos. Además se detectaron cinco nuevos alcaloides no aislados previamente.

**PALABRAS CLAVE:** Alcaloides, coloración aposemática, cromatografía de gases acoplada a masas, Dendrobatidae, partición ácido-base.

**ABSTRACT:** The Dendrobatidae family comprises the poisonous frogs. Most of them have aposematic coloration and alkaloids in the skin. The alkaloids produced by these amphibians are extraordinarily toxic and they have very interesting chemical and pharmacological characteristics.

Alkaloid extraction was accomplished through a maceration process with methanol and an acid/base partitioning. The analysis of the purified samples was performed by chromatography of gases with mass detector (CG-MS).

In this study 25 class of alkaloids were identified, and 40 were classified based on literature reports. Furthermore five new alkaloids, not isolated previously, were detected.

**KEY WORDS:** Alkaloids, aposematic coloration, chromatography of gases with mass detector, Dendrobatidae, acid/base partitioning.

## INTRODUCCIÓN

Una de las razones por las que se conoce al Ecuador como un país megadiverso es porque, con sus 473 especies de anfibios formalmente descritas hasta el momento, ocupa el primer lugar en el mundo con el mayor número de especies de este tipo de vertebrados por kilómetro cuadrado (1). Esta gran diversidad biológica se potencia enormemente si se considera la cantidad de compuestos biológicamente activos que los anfibios producen o acumulan en su piel.

Así pues, hasta el momento se han descrito 30 aminas biogénicas, 266 péptidos y más de 800 alcaloides lipofílicos (2, 3, 4). Todas estas moléculas parecen estar relacionadas con la defensa de los anfibios contra microorganismos, como en el caso de los péptidos antimicrobianos, o contra los depredadores por los efectos tóxicos o nocivos que los alcaloides ocasionan sobre los nervios y músculos del tejido bucal (5).

La gran mayoría de los alcaloides de anfibios han sido aislados de la piel de anuros de la familia Dendrobatidae, cuyos miembros en su mayoría poseen una coloración aposemática que parece estar relacionada con la presencia de alcaloides (6) y que tienen importantes efectos biológicos con potencial uso biomédico. Un claro ejemplo de este tipo de moléculas es la Epibatidina, alcaloide que fue aislado de la piel de 750 ranas ecuatorianas de la especie *Epipedobates anthonyi* (7). Su derivado ABT-594, es un analgésico que ha probado ser 200 veces más potente que la morfina y que no causa efectos colaterales negativos pues al ser un agonista

nicotínico, no actúa sobre receptores opioides como es el caso de la morfina, sino sobre receptores nicotínicos colinérgicos (8).

En general, los alcaloides son un grupo de compuestos orgánicos nitrogenados débilmente alcalinos, poseen una complejidad molecular moderada que produce varios efectos fisiológicos en el cuerpo y pueden ser altamente tóxicos o nocivos. Presumiblemente estas moléculas nitrogenadas tienen un origen exógeno a las ranas ya que no son sintetizadas por ellas sino que son secuestradas en su piel a partir de la dieta que ellas ingieren (3, 9).

Los alcaloides de anfibios hasta aquí identificados han sido agrupados en 24 clases estructurales entre las que se destacan: batracotoxinas (activadores de los canales de sodio), histrionicotoxinas (bloqueadores no competitivos de canales nicotínicos), pumiliotoxinas (moduladores positivos de los canales de sodio), epibatidina (potente agonista nicotínico), pirrolidinas, piperidinas, decahidroquinolinas, pirrolizidinas, indolizidinas, quinolizidinas, gepirotaxinas tricíclicas, oximas pirrolizidinas, pseudopinaminas, coccinellines y ciclopentaquinolizidinas (potentes bloqueadores no competitivos de los canales nicotínicos) (3, 10).

A pesar de que muchos de los alcaloides hasta el momento descritos han sido aislados de dendrobátidos ecuatorianos, ninguno de ellos ha sido caracterizado en el país. Es por ello que el presente trabajo surge como respuesta a la necesidad de implementar técnicas analíticas de última generación que nos permitan llevar a cabo este tipo de investigaciones en el Ecuador.

Así pues, en el presente estudio se analizan mediante cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS), los alcaloides procedentes de cuatro especies de dendrobátidos ecuatorianos: *Epipedobates boulengeri* (Barbour, 1909), *E. sp. F*, *E. tricolor* (Boulenger, 1899) y cuatro poblaciones de *E. anthonyi* (Noble, 1921).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron un total de 74 pieles de ranas de la familia Dendrobatidae, del género *Epipedobates*: *Epipedobates boulengeri*, *E. sp. F*, *E. tricolor* y cuatro poblaciones de *E. anthonyi* (Tabla 1). Todas las pieles fueron extraídas en el sitio de colecta y colocadas directamente en metanol absoluto.

La extracción de los alcaloides, se llevó a cabo macerando tres veces las pieles en un volumen total de 10 mL de metanol; el sobrenadante fue centrifugado por 15 minutos y el líquido decantado fue concentrado a 1 mL usando nitrógeno.

Los extractos metanólicos concentrados fueron diluidos en un volumen igual de agua; luego el metanol acuoso fue extraído tres veces con un volumen igual de cloroformo. Las fases orgánicas combinadas fueron concentradas hasta un volumen de 1 mL y se restituyó al volumen inicial con hexano; el hexano fue extraído tres veces con 5 mL de HCl 0,1 N cada vez. Las fracciones combinadas de HCl 0,1 N fueron ajustadas a pH 9,0 con NH<sub>4</sub>OH 1 N, seguido por una triple extracción con 5 mL de cloroformo. Los extractos combinados de cloroformo se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y

**Tabla 1.** Especímenes de Dendrobátidos ecuatorianos colectados para la extracción de alcaloides

Especie	# Especímenes	Localidad	Provincia	Coordenadas
<i>Epipedobates boulengeri</i>	15	Borbón	Esmeraldas	01° 04' 40,2"N / 79° 00' 51,9"W 0° 4' 11"S /
<i>Epipedobates sp.F</i>	5	Mindo	Pichincha	78° 45' 45" O 1° 9' 31"S /
<i>Epipedobates tricolor</i>	18	Moraspungo	Cotopaxi	79° 9' 17"O 3° 16'48"S /
<i>Epipedobates anthonyi</i>	20	Sta. Isabel	Azuay	79° 18' 102"W 3° 18'51"S /
<i>Epipedobates anthonyi</i>	5	Sarayunga	Azuay	79° 34' 50,52"O 3° 16'20,1"S /
<i>Epipedobates anthonyi</i>	5	El Progreso	Azuay	79° 44' 35,7"W 3° 16'20,3"S /
<i>Epipedobates anthonyi</i>	5	Sta. Martha	Azuay	79° 31' 38,6"W

concentrados a sequedad a 30° C con vacío, y el residuo sólido fue diluido con 0,5 mL de metanol. El análisis de los extractos purificados se realizó en un cromatógrafo de gases con detector de masas (Hewlett Packard 5890 series II). Se usó una columna polar (30 m x 0,25 mm DB5MS programada 100 °C a 300 °C a 10 C/min).

## RESULTADOS

La clasificación e identificación de las diversas sustancias encontradas en las muestras analizadas se la realizó con base a la información recopilada por John W. Daly (3) en la publicación científica: "Alkaloids from Amphibian Skin: A Tabulation of over Eight-Hundred Compounds". En la mayoría de casos, se efectuó una clasificación general de los compuestos encontrados en las diferentes muestras, ya que el análisis se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a masas-impacto de electrones (CG-MS) (IE). Hay que considerar que en algunos casos no se pudo establecer el peso molecular de algunos compuestos, lo cual dificultó su identificación.

La información se recopila en la Tabla 2, en la cual se especifica: la clase de compuesto y en los casos en los cuales fue posible establecer con seguridad, el peso molecular, el nombre del compuesto al que corresponde y la especie o especies analizadas en las cuales fue encontrado.

## DISCUSIÓN

Si bien es cierto que el Ecuador es el país en el mundo que más especies de anfibios posee por unidad de superficie, tam-

bién es el tercer país del continente que tiene el mayor número de anfibios en riesgo, pues el 30,6% de sus especies se encuentra en estado vulnerable, en peligro o en peligro crítico (11). Esta vertiginosa declinación resulta alarmante, ya que no solo representa un grave problema ecológico sino que con la desaparición de anfibios, desaparecerán también una extraordinaria cantidad de moléculas biológicamente activas que se encuentran en su piel y que podrían ser la solución a muchos problemas biomédicos.

Los resultados recopilados en la Tabla 2, nos permiten constatar la inmensa riqueza biológica que se almacena en la piel de nuestros anuros, pues en tan solo cuatro especies de dendrobátidos se consiguió detectar un total de 40 alcaloides diferentes. Se destacan entre ellos los siguientes grupos de alcaloides que han sido ya analizados ampliamente en investigaciones previas (2, 3, 5, 10, 12): Quinolizidinas, Indolizidinas, Pumiliotoxinas, Histrionicotoxinas, Izidinas, Pirrolizidinas, Polyzoniminas, Decahidroquinolinas, Precocinelinas y alcaloides tricíclicos. Adicionalmente, se describen en este trabajo por primera vez, dos nuevos compuestos de la clase de la Epibatidina y tres nuevos alcaloides aún no clasificados.

Es interesante analizar que a pesar de ser especies de un mismo género, básicamente no se encontraron alcaloides comunes a las cuatro especies. Así, para las especies *Epipedobates tricolor* y *E. bouleengeri* alrededor del 60% del total de alcaloides identificados son exclusivos para cada especie y de hecho, el perfil de alcaloides difiere de una población a otra dentro de la especie *E. anthonyi* (Tabla 2).

**Tabla 2. Ocurrencia de alcaloides liposolubles en cuatro especies de anuros ecuatorianos del género *Epidobates* (familia Dendrobatidae)**

COMPUESTO	<i>E. Boulengeri</i>		<i>E. tricolor</i>		<i>Epidobates anthoyi</i>		
	<i>boulengeri</i>	sp.F	<i>tricolor</i>	Santa Isabel	Sarayunga	El Progreso	Santa Martha
1,4 Quinolizidines							X
1,4 Quinolizidine 217B				X			
1,4 Quinolizidine 231A				X	X		
1,4 Quinolizidine 257C	X						
Indolizidines				X	X	X	
3,5 Indolizidine 275D	X						
3,5-Disubstituted Indolizidine			X				
5,6,8-Trisubstituted Indolizidines	X			X			
5,6,8 Indolizidine 223A				X	X		
5,8 Indolizidines	X		X	X	X	X	
5,8 Indolizidine 203A				X			
5,8 Indolizidine 221 A			X				
6, 7 dehydro 5,8-Disubstituted indolizidine		X					
Decahydroquinolines		X	X	X		X	
Decahydroquinoline 195 A		X					
Histronicotoxins							X
Histronicotoxin 291A	X						
Izidine 223 I			X				
Pyrrrolizidine oxime 222	X						

COMPUESTO	<i>E. boulengeri</i>		<i>E. sp.F</i>		<i>E. tricolor</i>		<i>Epidobates anthoyi</i>			
							Santa Isabel	Sarayunga	El Progreso	Santa Martha
Polyzonimine 151B	X									
Precocine line 193C			X							
Allopumiliotoxins		X	X				X	X		X
8-Deoxypumiliotoxin		X					X	X		X
Deoxypumiliotoxins										X
Deoxy pumiliotoxin 235V	X									
Homopumiliotoxins			X						X	X
Pumiliotoxins								X	X	X
Pumiliotoxin 251D	X						X			X
Pumiliotoxin 251D (N-oxide)				X					X	X
Pumiliotoxin 307 B				X						
Pumiliotoxin 323F								X		
Sin clasificación			X				X	X		
Sin clasificación 183C					X					
Sin clasificación 267 I					X					
Spiropyrrrolizidine 236A	X									
Tricyclics									X	
Tricyclic 223P										
Tricyclic 235AA	X						X			
Compuestos de la clase de la epibatidina									X	X
Nuevos alcaloides							X			X

Estos resultados evidencian una vez más la alta variabilidad de alcaloides presentes en la piel de anuros y el sinnúmero de factores que influyen en la producción de los alcaloides en las pieles de estos anfibios. Si bien es un hecho que estas sustancias son exógenas a las ranas y que están estrechamente relacionadas con su alimentación, es bastante complicado relacionar la producción de dichos alcaloides con el género o familia de las mismas.

Según datos bibliográficos, las homopumiliotoxinas no son características del género *Epipedobates* (12), sin embargo, en este estudio se logró identificar, en dos especies (*Epipedobates* sp. F y *E. anthonyi*). Hasta el momento no se han encontrado homopumiliotoxinas en fuentes diferentes a la piel de las ranas, pero se presume que al igual que las pumiliotoxinas que han sido encontradas en ácaros, provienen de la alimentación (3), lo cual amerita futuros estudios que permitan elucidar la procedencia de estos compuestos en estas especies de anuros.

Resultó sumamente interesante haber detectado dos tipos de histrionicotoxinas exclusivamente en *Epipedobates boulengeri*. Este grupo de moléculas tiene un alto interés científico ya que es un alcaloide espiropiperinídico que tiene arreglos espaciales muy similares a la acetilcolina, pues comparte con ella una distancia de 2,7 Å entre el nitrógeno y los grupos hidroxilo. Esto la convierte en un potente antagonista nicotínico no competitivo que bloquea la transmisión neuromuscular, cuya aplicación se investiga en el tratamiento de Alzheimer, el síndrome de Down y la Miastenia grave. Esta interesante molécula fue aislada originalmente a partir de

*Oophaga histrionica* (13) especie con la que curiosamente, *E. boulengeri* comparte un patrón de alcaloides bastante similar.

Uno de los principales aportes de este trabajo, radica en el hecho de la identificación de compuestos que no han sido descritos hasta el momento. Dos de estos nuevos alcaloides tienen características estructurales similares a las de la Epibatidina, por lo cual se sugiere clasificarlos dentro de la clase de este compuesto. Otro de los compuestos que no ha sido reportado antes es una nueva 8-Deoxypumilitoxin, con un probable peso molecular de 249. Adicionalmente, se detectaron dos alcaloides con estructuras tentativamente nuevas, difíciles de clasificar dentro de los grupos existentes hasta el momento.

En definitiva, los datos recopilados en esta investigación ponen de manifiesto la inminente necesidad de continuar con investigaciones científicas que permitan el descubrimiento de nuevas moléculas biológicamente activas que prometen contribuir al adelanto de la biomedicina, pues como ya se ha discutido en este estudio, estas tienen un alto potencial farmacológico y la gran mayoría de ellas, están esperando ser descubiertas.

## AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el apoyo económico que permitió la realización de este estudio, a través del proyecto N° 86. A la Lcda. Ailín Blasco Zúñiga por su ayuda en la colecta de los especímenes. Al laboratorio Gruentec Cia. Ltda. y al Ingeniero Ricardo Muñoz, por facilitar sus instalaciones y equipos para el desarrollo del presente estudio.

## LITERATURA CITADA

1. COLOMA, L. A (ed). 2005–2009. Anfibios de Ecuador. [en línea]. Ver. 2.0 (29 Octubre 2005). Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. <<http://www.puce.edu.ec/zoologia/vertebrados/amphibiawebec/anfibiosecuador/index.html>>[Consulta: 24-04-2009].
2. DALY JW, MYERS CW, WHITTAKER N. 1987, Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. *Toxicon* 25(10):1023-95.
3. DAILY J. W., SPANDE T. F., GARRAFFO H. M. 2005. Alkaloids from Amphibian Skin: A Tabulation of Over Eight Hundred Compounds. *Journal of Natural Products* 68:1556-1575.
4. PROAÑO C. Y RIVERA M. 2005. La piel de las ranas: Un verdadero arsenal químico, *Nuestra Ciencia* 8:35-38.
5. DAILY J. W, GARRAFFO H. M., SPANDE T. F. 1993. Amphibian Alkaloids. *The Alkaloids* 43:185-287.
6. SANTOS J. C., COLOMA L. A., CANNATELLA D. C. 2003. Multiple, Recurring Origins of Aposematism and Diet Specialization in Poison Frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:12792-12797.
7. SPANDE T. F., GARRAFFO H. M., EDWARDS M.W., YEH H. J. C., PANNELL L., DALY J. 1992. Epibatidine: a novel (chloropyridyl) azabicycloheptane with potent analgesic activity from an Ecuadorian poison frog. *Journal of the American Chemical Society* 114(9):3475–3478.
8. FISHER M., HUANGFU D., SHEN T.Y., GUYENET P.G. 1994. Epibatidine, An Alkaloid From Poison Frog *Epipedobates tricolor*, Is a Powerful Ganglionic Depolarizing Agent. *The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics* 270(2):702-707.
9. DARST C. R., MENDEZ-GUERRERO P. A., COLOMA L. A., CANNATELLA D. C. 2005. Evolution of Dietary Specialization and Chemical Defense in Poison Frogs (Dendrobatidae): A Comparative Analysis. *The American Naturalist* 165:56-69.
10. DAILY J. W., GARRAFFO H. M., MYERS C. W. 1997. The Origin of Frog Skin Alkaloids: An Enigma. *Pharmaceutical News* 4:9-13.
11. RON, S. R., J. M. GUAYASAMIN, L. A. COLOMA, Y P. MENÉNDEZ-GUERRERO., 2008. Lista Roja de los Anfibios de Ecuador. [en línea]. Ver. 1.0 (2 de mayo 2008). Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. <<http://www.puce.edu.ec/zoologia/sron/roja/>>[Consulta: 4-05-2009].
12. DALY JOHN. 1995 “The Chemistry of Poisons in Amphibian Skin”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(1): 9–13
13. DALY J. W., KARLE I., MYERS C. W., TOKUYAMA T, WATER J. A. AND WITKOP B. 1971. Histronicotoxins: Roentgen-Ray Analysis of the Novel Allenic and Acetylenic Spiroalkaloids Isolated from a Colombian Frog, *Dendrobates histrionicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68(8):1870–1875.