

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ALCALOIDES EN LA RANA
Eleutherodactylus johnstonei.

DAVID HERNÁNDEZ CÓRDOBA

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE

2014

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ALCALOIDES EN LA RANA
Eleutherodactylus johnstonei.

DAVID HERNÁNDEZ CÓRDOBA

PROYECTO DE GRADO

ASESOR: SANTIAGO CASTAÑO Ph.D.

**CO-ASESORES: GUILLERMO MONTOYA Ph.D., HELBERG ASECIO Ph.D.,
FERNANDO CASTRO HERRERA Ph.D.**

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

SANTIAGO DE CALI, VALLE

2014

Contenido

1. Resumen	4
2. Introducción.....	6
3. Planteamiento del problema.....	7
4. Marco teórico.....	9
5. Objetivos	13
5.1 Objetivo general	13
5.2 Objetivos específicos	13
6. Metodología.....	14
6.1 Matriz de marco lógico.	14
6.2 Materiales y equipos	16
7. Resultados y discusión.....	20
7.1 Extracción de alcaloides.....	20
7.2 Reconocimiento de alcaloides.....	20
7.3 Análisis por GC-MS.....	22
7.4 Análisis por LC-ESI/MS.....	29
8. Impacto ambiental	34
9. Disposiciones vigentes.....	35
11. Recomendaciones	37
12. Referencias bibliográficas	38
ANEXOS.....	43

1. Resumen

En la piel de los anfibios venenosos se han reportado una gran variedad de compuestos entre los que se incluyen esteroides, aminas, proteínas, péptidos y alcaloides. Para el caso de los alcaloides estos se diferencian de los demás compuestos en que no son sintetizados *de novo* por los anfibios sino obtenidos a partir de la dieta. Sin embargo se ha reportado que en algunos casos los alcaloides obtenidos a nivel dietario, sufren pequeñas modificaciones en su estructura por medio de mecanismos presentes en las ranas que aun son desconocidos. A algunos de los alcaloides bio-acumulados por los anfibios en su piel se les ha atribuido la mayoría de los efectos tóxicos y se han hecho propuestas de modificaciones mediante química combinatoria para desarrollar nuevos compuestos semisintéticos con propiedades fisicoquímicas y farmacológico-terapéuticas a partir de estos alcaloides de origen anfibio.

De forma relativamente reciente *Eleutherodactylus johnstonei* una rana proveniente de las Antillas entro a territorio colombiano y se convirtió en una especie invasora, es una rana de colores crípticos sin señales de advertencia (aposematismo). En un estudio en Cuba se encontró que algunas especies de ranas del genero *Eleutherodactylus* presentan alcaloides en su piel, por lo cual se espera que *E. johnstonei* pueda tenerlos también.

En este trabajo (de “profiling”) se hizo una extracción líquido-líquido a partir de la piel *E. johnstonei* en búsqueda de alcaloides, posteriormente se efectuó una separación cromatografica e identificación mediante cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS). Los datos obtenidos fueron comparados con la base de datos NIST08.L y bibliografía de reportes de alcaloides de anuros. Los resultados de la cromatografía de gases y los espectros de masas para cada pico sugieren la presencia de al menos 15 sustancias, de las cuales 4 no presentaban coincidencia en su espectro de masas con la base de datos NIST, una de estas sustancias presentaba coincidencias similares a las que han sido reportadas para pumiliotoxinas mientras que otra es similar a quinolizidinas disustituidas.

Para determinar el peso molecular de los compuestos hallados se utilizo cromatografía líquida acoplada a masas con ionización por electrospray (LC-ESI/MS), con los resultados obtenidos se hizo una búsqueda de alcaloides que coincidan en el peso molecular en las tabulaciones de Daly *et al.* (Alkaloids from amphibian skin, 1999) y (2005). Se sugieren algunos alcaloides que tienen el mismo peso reportado en las referencias mencionadas, y uno de ellos mostraba coincidencia con la fragmentación obtenida en el análisis por GC-MS, por lo cual existe una alta probabilidad de la presencia de una aPTX, posiblemente la 241H.

En este trabajo se describen posibles alcaloides presentes en la especie estudiada, sin embargo con el fin de determinar la estructura molecular de los

compuestos encontrados se recomiendan métodos de identificación primarios como ionización a presión atmosférica acoplada a masas (API/MS) o resonancia magnética nuclear (NMR).

2. Introducción

Los metabolitos secundarios de plantas incluyen diversas sustancias químicas, como los alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos, han sido ampliamente usados en la nutrición y cuidado de la salud humana, sin embargo muchos son obtenidos por extracción de su origen, sea animal o vegetal. (Ramawat & Mérillon, 2013). Se ha visto que algunos animales producen alcaloides tóxicos, posiblemente como mecanismo de defensa a depredadores potenciales. Muchos invertebrados, como insectos fitófagos y moluscos son ejemplos de animales productores de alcaloides. Por otra parte en cuanto a los vertebrados son pocas las especies capaces de producirlos (Savitzky, A. *et al.*, 2012) y tan solo se tiene evidencia de que una familia de entre todos los anfibios es capaz de sintetizarlos, la familia de las salamandras que producen una clase de alcaloides conocidos como samandarinas, presumiblemente a partir de colesterol (Schöpf, 1961), (Daly *et al.*, 2005).

Se considera que las demás especies de anfibios que presentan alcaloides en su piel, los han obtenido de la dieta. Tradicionalmente se ha considerado las familias *Dendrobatidae* y *Bufo* como los anuros tóxicos. Sin embargo, hoy en día se ha demostrado que otros grupos de anuros también presentan alcaloide y en especial Pumiliotoxinas (PTX), como ocurre con varias especies de ranas del género *Eleutherodactylus* de Cuba, siendo este género perteneciente a una familia de ranas catalogadas como no venenosas.

Las PTX han sido descritas como agentes cardiotónicos en conejillos de indias (Daly, *et al.*, 1990) y tóxicos o repelentes para *Aedes aegypti* (Weldon, 2006). Debido a que se ha propuesto que las PTX interactúan con un dominio específico para alcaloides dentro de los canales de sodio dependientes de voltaje se puede partir de estas para la investigación y desarrollo de nuevas moléculas con potencial terapéutico para algunas cardiomiopatías (Gusovsky, *et al.*, 1992).

Este trabajo propone hacer un tamizaje en búsqueda de alcaloides en la especie de rana invasora *Eleutherodactylus johnstonei*, con el fin de encontrar moléculas naturales con aplicación farmacéutica dentro del campo de la cardiología, así como una fuente costo-efectiva de tales moléculas, teniendo en cuenta la dificultad que presenta sintetizarlas en un grado alto de pureza óptica. También se puede establecer un punto de partida para la síntesis de sustancias análogas a las naturales basados en estudios de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR por sus siglas en inglés).

3. Planteamiento del problema

Se ha encontrado en muchos casos que el compuesto activo en determinado receptor que funciona en dosis más bajas, es decir el más potente, corresponde a un alcaloide (Wink, 2000). Por esto se los considera como una herramienta biológica poderosa para estudiar las respuestas farmacológicas en diversos organismos, y de esta manera poder contribuir al desarrollo y fabricación de nuevas sustancias medicamentosas. A nivel de plantas, los alcaloides comprenden cerca del 15,6% de los productos naturales conocidos, pero constituyen casi el 50% de los productos naturales actualmente en el mercado con importancia farmacéutica y biológica. Se ha reportado que el 35,9% de los alcaloides a los que se les ha realizado pruebas en 20 ensayos o más tienen un nicho en el campo farmacéutico. Hasta el 2001 se desconocía la función de cerca del 76,4% de los alcaloides encontrados en fuentes naturales (Cordell *et al.*, 2001) y no hay reportes nuevos hasta la fecha que supongan avances significativos en este campo.

Con respecto a los otros compuestos que se pueden encontrar en los productos de origen natural, los alcaloides muestran una diversidad más amplia a nivel de su esqueleto estructural y grupos funcionales. Los alcaloides corresponden a tan solo el 15,6% del número de compuestos usados en productos naturales, pero aun así tienen el 32,5% de las estructuras. Estos además tienen uno o más centros quirales y casi nunca ocurren en mezclas racémicas sino que se encuentran en un grado alto de pureza óptica de una forma enantiomérica (Cordell *et al.*, 2001).

En el ámbito farmacéutico es importante obtener principios activos con un alto grado de pureza óptica pues se sabe que distintos enantiómeros pueden tener efectos farmacológicos distintos, debido a la afinidad que puedan tener con distintas proteínas. Un caso muy conocido es el de la talidomida, la cual tiene dos isómeros ópticos, uno de ellos cumple con la acción farmacológica de aliviar las náuseas durante el embarazo y el otro interfiere con el flujo sanguíneo hacia el feto en desarrollo y por esto causaba defectos de nacimiento como la focomelia, se ha demostrado que el uso de fármacos enantioméricamente puros disminuye los posibles efectos secundarios (Anderson & Page, 2004).

Se puede decir la diversidad de alcaloides en anfibios es muy grande, llegando a encontrar más de 800 compuestos biológicamente activos, los cuales pertenecen a 20 clases estructurales. La mayoría de estos alcaloides tienen actividad biológica comprobada, y a muchos se les ha hallado efectos con posibles aplicaciones terapéuticas como antitumorales, antinociceptivos y cardiotónicos (Daly *et al.*, 2005).

El gran intervalo en la diversidad de grupos funcionales que poseen los alcaloides los hace capaces de ser modificados estructuralmente de forma fácil y económica, de esta manera se pueden generar compuestos con actividad biológica modificada, reduciendo o disminuyendo la lipofilidad de estos según sea necesario. De esta manera se pueden obtener nuevos principios biológicamente activos usando como punto de partida alcaloides obtenidos a partir de fuentes naturales, en este caso la rana *Eleutherodactylus johnstonei*, una especie de anfibio a la cual no se le ha realizado un tamizaje en búsqueda de alcaloides, pudiendo llegar a desarrollar sustancias farmacológicamente activas a partir de estos. Aunque este género se considero como no toxico, en un estudio reciente realizado en Cuba se encontró que *E.iberia* y *E.orientalis* presentaban en su piel PTX.

Las PTX pueden ser moléculas promisorias dirigidas al tratamiento de canalopatías en las que están involucrados canales de sodio o de potasio (ambos dependientes de voltaje). Sin embargo la presencia de estas moléculas en anfibios es muy baja y la obtención de estas a partir de los anfibios puede generar un impacto ecológico negativo dado que son un grupo en declive (Wake, 1991). Por otro lado está la dificultad que conlleva sintetizar las PTX Ab-initio y en un buen grado de pureza óptica, siendo procesos largos y con materiales y métodos poco convencionales (Overman, Bell, & Ito, 1984)

Actualmente hay una proliferación en el desarrollo de una clase de principios activos conocidos como “me-too”, los cuales no ofrecen ventajas significativas frente a los medicamentos que ya están presentes en el mercado (Borer, 1999), se ha propuesto que las PTX interactúan para lograr su efecto farmacológico con un dominio especial para alcaloides, por lo cual pueden ser consideradas como nuevas entidades químicas, es por esto que se puede pronosticar un nicho para las PTX en el futuro de la farmacología cardiaca.

Por lo anterior se propone conseguir fuentes de PTX en la naturaleza que no infrinjan impacto a la población de ranas nativas. Considerando el carácter invasor de *E. johnstonei*, que tienen una gran capacidad reproductiva y colonizadora, y que ha llevado al desplazamiento de dos especies de rana nativas: *Dendrosphus colombianus* y *Colosthetus fraterdanielli* (Castillo & Montes, 2012), se propone evaluar si en esta especie está presente al menos una PTX para proponer esta rana como fuente de de la molécula para investigaciones farmacológicas.

4. Marco teórico

En gran cantidad de organismos se encuentran sustancias tóxicas, estas pueden servir como defensa ante los depredadores o como forma de atacar las presas. Se ha encontrado que la mayoría de los anfibios contienen en sus pieles sustancias nocivas al ser humano y demás organismos (Daly *et al.*, 1987), generalmente se ha constatado que el tipo de sustancia biológicamente activa tiene una relación filogenética, es decir que individuos de especies relacionadas suelen tener compuestos o familias de compuestos estructuralmente semejantes, de esta manera los sapos del género *Bufo* presentan niveles altos de alquilaminas indólicas, mientras que los anuros de la familia *Leptodactylidae* contienen en sus pieles aminoras fenólicas. (Daly J. W., 1995). Aunque algunas de estas sustancias nocivas se han demostrado son producidas *de novo* por cada individuo, existen algunas como los alcaloides que no se encuentran en anuros criados en cautiverio, por lo cual se ha considerado tradicionalmente que son obtenidas a partir de la dieta, pero algunas ranas del género *Dendrobates* tienen la capacidad de producir enzimas para modificar los alcaloides previamente ingeridos (Daly *et al.*, 2003).

Los alcaloides se pueden definir como compuestos orgánicos, generalmente de origen vegetal, con un nitrógeno de carácter básico e intracíclico y derivado de aminoácidos (Arango, 2010), representan el grupo más diverso entre los metabolitos secundarios, con más de 12000 estructuras definidas (Wink, 2000). La extracción de los alcaloides se basa en su carácter básico, debido a esto su solubilidad está determinada en función al pH, de esta manera un alcaloide se encontrará en su forma molecular a pH básico y por esto será soluble en solventes orgánicos tales como cloroformo y diclorometano, por otra parte a pH ácido se encontrarán en forma ionizada y será soluble en solventes polares como el agua o soluciones hidroalcohólicas (Arango, 2010). El proceso de disolución de los alcaloides en cada medio se puede ayudar con un equipo de ultrasonido, que se ha probado asiste la extracción clásica con solventes y es considerada una herramienta poderosa en la extracción de metabolitos secundarios, tanto vegetales como animales, reduciendo el tiempo de extracción de 24 horas a tan solo 1 hora, y logrando obtener mayor porcentaje de compuestos extraídos para diferentes drogas vegetales (Vinatoru, 2001). Poder lograr una extracción en un tiempo menor de contacto de los analitos con el solvente trae consigo una gran ventaja teniendo en cuenta que se ha demostrado la formación de artefactos alcaloidales cuando se dejan en contacto por más de 10 horas en un medio fuertemente básico, especialmente con acetona (Housholder & Camp, 1965).

En un estudio realizado en Cuba por Rodríguez encontró que varios alcaloides de la clase de la Pumiliotoxina-A (PTX-A) en ranas del género *Eleutherodactylus*; *E. iberia* y *E. orientalis*, mientras que un tamizaje inicial en *E. atkinsi* resultó negativo

(Rodríguez, A. *et al.*, 2010), el descubrimiento de alcaloides en este género que se había considerado como no tóxico abre nuevas ventanas al descubrimiento de alcaloides en mayor número de ranas, si es que no en su totalidad, aunque algunas pueden tener la capacidad de acumular alcaloides de la dieta en concentraciones muy pequeñas. Dado que hay una relación filogenética con las clases de compuestos que se encuentran en las ranas, se puede esperar que en caso de encontrar alcaloides en *E. johnstonei*, estos pueden estar relacionados con los encontrados en el estudio realizado en Cuba con otras ranas del mismo género.

Eleutherodactylus johnstonei es la segunda especie de anuro más ampliamente distribuido en el mundo, solo superada por el sapo de la caña (*Bufo marinus*), es una rana nativa de las Antillas menores pero ha sido introducida accidental e inadvertidamente al continente Americano y a otras islas del Caribe y Pacífico (Kaiser *et al.*, 1997), además se encuentra ampliamente distribuida en las zonas urbanas de Colombia alcanzando el 10,5 % de distribución geográfica y se prevé que su distribución aumente a medida avanza la infraestructura vial y la urbanización. Se piensa ha sido introducida mediante el comercio de plantas ornamentales, por lo cual ha llegado a colonizar infraestructura humana en áreas silvestres remotas, afectando directamente las especies endémicas del área invadida y evitando su recolonización (Castro y Urbina-Cardona, 2011).

Las PTX son alcaloides con núcleo de indolizidina sustituido en el carbono 6 por una cadena alifática de tamaño variable (Fig.1), esta le confiere ciertas propiedades lipofílicas a este tipo de metabolitos secundarios, según sus sustituyentes se han encontrado distintas propiedades farmacocinéticas y efectos tóxicos, basados en su permeabilidad y afinidad por los receptores (Weldon, 2006).

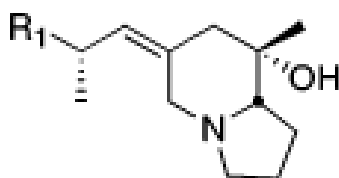


Figura 1. Estructura básica de las PTX. (Daly *et al.*, 2005)

En general todas las PTX se han considerado ampliamente distribuidas entre especies de anfibios y artrópodos como las hormigas (Saporito, R. *et al.*, 2004) (Saporito, R. *et al.*, 2007). Se conoce que son tóxicas y han sido descritas como potentes agentes cardiotónicos, por su capacidad de modular los canales dependientes de voltaje de sodio y potasio, varios de estos alcaloides pueden tener aplicaciones terapéuticas como moduladores de la actividad cardíaca (Vandendriessche, T. *et al.*, 2007). Dadas las bajas concentraciones en las que se

pueden encontrar algunos alcaloides, es importante hacer un tamizaje para iniciar la búsqueda de fuentes rentables y abundantes de las PTX.

Tradicionalmente se han usado reactivos con yodo y metales pesados como agentes precipitantes debido a la capacidad que tienen los alcaloides de combinarse y formar grupos que fluorescen bajo luz UV (Arango, 2010). Entre estos reactivos se encuentran el reactivo de Mayer, Valser y Draggendorf que han sido usados solos (Yoder & Mahlberg, 2014) o en combinación (Travell, 1934).

El reactivo de Valser ha sido descrito como un reactivo de 5 a 15 veces más sensible para la detección de alcaloides que el reactivo de Mayer, y se ha preferido para aplicaciones cualitativas, sin embargo se recomienda el uso de los 2 conjuntamente para de esta manera reducir la probabilidad de aparición de falsos positivos producidos por proteínas y péptidos, entre otras impurezas (Travell, 1934). Se pueden usar en solución, en cortes frescos de tejidos vegetales y como revelado en cromatografías de capa fina (TLC), de esta manera sirviendo como agentes precipitantes o como indicadores cualitativos colorimétricos (Yoder & Mahlberg, 2014).

Se han usado métodos de perfilamiento o “profiling” como GC-MS para investigación de pequeñas partes del metaboloma de distintos organismos, siendo adecuados para moléculas pequeñas y de baja polaridad. Sin embargo gran cantidad de componentes obtenidos no han podido ser identificados formalmente (Halket J. *et al.*, 2004). En cuanto a los alcaloides en anfibios en algunos casos se ha establecido las estructuras rigurosamente, mientras que en algunos casos se ha propuesto la estructura tentativa (Daly *et al.*, 2005). La estructura de las pumiliotoxinas A y B ha sido elucidada haciendo uso de cristalografía por Rayos X y NMR protonica (Daly *et al.*, 1980).

Daly, Garraffo y Spande (1999) hicieron una primera compilación de cerca de 500 alcaloides que habían sido detectados en pieles de anfibios, encuentro que se agrupaban en cerca de 20 clases estructurales. Posteriormente los mismos autores (2005) hacen una nueva compilación donde se describen más de 800 alcaloides, en ese trabajo describen los datos de los espectros de masas, espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y las estructuras establecidas o tentativas para cada uno de los compuestos. Los análisis de los espectros de masas se llevaron a cabo con espectrometros de masas con trampa de iones haciendo uso de columnas capilares de sílica para estudiar la fragmentación de los alcaloides y su peso molecular se confirmó con análisis de espectros de masas por ionización química (CI). Los análisis por FTIR por su parte han servido para proveer información acerca de los grupos funcionales presentes en los compuestos estudiados, así como su configuración estereoquímica.

Para determinar el peso molecular de diferentes compuestos se puede usar espectrometría de masas con fuentes de ionización blandas, las cuales no

fragmentan las moléculas estudiadas. Estas inducen preferencialmente la formación y detección de la especie molecular, tanto protonada como desprotonada (Souverain, *et al.*, 2004). Una fuente blanda de ionización ampliamente usada es la ionización por electrospray (ESI), la cual involucra una nebulización del analito en un solvente líquido, al cual se le aplica un campo eléctrico para la formación de iones. Esta técnica produce la formación de iones moleculares sin protonar (M^+), protonados $(M+H)^+$ o desprotonados $(M-H)^-$. Sin embargo también produce iones pseudomoleculares como $(M+Na)^+$, $(M+K)^+$, $(M+NH_4)^+$ y/o $(M+Cl)^-$ (Bhardwaj & Hanley, 2014).

Para la mayoría de los elementos encontrados en compuestos orgánicos hay una correspondencia entre la masa de su isótopo más abundante y su valencia, excepto para el nitrógeno. Es decir que si un compuesto contiene un número impar de nitrógenos, su ion molecular será de número de masa impar. Esto se conoce como la regla del nitrógeno y es generalmente aplicable a la señal del ion molecular en el espectro de masas (McLafferty & Turecek, 1993). Esto es una ventaja a la hora de estudiar alcaloides de anfibios, pues en su mayoría contienen solo un nitrógeno, aunque dos clases contienen generalmente dos nitrógenos: las Pseudofrinaminas y las Spiropirrolizidinas, así como algunos alcaloides sin clasificar.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Comprobar la presencia de alcaloides en individuos de *E. johnstonei* de poblaciones del sur de la ciudad de Cali.

5.2 Objetivos específicos

Extraer, aislar e identificar la presencia de alcaloides en *E. johnstonei*.

Proponer que moléculas pueden ser candidatas a alcaloides de anfibios.

6. Metodología

6.1 Matriz de marco lógico.

Objetivo General: Comprobar la presencia de alcaloides en individuos de <i>E. johnstonei</i> de poblaciones del sur de la ciudad de Cali.			
Objetivos Especifico	Actividad	Indicadores	Supuestos
Extraer, aislar e identificar la presencia de alcaloides en <i>E. johnstonei</i> .	Obtención de permisos de bioética, ambientales y demás documentos legales vigentes.	Permisos obtenidos	
	Captura y mantenimiento de los individuos.	Procedimientos operativos estandarizados.	Se han obtenido los permisos necesarios
	Obtención de las pieles de los individuos capturados.	Pieles obtenidas	Se han capturado los especímenes necesarios.
	Extraer alcaloides totales con solventes orgánicos por medio de extracción en medio ácido.	Extracto obtenido.	Se han diseccionado las pieles necesarias.
	Pruebas cualitativas para alcaloides.	Placas cromatograficas sembradas con extracto y reveladas con reactivos de	Se ha obtenido el extracto.

		reconocimiento de alcaloides.	
Proponer que moléculas pueden ser candidatas a alcaloides de anfibios.	Análisis por GC-MS	Espectros de masas de los alcaloides obtenidos.	La prueba cualitativa de alcaloides resulto positiva.
	Búsqueda bibliográfica para comparar espectros de masas obtenidos.	Estructura de los alcaloides establecida.	Se obtuvieron los espectros de masas.

6.2 Materiales y equipos

Muestreo: se realizaron varios muestreos entre marzo y abril del 2013 en dos localidades del sur de Cali, Valle del Cauca. En el campus de la Universidad Icesi y en un vivero de Ciudad Jardín ubicado en la calle 13 con carrera 100. Se recolectaron ejemplares adultos de ambos sexos de diversos tamaños. Una vez capturados, se trasladaban los ejemplares al terrario de la Universidad Icesi. Se realizó una segunda sesión de muestreos comprendidos entre los meses de agosto del 2013 y enero del 2014, con los cuales se realizó el análisis por LC-ESI/MS.

Diseción y extracción de pieles: Las ranas capturadas, una a una fueron lavadas con agua a temperatura ambiente, fueron introducidas en un recipiente pequeño para ser expuestas a 4°C por aproximadamente 5 minutos en un refrigerador, de esta manera inducir parálisis por hipotermia. Esto con el propósito de eutanasiarlas sin dolor. Una vez las ranas estaba paralizadas se realizaba la descerebración haciendo una incisión a nivel axial y en el foramen magno con un micro punzón. La sujeción de la rana debe hacerse firmemente mientras se flexiona la cabeza del individuo hacia adelante tal como se muestra en la figura 2.

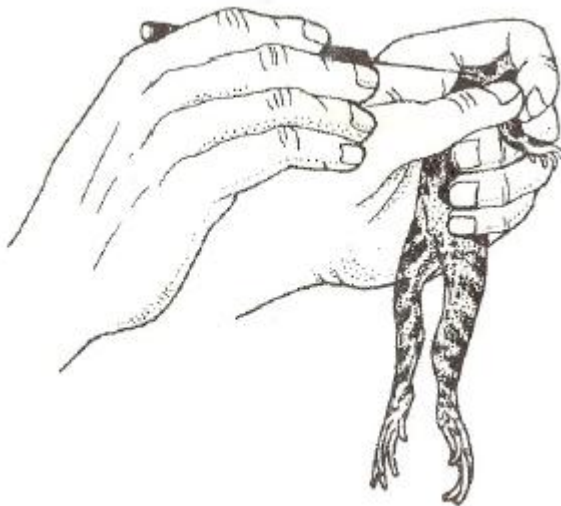


Figura 2. Sujeción de ranas para descerebración (Ureña Chio, 2008).

La punción se efectúa en la intersección del eje céfalo caudal (el equivalente a la línea vertebral del humano) y una línea imaginaria que une los bordes posteriores de las ventanas auriculares, este punto se muestra en la figura 3.

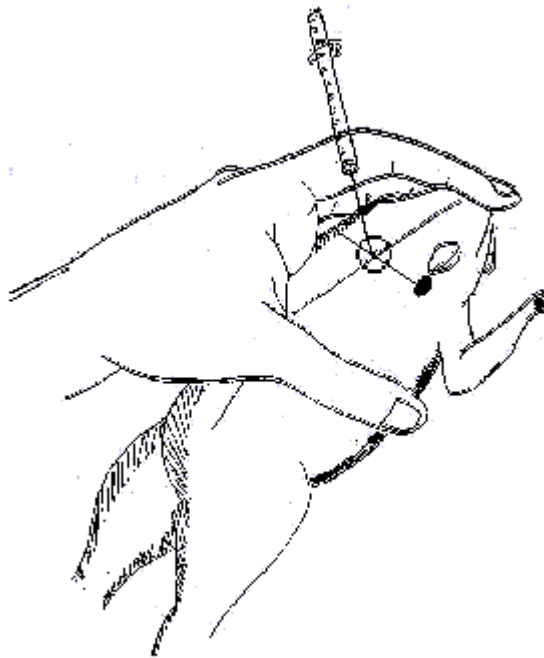


Figura 3. Punto de incisión para la descerebración (Ureña Chio, 2008).

Una vez introducido el estilete, se lo dirige hacia los lados haciendo movimientos circulares con el fin de destruir los hemisferios cerebrales.

Posteriormente se procedió a extraer la piel con pinzas y tijeras de un equipo de disección estándar, y se guardaron en un frasco ámbar con etanol al 70%. Se almacenaron las pieles en una nevera a 4°C.

Extracción y aislamiento de alcaloides: La extracción se realizó con un solvente orgánico en medio alcalino según la metodología descrita por Arango (2010), la cual se muestra en la figura 4. Sin embargo se realizaron algunas modificaciones teniendo en cuenta que los alcaloides objetivo son de carácter lipofílico, por eso no se realizó un desengrase en Soxhlet, también se realizó la maceración en nitrógeno líquido para obtener un tamaño fino de partícula y de esta manera facilitarla. Se pusieron las 100 pieles en un mortero, posteriormente se añadió nitrógeno líquido para congelarlas y se procedió con la maceración hasta obtener un tamaño de partícula fino. Posteriormente se adicionaron 50 mL de HCl 1N para bajar el pH a un valor de 2-3, el cual fue medido con tiras de papel indicador. Se sonicó a una frecuencia de 37 kHz, en baño maría a temperatura de 35 °C, por un período de 10 minutos en un equipo de ultrasonido Elma® Elmasonic E 120 H. Se procedió con filtración al vacío para eliminar los residuos sólidos de piel. Luego se adicionó por triplicado 50 mL de cloroformo y se separó usando un embudo de separación. A la fase acuosa, se le añadieron aproximadamente 30 mL de

hidróxido de amonio para conseguir un valor de pH de 10-11 el cual fue medido con tiras indicadores. Se adiciono por triplicado 100 mL de cloroformo y se sónico bajo las mismas condiciones por 10 minutos. Se deseco la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro, el cual se lavó por triplicado con 10 mL de cloroformo, posteriormente se llevo a sequedad por destilación con presión reducida usando un rotaevaporador Heidolph ® Basis Hal-VAP HL a una presión de 100 mbar y una temperatura de 40 °C. Las muestras secas se almacenaron en neveras a 4°C.

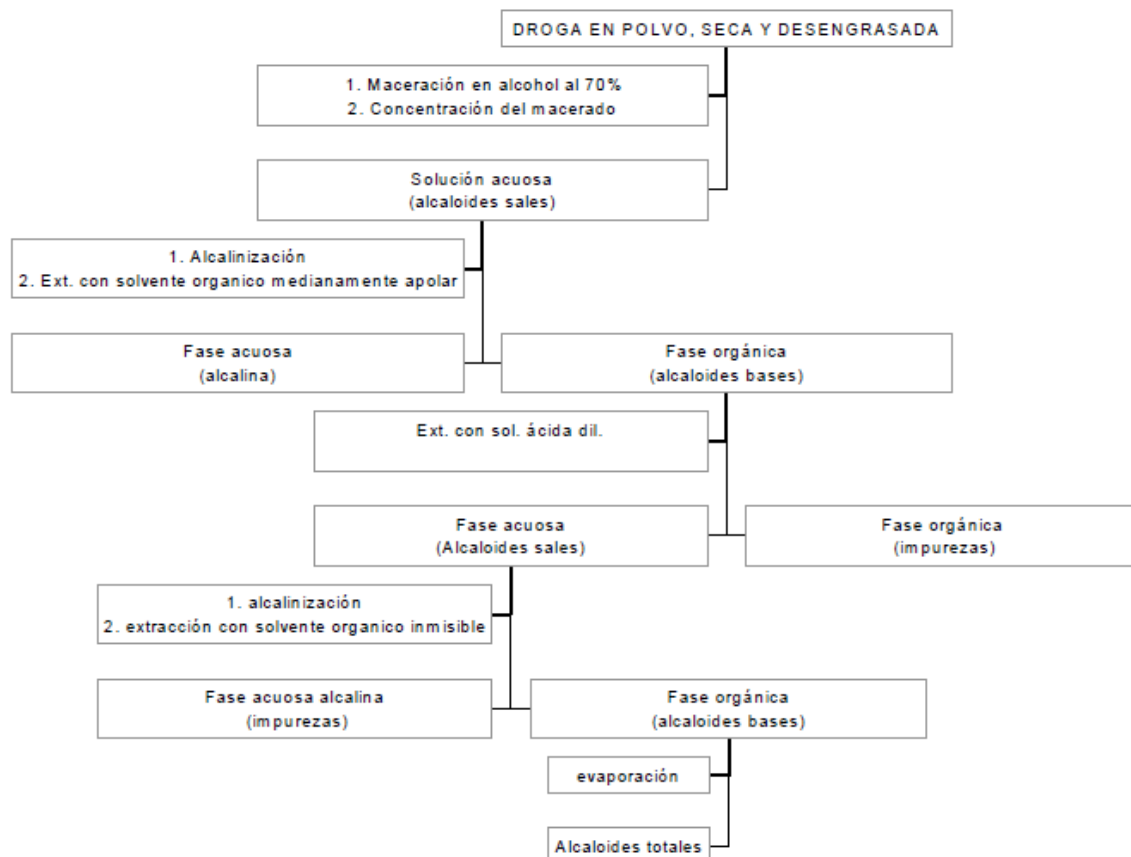


Figura 4. Esquema de extracción de alcaloides totales con solvente orgánico (Arango, 2010).

Reconocimiento de alcaloides: Se disolvió parte del extracto seco en metanol y se sembró en una sección de placa cromatografica de Silica Gel F254 Merck, con un aspersor se roció sobre cada una de las muestras sembradas los reactivos para reconocimiento de alcaloides y se observo bajo luz UV de onda corta. Los reactivos de reconocimiento de alcaloides usados fueron el reactivo de Mayer, Dragendorff modificado y reactivo de Valser. El reactivo de Mayer se preparó disolviendo 1.3 g de bicloruro de mercurio en 60 ml de agua y 5 g de yoduro de potasio y se afora a 100 ml. El reactivo de Dragendorff modificado comprende dos

soluciones: Solución a: 0.85 g de subnitrato de bismuto disueltos en una mezcla de 10 ml de ácido acético y 40 ml de agua y solución b: 8 g de yoduro de potasio disueltos en 20 ml de agua. En el momento de hacer el revelado se mezclaron 5 ml de la solución a con 5 ml de la solución b y 20 ml de ácido acético para luego completar a 100 ml con agua. El reactivo de Valser se preparó disolviendo 10 gr de yoduro de potasio y 5 gr de yoduro de mercurio II en 100 ml de agua destilada, posteriormente se dejó reposar y se filtró al vacío.

Análisis por GC-MS: Los análisis de GC-MS se realizaron adaptando la metodología para análisis de alcaloides de anfibios propuesta por Daly (2005). Los análisis se hicieron empleando un Detector Selectivo Agilent 7890A GC conectado a Agilent 5975C MS. Las muestras fueron procesadas bajo las siguientes condiciones: presión 101.89 kPa, flujo de 34.279 ml/min, volumen inyectado 1 µl. Programa de temperatura: 1 min a 100 °C, seguido 10 °C/min hasta 250 °C por 2 min, seguido 15 °C/min hasta 295 °C por 5 min. El tiempo de corrida fue de 26 min. Se compararon los tiempos de retención para cada pico obtenido y las similitudes de los espectros de masas para cada pico comparándolos estos con la biblioteca de bases de datos NIST08.L y con la bases de datos reportada por, Daly *et al.* (2005), en donde se compila información de los alcaloides reportados en 25 artículos de diferentes autores.

Análisis por LC-ESI/MS: Los análisis por LC-ESI/MS se hicieron empleando un detector Waters ACQ-SQD2#LCA260 usando para la ionización 3 kV a una temperatura de desolvatación de 450 °C y una presión de 1.299474e-005 mbar. La separación por cromatografía líquida fue efectuada en una columna Waters C18 con un límite de presión de 15000 psi, con una temperatura de la columna de 35°C usando un gradiente Agua + 0,1% Acido fórmico/metanol de 0 a 50% en 12 minutos, velocidad de flujo 5 µl/min. Se usó un detector UV UPLC eLambda 800 nm.

7. Resultados y discusión.

7.1 Extracción de alcaloides.

Después de realizar el procedimiento de extracción de alcaloides y secar el extracto, se obtuvo un precipitado lechoso de color blanco, el cual se muestra en la Figura 5.



Figura 5. Extracto alcaloides totales.

7.2 Reconocimiento de alcaloides.

Una vez sembradas las muestras sobre las placas cromatograficas, y reveladas con los reactivos de reconocimiento de alcaloides se produjo una coloración café en el lugar de la siembra y bajo luz UV se observó que todas las fracciones mostraban fluorescencia y para los tres reactivos de reconocimiento, por lo cual se presume como positiva la presencia de alcaloides en el extracto total (Wagner & Bladt, 1996). En la figura 6a se muestra la siembra del extracto de alcaloides totales revelado con el reactivo de Dragendorff, sin luz UV(izquierda), bajo luz UV de longitud de onda corta (centro) y de longitud de onda larga (derecha).

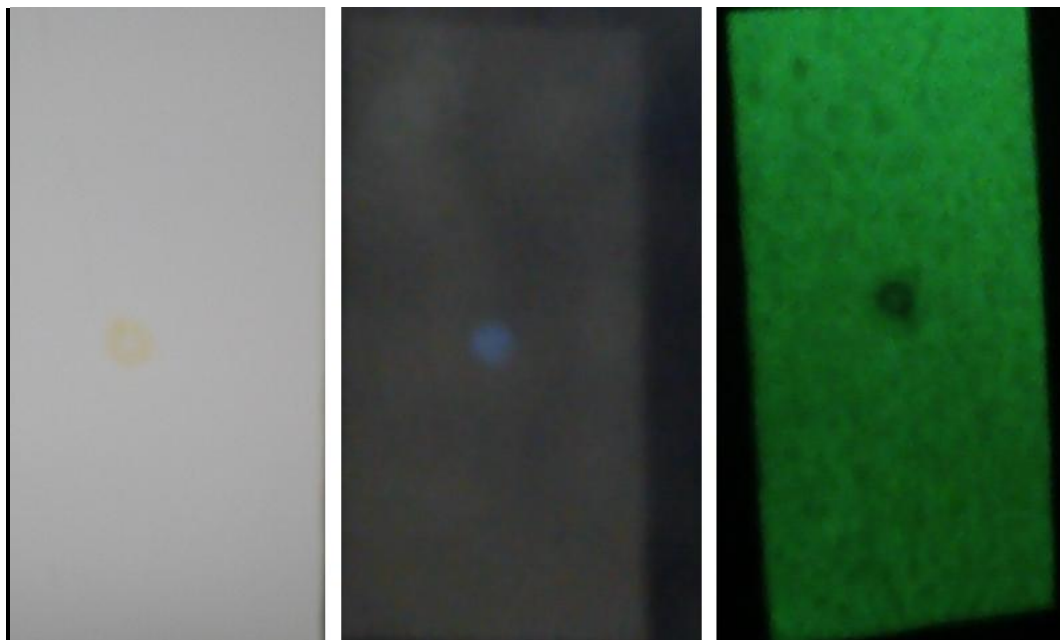


Figura 6. Siembra de alcaloides totales revelado con Dragendorff sin luz UV (izquierda), bajo luz UV de longitud de onda corta (centro) y bajo luz UV de longitud de onda larga (derecha).

También se realizó siembra a la fase orgánica ácida y a la fase acuosa básica, las cuales no deberían tener alcaloides o tenerlos en una concentración menor, dado que en medio ácido los alcaloides van a estar ionizados y por esto van a tender a concentrarse en la fase acuosa y en un medio alcalino van a estar en su forma no ionizada, por lo cual van a concentrarse en la fase orgánica (Arango, 2010). Sin embargo ambas fases mostraron coloración y fluorescencia después del revelado con los 3 reactivos para alcaloides (Figura 7), la fase acuosa básica mostro en general una fluorescencia más intensa, lo cual puede indicar que la naturaleza de los alcaloides encontrados es hidrofílica.

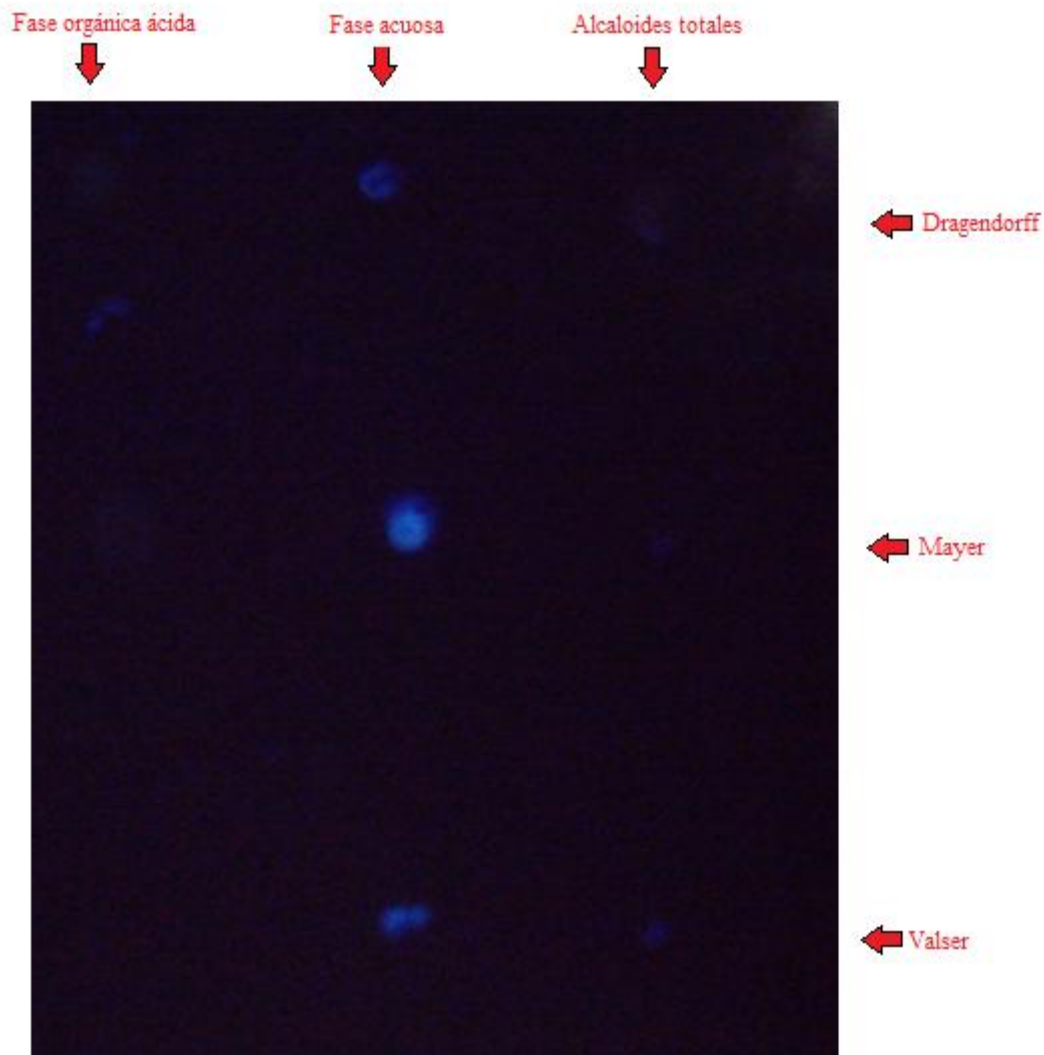


Figura 7. Siembra de fase orgánica ácida (izquierda), fase acuosa (centro) y alcaloides totales (derecha) revelado con Dragendorff (arriba), Mayer (centro) y Valser (abajo) bajo luz UV de longitud de onda corta.

7.3 Análisis por GC-MS.

Se realizó análisis por GC-MS al extracto de alcaloides totales, en el cromatograma obtenido, el cual se muestra en la figura 8, se obtuvieron 15 picos significativos correspondiendo cada uno a un compuesto diferente. Los espectros de masas de 11 de estos compuestos tenían una similitud mayor al 80% con los espectros de masas de la base de datos NIST08.L, por lo cual se considera que

existe una alta correspondencia con los que están reportados en la base de datos del sistema (NIST08.L).

Varios de estos sugieren ser sustancias como ácidos grasos, colesterol y otros componentes lipofílicos frecuentes en muestras de origen animal (Toledo & Jared, 1995), tal como se muestra en la tabla 1.

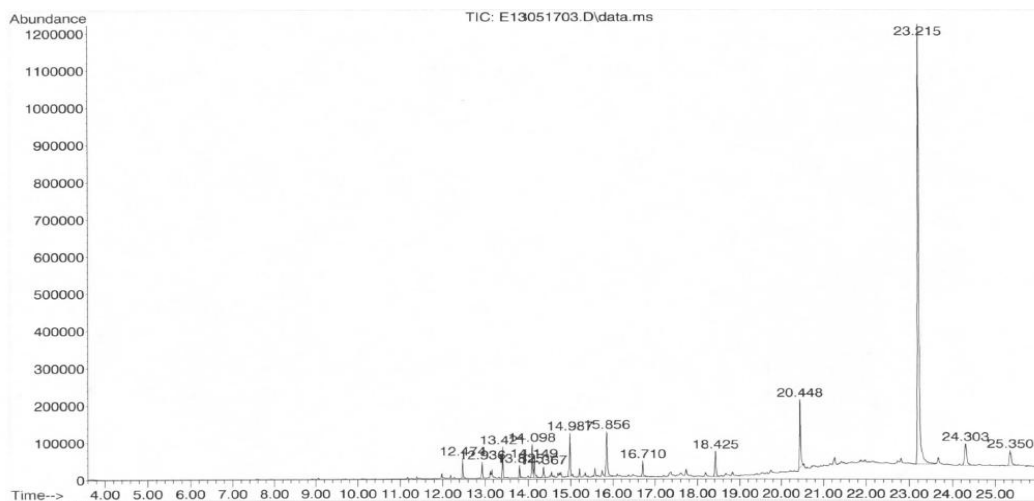


Figura 8. Cromatograma de gases para alcaloides totales.

Tabla 1. Moléculas sugeridas a partir del análisis por GC-MS. A aquellos compuestos con coincidencia menor a 80% (sombreados) se les hizo búsqueda bibliográfica para hallar una molécula candidata.

Pico	RT (min)	Área (%)	Molécula NIST	% similitud	Moléculas candidatas	Referencia
1	12,47	1,66	Hexadecanoic acid, methyl ester	98		
2	12,94	1,40	Hexadecane, 1,1-dimethoxy-	86		
3	13,41	2,37	2-Methylseleno-3-benzo[b]thiophene carboxaldehyde	56	n-octyl n-butyrate	(Kakizaki & Sugie, 2001)
4	13,81	0,89	Octane, 1,1-diethoxy-	38	3-OH PAME, Acetal 3 cis	(Flavier, et al, 1997) (de Freitas, et al, 2013)
5	14,09	2,86	Heneicosane	97		
6	14,14	1,84	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	91		
7	14,36	1,02	Heptadecanoic acid, 16-methyl-, methyl ester	98		
8	14,98	3,95	Heneicosane	76	aPTX 309D, PTX 251D	(Saporito, et al 2007) (Mortari, et al, 2004)
9	15,85	6,36	Oxiraneoctanoic acid, 3-octyl-, methyl ester, cis-	93		
10	16,70	1,56	Heptacosane	91		
11	18,42	3,02	Phthalic acid, cyclohexyl neopentyl ester	72	Esther de Phtalato 279E 1,4-Q 279H 4,6-Q.	(George & Prest, 2001), (Daly, 2005)
12	20,44	6,37	13-Docosamide, (Z)-	97		
13	23,21	59,77	Cholesterol	99		
14	24,30	4,24	Campesterol	93		
15	25,34	2,69	beta.-Sitosterol	90		

Cuatro de los espectros de masas tenían una coincidencia con los espectros de las moléculas sugeridas por la base de datos de menos del 80%, a estos espectros se les realizó una comparación con espectros de masas de bibliografía de alcaloides y otras sustancias. La principal fuente de comparación fue la tabulación de 800 compuestos realizada por Daly *et al.* (1999) y (2005), sin embargo algunos picos no tuvieron coincidencia con los reportados por esta referencia, por lo cual se tuvo que hacer una búsqueda bibliográfica más extensa de alcaloides de anfibios y otras sustancias analizadas por GC-MS, de esta manera se encontró coincidencia con algunas sustancias alcaloidales y no alcaloidales, como se detalla más adelante.

En la figura 9 se muestra el espectro obtenido para el pico número tres, el cual solo contaba con 56% de similitud con la molécula sugerida por la biblioteca. Al revisar en bibliografía de identificación de compuestos por espectros de masas se encontró que presenta similitud con el espectro de n-octyl-butyrate, el cual ha sido descrito como un componente en la feromona sexual femenina de *Trigonotylus caelestialium* (Kakizaki & Sugie, 2001) un insecto parásito de las hojas de arroz,

pues presenta los fragmentos m/z 89 (100), 71(85) y 112. Dado que como se ha mencionado antes los anfibios son capaces de secuestrar los componentes de los insectos que consumen, es viable que este compuesto pueda estar presente en la piel de *E. johnstonei*.

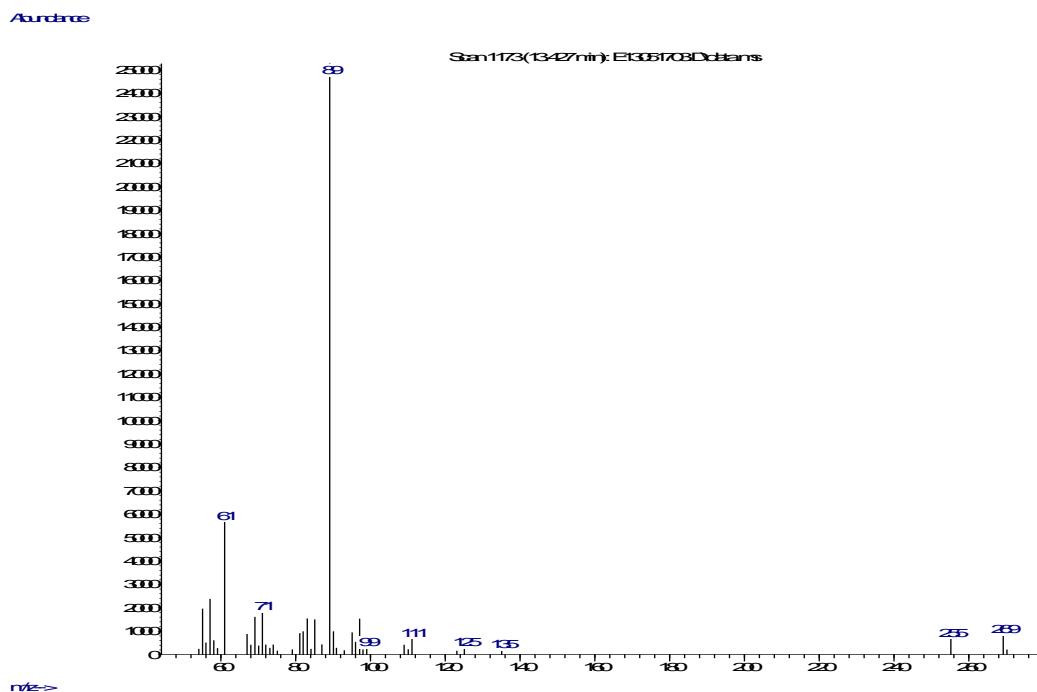


Figura 9. Espectro de masas para el pico 3.

Para el pico 4, el cual presentaba 38% de similitud con la molécula sugerida por la biblioteca, se encontró que presentaba dos picos de m/z 103(100) y 75 (28) que también presenta un compuesto fragante sintético llamado Acetal 3 cis (de Freitas, Vieira, dos Santos, & Gusevskaya, 2013). Sin embargo otra molécula encontrada en la bibliografía; el metil ester de ácido 3-hidroxipalmitico (3-OH PAME) presenta los fragmentos m/z 103(100), 74 y 268 (Flavier, *et al.*, 1997). Como se observa en la figura 10 el espectro de masas del pico 4, presenta el pico base en 103, un pico en 75 y otro en 269 que pueden corresponder a la escisión en C2-C3 del 3-OH PAME protonado y a la pérdida del grupo alcoholico del carbono 3 respectivamente.

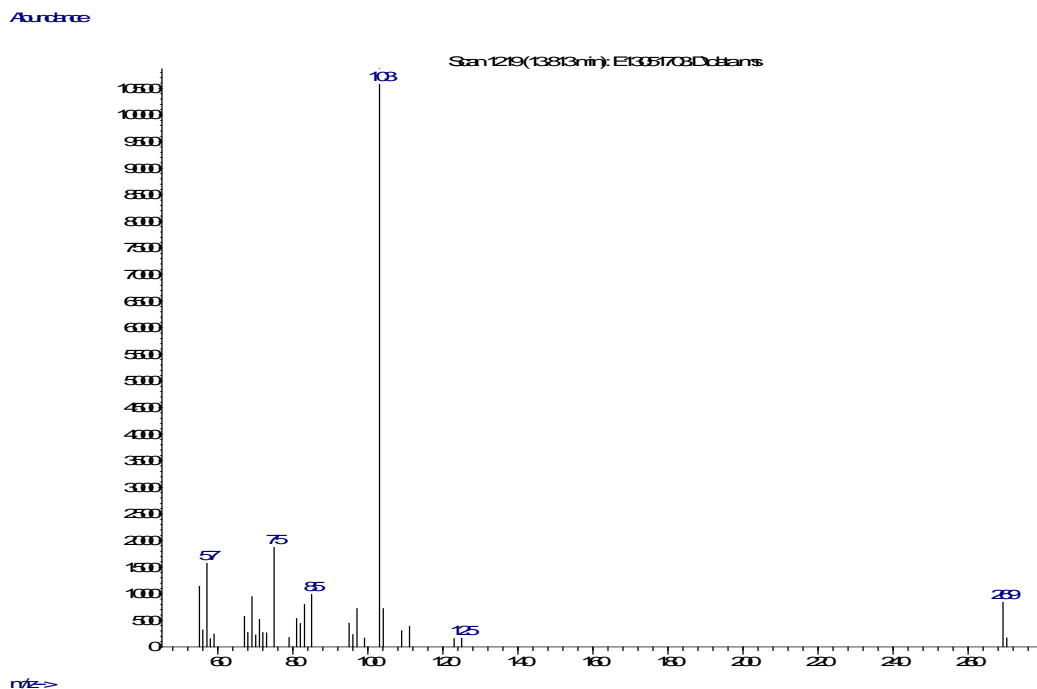


Figura 10. Espectro de masas para el pico 4.



Figura 11. Estructura química de 3-OH PAME. (Flavier, *et al.*, 1997)

Este compuesto ha sido identificado como un auto regulador de virulencia en *Ralstonia solanacearum*, una bacteria fitopatogénica presente en una amplia gama de plantas huésped, colonizando el xilema. Debido a que el primer compuesto con coincidencia es sintético y este es producido por una bacteria ampliamente distribuida, hay más probabilidad que el 3-OH PAME esté presente en la muestra de pieles de *E. johnstonei*.

El pico 8 presentó una coincidencia en la biblioteca del 76% con el espectro de masas del Heneicosano, en la búsqueda bibliográfica realizada se encontró que presentaba un pico en m/z 70 y 182 que han sido reportados como diagnósticos para las allopumiliotoxinas (aPTX) (Daly, *et al.*, 2005) y los picos en m/z 110 y 84 reportados por Daly *et al.* (1980) para la PTX 251D (Figura 13). No presenta los picos en m/z 193 ni 166 encontrado para varios alcaloides de la clase de las PTX, encontrados en el estudio en Cuba por Rodríguez *et al.* (2010). Puede tratarse de aPTX 309D reportado por Saporito *et al.* (2007) debido a que tal como se muestra en la figura 12 presenta el pico en m/z 310 que puede ser el fragmento generado por la molécula protonada.

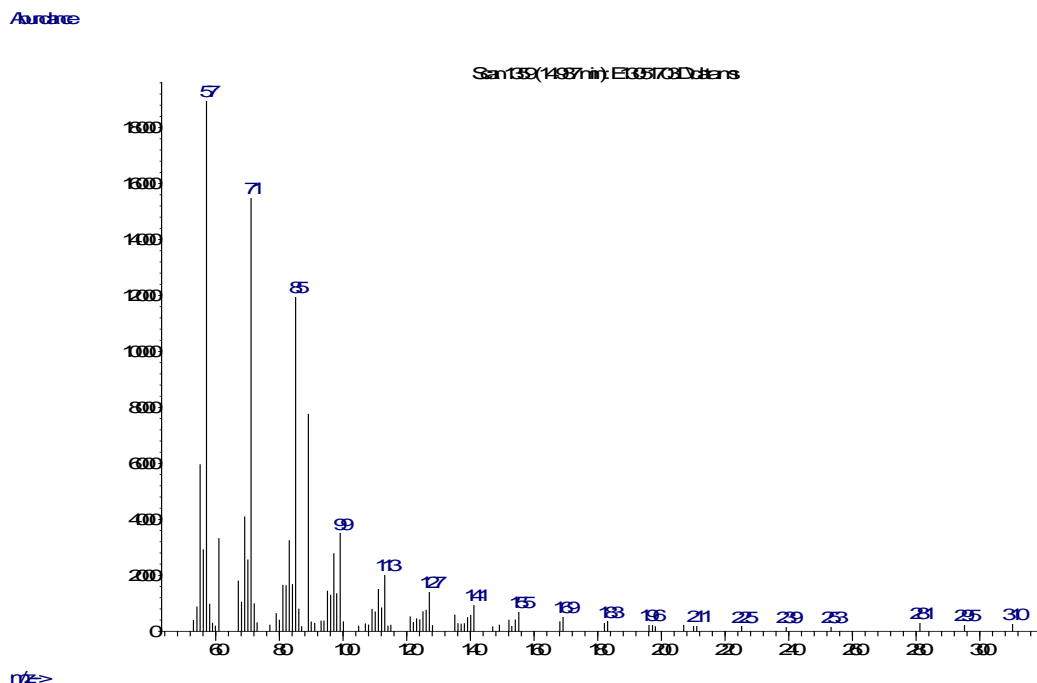
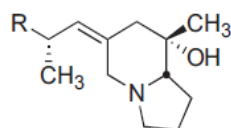


Figura 12. Espectro de masas para el pico 8



PTX

- 251D R = (CH₂)₃CH₃
 307A R = CH₂CH=C(CH₃)CHOHCH₂CH₃
 323A R = CH₂CH=C(CH₃)CHOHCHOHCH₃

Figura 13. PTX 251D (Daly *et al.*, 2005)

Finalmente en la figura 14 se muestra el espectro de masas obtenido para el pico 11, el cual tuvo una coincidencia de 72% con la molécula sugerida por la biblioteca NIST, la cual era un ftalato. En la búsqueda bibliográfica se ha descrito el pico base de m/z 149(100) y de 57 como diagnósticos para esta clase de compuestos, estos son usados como plastificantes en la manufactura de ciertos polímeros (George & Prest, 2001). Dado que estos componentes no están enlazados químicamente al plástico sino adsorbidos, pueden lixiviarse de la matriz hacia el medio. Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron pipetas pasteur, frascos y viales que pueden contener ftalatos como ingredientes plastificantes, por lo cual

una posibilidad es que se haya contaminado la muestra. Sin embargo también presenta coincidencia con dos quinolizidinas disustituidas: 279E 1,4 Q y 279H 4,6 Q (Daly, *et al.*, 2005). Presenta los picos de m/z 279 (4), 150(14) y 84 presentes en la primera molécula y 279(1), 207, y 84 (6) presentes en la segunda. En este caso aunque es posible que se trate de una quinolizidina disustituida, los picos diagnósticos reportados por George y Prest (2001) para ftalatos, hacen más probable que se trate de un contaminante.

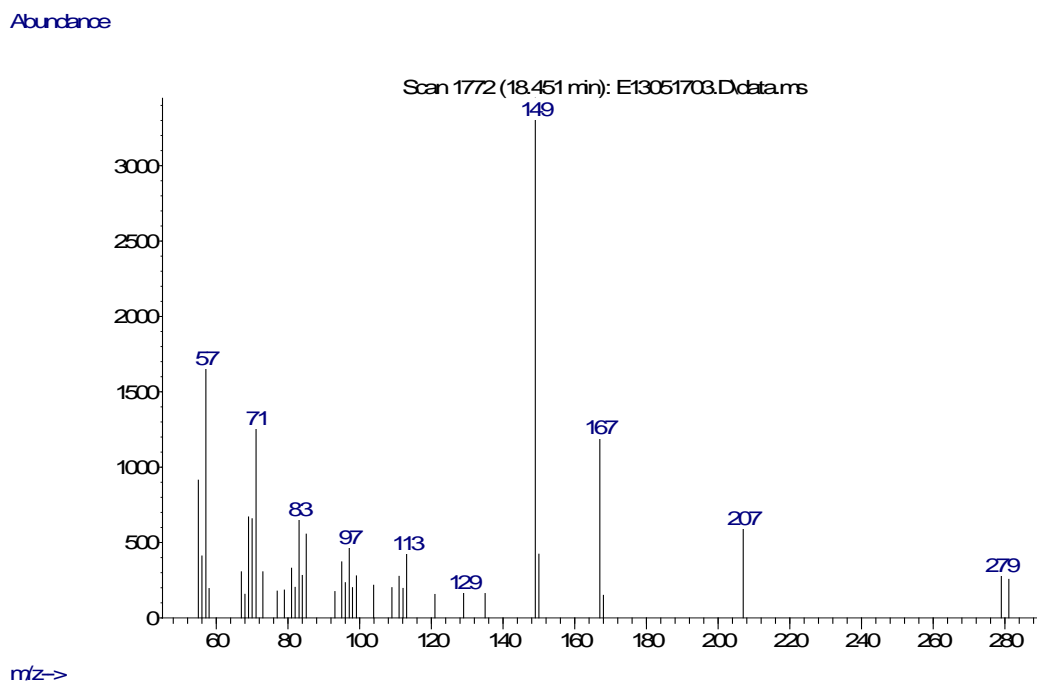


Figura 14. Espectro de masas para el pico 11.

Teniendo en cuenta los resultados y la metodología usada, en este trabajo se propone que pueden existir varias moléculas candidatas a alcaloides que pueden estar presentes en algunos de los picos observados en la cromatografía GC. Esto se soporta con la evidencia de diagnóstico colorimétrico mediante las pruebas de Dragendorff, Mayer y Valser.

Entre estas moléculas se sugieren dos alcaloides para dos de los picos no identificados por la base de datos de espectros de masas NIST08.L, hay una probabilidad alta de que el pico 8 corresponda a una aPTX, sin embargo con el análisis por GC-MS no se puede ser concluyente frente a este resultado.

Una gran dificultad del análisis radica en que estas moléculas son termolábiles y por ende se necesita una gran cantidad de analito para una detección exitosa, en ciertas ocasiones se llegó a sacrificar hasta 5000 ranas del género *Phyllobates* (Tokuyama, *et al.*, 1960). De esta manera los investigadores obtuvieron incluso

gramos de alcaloides totales, lo cual facilitó considerablemente el análisis mediante esta metodología.

Se debe tener en cuenta otra dificultad del análisis por GC-MS, que es la falta de sustancias de referencia purificadas, precisamente por la baja concentración de alcaloides en anfibios, para poder realizar un análisis estructural completo (Clarke, 1996). Debido a las pequeñas cantidades en las que suelen encontrarse ciertos compuestos de origen natural, especialmente en anuros se dificulta realizar métodos primarios o de "fingerprinting" (huella dactilar), pues estos requieren una mayor cantidad de analito y más mediciones (Halket, J. *et al.*, 2004).

Se ha logrado sintetizar diferentes alcaloides de la clase de las PTX, como PTX-C (Oppolzer & Flaskamp, 1977), PTX-B y PTX 251D (Overman, Bell, & Ito, 1984) e isómeros de (-)-PTX-C (Sklenicka, *et al.*, 2002). Mediante síntesis se pudo llegar a caracterizar por resonancia magnética nuclear protonica ($^1\text{H-NMR}$) y carbonica ($^{13}\text{C-NMR}$), así como difracción por rayos X su estructura, y de esta manera usar estas técnicas primarias como apoyo a los análisis realizados por GC-MS, haciéndolos así más fiables.

7.4 Análisis por LC-ESI/MS

Se realizó un análisis por cromatografía líquida acoplada a masas de ionización por electrospay (LC-ESI/MS). En el cromatograma obtenido se obtuvieron cerca de 18 picos, de los cuales se logró obtener el espectro de masas de 12 de ellos. De los 18 picos, tres mostraron absorción significativa en el espectro ultravioleta visible (UV-VIS) y se pudieron obtener dos de estos espectros. En la figura 15 se muestra el cromatograma y la correspondiente absorción en UV-VIS.

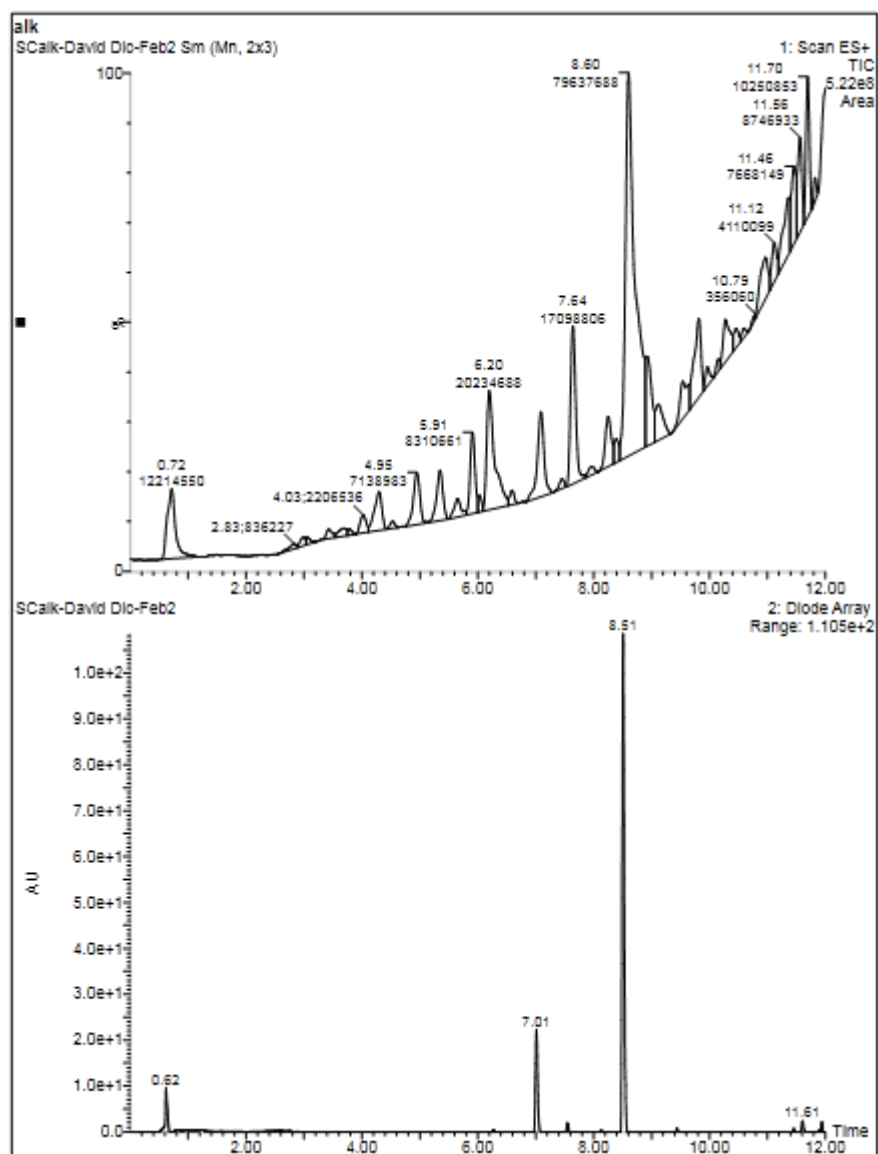


Figura 15. Cromatograma liquido para alcaloides totales.

Para seis de los picos obtenidos por la separación por cromatografía líquida se encontró coincidencia en el peso molecular con alcaloides reportados por Daly *et al.* (1999 y 2005).

Tabla 2. Iones moleculares obtenidos en el análisis por LC-ESI/MS.

Pico	RT (min)	Ion molecular (m/z)	Posibles coincidencias	Clase de alcaloide	Formula molecular	Especie molecular
1	3,99	158,23	-	-	-	-
2	4,26	204,29	181A	Izidina	C ₁₂ H ₂₃ N	(M+Na) ⁺
			203A	5,8-I	C ₁₄ H ₂₁ N	(M+H) ⁺
3	4,96	160,27	C ₉ H ₁₁ N ₃	Sin clasificar	-	(M+H) ⁺
			C ₉ H ₁₇ NO	Sin clasificar	C ₉ H ₁₇ NO	(M+K) ⁺
4	5,33	194,28	193 D,F	OHQ, DeoxyPTX	C ₁₃ H ₂₃ N	(M+H) ⁺
			195 A, J	DHQ	C ₁₃ H ₂₅ N	(M-H) ⁻
5	5,89	228,34	205A	5,8-I	C ₁₄ H ₂₃ N	(M+Na) ⁺
			217 A, 217B,	1,4-Q, 5,8-I	C ₁₅ H ₂₃ N	(M+Na) ⁺
6	6,19	240,53	201 A, 201 B	Sin clasificar, Triciclido	C ₁₄ H ₁₉ N	(M+K) ⁺
			239 M	hPTX	C ₁₄ H ₂₅ NO ₂	(M+H) ⁺
			241 H	aPTX	C ₁₃ H ₂₃ NO ₃	(M-H) ⁻
7	7,08	243,26	-	-	-	-
			183A, 183B	Sin clasificar, Piridinico	C ₁₂ H ₂₃ N	(M+K) ⁺
8	7,63	222,26	221 F	DehidroPTX	C ₁₄ H ₂₃ NO	(M+H) ⁺
			223 F, 223G, 223S,	DHQ, hPTX, DHQ	C ₁₅ H ₂₉ N, C ₁₄ H ₂₅ NO	(M-H) ⁻
9	8,6	177,18	-	-	-	-
10	9,77	513,26	-	-	-	-
11	11,1	542,52	-	-	-	-
12	11,69	522,55	-	-	-	-

Abreviaciones. DHQ: decahidroquinolina, 5,8-I: indolizidina disustituida, OHQ: octahidroquinolina, PTX/hPTX/aPTX: pumiliotoxina/hidropumiliotoxina/allopumiliotoxina, 1,4-Q: quinolizidina disustituida

En la tabla 2 se muestran las coincidencias encontradas para los picos detectados por LC-ESI/MS, aunque este tipo de ionización es blanda, por lo cual el ion molecular suele corresponder al peso de la molécula, también se da la formación de especies pseudomoleculares con iones aductos como sodio y potasio, así como la generación de especies protonadas y desprotonadas (Bhardwaj & Hanley, 2014). Por esto se sustrajo el peso de Na⁺, K⁺, H⁺ y se adicionó el peso de este último para buscar una coincidencia, en la última columna se indica la especie molecular que pudo haber sido generada para cada coincidencia.

Es el caso del pico 6, el cual presentaba un ion molecular de m/z de 240,53, pudiendo ser el alcaloide 239M o 241H detectados a través de una especie molecular protonada y desprotonada respectivamente. Estos pertenecen a la clase de las pumiliotoxinas, específicamente a las hidropumiliotoxinas o allopumiliotoxinas.

Como se discutió anteriormente la aPTX 241H presenta algunos de los picos detectados en el espectro del pico 8 del análisis por GC-MS, también se detectaron algunos picos considerados diagnósticos para las allopumiliotoxinas, además se detectaron algunos de los picos para las fragmentaciones reportadas por Daly *et al.* (1999), en m/z 182, 114, 96, 84 y 70.

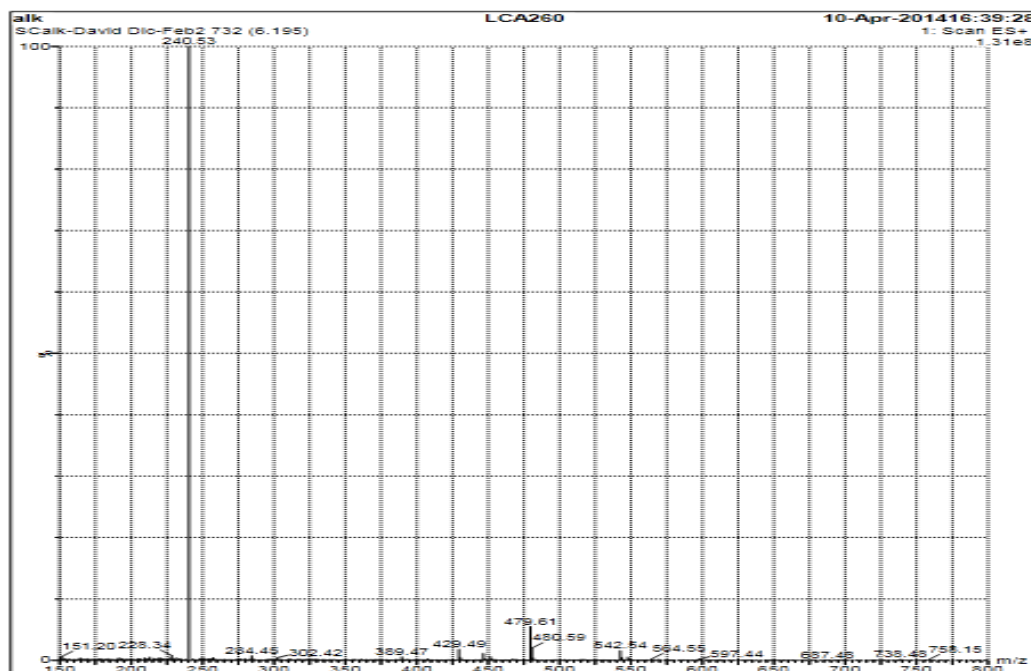


Figura 16. Espectro de ESI/MS para pico 6

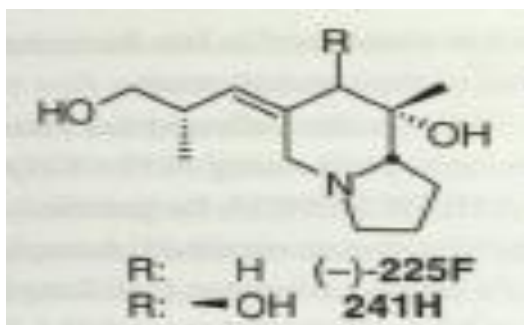


Figura 17. Estructura de aPTX 241H (Daly *et al.*, 1999).

Apoyado en los resultados de las pruebas cualitativas con los reactivos para identificación de alcaloides que resultaron positivas, lo cual indica la presencia de alcaloides, y teniendo en cuenta las fragmentaciones del espectro del pico 8 del análisis por GC-MS se podría tratar de alcaloides de la clase de las aPTX y posiblemente corresponda a la aPTX 241H. Entonces se puede decir que hay una alta probabilidad de que en las muestras analizadas de *E. johnstonei* esté presente este alcaloide.

Sin embargo no se encontraron más coincidencias entre la fragmentación de los alcaloides sugeridos por el análisis por GC-MS y la fragmentación de los sugeridos

por LC-ESI/MS. Esto puede ser debido a la variabilidad de la composición de las toxinas de alcaloides reportada en otros trabajos (Saporito, *et al.*, 2007).

Se debe tener en cuenta que los anfibios obtienen sus defensas químicas a partir de su alimentación, que incluye artrópodos, y estos a su vez pueden obtenerlos de algunas plantas hospederas. Por esto se ha encontrado que la composición de alcaloides puede variar con la localización geográfica y a través del tiempo, es decir que poblaciones que han sido muestreadas en diferentes períodos de tiempo exhiben cambios en la cantidad y clase de alcaloides presentes en su piel. También se ha relacionado la composición de los alcaloides con la distancia geográfica entre las poblaciones muestreadas (Grant, *et al.*, 2006) aunque la presencia de PTX o aPTX se vio en 67 de 84 (79,8%) poblaciones de ranas flecha roja y azul (*Oophaga pumilio*) muestreadas en diferente localización geográfica (Costa Rica y Panama) o período de tiempo (Saporito, *et al.*, 2007).

8. Impacto ambiental

Dado que *Eleutherodactylus johnstonei* es un especie de anuro introducida al territorio Colombiano, y teniendo en cuenta que se ha demostrado su gran capacidad colonizadora frente a otras especies en ambientes naturales intervenidos, no se esperaría un descenso significativo de la población de esta especie de anfibio. Incluso se deberían pensar estrategias para controlar la distribución tan amplia que tiene en *E. johnstonei* en áreas urbanas y construcciones humanas en áreas silvestres remotas, considerando los posibles daños que pueden tener las especies invasoras en la fauna autóctona de la región.

La universidad Icesi cuenta con disposición adecuada de los residuos de solventes clorados y ácidos y bases que se usaron en el proyecto según la metodología planteada. Los solventes orgánicos a utilizar son considerados tóxicos, por lo cual se debe trabajar con los elementos de protección básica, como tapabocas o careta, guantes de nitrilo, gafas de seguridad y bata de laboratorio.

9. Disposiciones vigentes

Teniendo en cuenta las disposiciones y normas en la decisión 391 de la Comunidad Andina de Naciones, se tiene en cuenta aquellas investigaciones en nuestro país cuyo estudio requiere de recursos biológicos y genéticos. Este proyecto está amparado bajo el proyecto titulado “Validación del biomodelo experimental *Eleutherodactylus johnstonei* para investigaciones fisiológicas y farmacológicas en tejidos excitables”, cuyos permisos están en trámite, este proyecto usará pieles residuales de individuos de *E. johnstonei* de otros proyectos en curso.

Los permisos de uso de fauna silvestre para la colecta de los individuos de *E. johnstonei* están siendo tramitados ante la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC).

También se cuenta con la aprobación de los miembros del Comité institucional de Ética para el cuidado y uso de animales en experimentación de la universidad Icesi (CIECUAE), el permiso se encuentra en conformidad con la Ley 84 de 1989 y la resolución de Rectoría N° 847. (Ver anexo)

10. Conclusiones

Se encontró que en la piel *Eleutherodactylus johnstonei* había presencia de alcaloides, uno de ellos posiblemente de la clase de las pumiliotoxinas o allo-pumiliotoxinas y otro de las quinolizidinas disustituidas, dado que los espectros de masas obtenidos tienen una similitud con los reportados en la literatura.

Teniendo en cuenta el peso molecular de los compuestos presentes en la muestra analizada por LC-ESI/MS puede estar presente el alcaloide aPTX 241H. Sin embargo no se encontró otro alcaloide que coincidiera en su peso molecular y su patrón de fragmentación, lo cual podría indicar dos posibilidades: (1) el patrón de fragmentación hallados por GC-MS no correspondía a un alcaloide o (2) hubo variaciones en la composición de alcaloides de las poblaciones muestreadas.

Teniendo en cuenta el carácter invasor y colonizador de esta especie de rana, dada su sobrepoblación y la capacidad que tiene para desplazar ranas autóctonas de las regiones que coloniza, se considera viable el uso de esta especie de rana como fuente de PTX, pensando claro en las consideraciones bioéticas que conlleva el sacrificio de centenares o miles de individuos, por lo menos mientras se logra llegar al organismo productor de estos alcaloides o se los pueda sintetizar de manera más eficaz.

A medida que se han realizado análisis a más especies de ranas se ha visto que en la mayoría de las especies hay alcaloides, aunque a veces solo en trazas. Lo cual podría indicar que todos los anfibios son capaces de secuestrar alcaloides y acumularlos en su piel, y que los más tóxicos simplemente se han especializado en acumularlos en mayores cantidades por mecanismos o costumbres que aún no se han estudiado.

11.Recomendaciones

Se recomienda usar un método de análisis primario para identificar con seguridad los alcaloides presentes en la piel de *E. johnstonei*, así como para hacer un análisis cuantitativo de la concentración de estos compuestos, teniendo en cuenta que se necesitaría hacer uso de un número mayor de individuos.

Sabiendo que los anuros no son capaces de producir alcaloides sino que los obtienen de la dieta es importante hacer un análisis de los hábitos alimenticios de esta especie de rana, esperando de esta manera llegar al organismo productor de estos alcaloides, de esta manera seguir con futuras investigaciones que pretendan ahondar en la ruta biosintética por la cual se producen.

Por la razón anterior también es importante que en estudios acerca de alcaloides de anfibios se hagan los análisis a una muestra conjunta de una sola población y conservar las muestras en condiciones de conservación adecuadas; almacenarlas sin solvente a una temperatura por debajo de -4°C y protegerlas de la luz y el oxígeno en un recipiente de vidrio ámbar.

Se podría estudiar la distribución espacio-temporal de los alcaloides en *E. johnstonei* en la ciudad de Cali, aprovechando la ventaja de que se suelen encontrar individuos de esta especie en viveros y jardines, en donde las especies vegetales ya están clasificadas, cabe resaltar que no se han realizado estudios de este tipo para ninguna población de esta especie de ranas en Colombia.

12. Referencias bibliográficas

- Anderson, G. L., & Page, S. T. (2004). Demonstration of Enantiomer Specificity of Proteins and Drugs. *JCE DigiDemos: Tested Demonstrations* .
- Arango, G. (2010). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Medellin: Universidad de Antioquia.
- Bhardwaj, C., & Hanley, L. (2014). Ion sources for mass spectrometric identification and imaging of molecular species. *The Royal Society of Chemistry* .
- Borer, J. S. (1999). Future Directions of Cardiovascular Drug Development. En J. S. Borer, & J. C. Somberg, *Cardiovascular drug development: Protocol design and methodology* (págs. 213-221). New York: Marcel Dekker.
- Castillo, C., & Montes, V. (2012). Establecimiento de un sistema (sustentable) para la medición de la función excitable en músculo de la rana *eleutherodactylus johnstonei*. *Tesis Universidad Autonoma de Occidente* .
- Castro, J. N.-C. (2011). Distribución del nicho ecológico actual y futuro de anfibios y reptiles exóticos: invasiones potenciales en las corporaciones autónomas regionales y de desarrollo sustentable en Colombia. *La Restauración Ecológica en la práctica: Memorias del I Congreso Colombiano de Restauración Ecológica* .
- Clarke, B. T. (1996). The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biology Review* .
- Cordell, G. A., Quinn-Beattie, M. L., & Farnsworth, N. R. (2001). The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. *Phytotherapy research* .
- Daly, J. W. (1987). Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (*Dendrobatidae*), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. *Toxicon* .
- Daly, J. W. (1995). The chemistry of poisons in amphibian skin. *PNAS* .
- Daly, J. W., Garraffo, M., & Spande, T. F. (1999). Alkaloids from amphibian skin. En W. Pelletier, *Alkaloids: Chemical & Biological perspectives* (págs. 1-161). Bethesda: Pergamon.
- Daly, J. W., Garraffo, H. M., Spande, T. F., Clark, V. C., Ma, J., Ziffer, H., y otros. (2003). Evidence for an enantioselective pumiliotoxin 7-hydroxylase in dendrobatid poison frogs of the genus *Dendrobates*. *PNAS* .

Daly, J. W., Gusovsky, F., McNeal, E. T., Secunda, S., Bell, M., Creveling, C. R., y otros. (1990). Pumiliotoxin alkaloids: a new class of sodium channel agents. *Biochemical Pharmacology*, .

Daly, J. W., Kaneko, T., Wilham, J., Garraffo, H. M., Spande, T. F., Espinosa, A., y otros. (2002). Bioactive alkaloids of frog skin: Combinatorial bioprospecting reveals that pumiliotoxins have an arthropod source. *PNAS*.

Daly, J. W., Spande, T. F., & Garraffo, H. M. (2005). Alkaloids from Amphibian Skin: A Tabulation of Over Eight-Hundred Compounds. *Journal of Natural Products*.

Daly, J. W., Tokuyama, T., Fujiwara, T., Highet, R. J., & Karle, I. L. (1980). A New Class of Indolizidine Alkaloids from the Poison Frog, *Dendrobates tricolor*. X-ray Analysis of 8-Hydroxy-8-methyl-6-(2'-methylhexylidene)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane. *Journal of the American Chemical Society* .

de Freitas, M., Vieira, C. G., dos Santos, E. N., & Gusevskaya, E. V. (2013). Synthesis of Fragrance Compounds from Biorenewables: Tandem Hydroformylation–Acetalization of Bicyclic Monoterpenes. *ChemChatChem* .

Flavier, A. B., Clough, S. J., Schell, M. A., & Denny, T. P. (1997). Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum* . *Molecular microbiology* .

George, C., & Prest, H. (2001). A New Approach to the Analysis of Phthalate Esters by GC/MS. *Agilent Technologies* .

Grant, F. T., Caldwell, J. P., Gagliardo, & Haddad. (2006). Phylogenetic systematics of dartpoison. *Bulletin of the American Museum of Natural History*.

Gusovsky, F., Padgett, W. L., Creveling, C. R., & John, D. W. (1992). Interaction of Pumiliotoxin B with an “Alkaloid-Binding Domain” on the Voltage-Dependent Sodium Channel. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* .

Halket, J. M., Waterman, D., Przyborowska, A. M., Patel, R. K., Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany* .

Housholder, D. E., & Camp, B. J. (1965). Formation of Alkaloid Artifacts in Plant Extracts by the Use of Ammonium Hydroxide and Acetone. *Journal of Pharmaceutical Sciences* .

- Kaiser, H. (1997). Origins and introductions of the Caribbean frog, *Eleutherodactylus johnstonei* (Leptodactylidae): management and conservation concerns. *Biodiversity and Conservation* .
- Kakizaki, M., & Sugie, H. (2001). Identification of female sex pheromone of the rice leaf bug, *Trigonotylus caelestialium*. *Journal of Chemical Ecology* .
- McLafferty, F. W., & Turecek, F. (1993). *Interpretation of mass spectra*. Sausalito, CA: University Science Books.
- Oppolzer, W., & Flaskamp, E. (1977). An Enantioselective Synthesis and the Absolute Configuration of Natural Pumiliotoxin-C1. *Helvetica Chimica Acta* .
- Overman, L. E., Bell, K. L., & Ito, F. (1984). Enantioselective Total Syntheses of Pumiliotoxin B and Pumiliotoxin 251D. A General Entry to the Pumiliotoxin A Alkaloids via Stereospecific Iminium Ion-Vinylsilane Cyclizations. *Journal of American Chemical Society* .
- Ramawat, K. G., & Mérillon, J.-M. (2013). *Natural products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Berlin: Springer.
- Rodriguez, A., Poth, D., Schulz, S., & Vences, M. (2010). Discovery of skin alkaloids in a miniaturized eleutherodactylid frog from Cuba. *Biology Letters* .
- Saporito, R. A., Donnelly, M. A., Jain, P., Garraffo, M., Spande, T. F., & Daly, J. W. (2007). Spatial and temporal patterns of alkaloid variation in the poison frog *Oophaga pumilio* in Costa Rica and Panama over 30 years. *Toxicon* .
- Saporito, R. A., Donnelly, M. A., Norton, R. A., Garraffo, H. M., Spande, T. F., & Daly, J. W. (2007). Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. *PNAS* .
- Saporito, R. A., Garraffo, H. M., Donnelly, M. A., Edwards, A. L., Longino, J. T., & Daly, J. W. (2004). Formicine ants: An arthropod source for the pumiliotoxin alkaloids of dendrobatid poison frogs. *PNAS* .
- Savitzky, A. H., Mori, A., Hutchinson, D. A., Saporito, R. A., Burghardt, G. M., Lillywhite, H. B., y otros. (2012). Sequestered defensive toxins in tetrapod vertebrates: principles, patterns, and prospects for future studies. *Chemoecology* .
- Schöpf, V. C. (1961). Die Konstitution der Salamander-Alkaloide. *Experientia* .
- Sklenicka, H. M., Hsung, R. P., McLaughlin, M. J., Wei, L.-I., Gerasyuto, A. I., & Brennessel, W. B. (2002). Stereoselective Formal [3 + 3] Cycloaddition Approach to cis-1-Azadecalins and Synthesis of (-)-4a,8a-diepi-Pumiliotoxin C. Evidence for

the First Highly Stereoselective 6 δ -Electron Electrocyclic Ring Closures of 1-Azatrienes. *Journal of American Chemical Society* .

Souverain, S., Rudaz, S., & Veuthey, J.-L. (2004). Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *Journal of Chromatography* .

Stewart, M. a. (1980). Coconut husk-piles: a unique habitat for Jamaican terrestrial frogs. *Biotropica* .

Tokuyama, T., Daly, J. W., & Wiktop, B. (1960). The structure of batrachotoxin, a steroidal alkaloid from the Colombian arrow poison frog, *Phyllobates aurotaenia*, and partial synthesis of batrachotoxin and its analogs and homologs. *Journal of the American Chemical Society* .

Toledo, R. C., & Jared, C. (1995). Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology* .

Travell, J. (1934). The potassium mercuric iodide reagents for alkaloids. *Journal of the American Pharmaceutical Association* .

Ureña Chio, A. (2008). *Manual de prácticas de laboratorio del curso de ciencias fisiológicas*. Merida, Yucatan: universidad autonoma de yucatan. Facultad de medicina.

Vandendriessche, T., Abdel-Mottaleb, Y., Maertens, C., Cuypers, E., Sudau, A., Nubbemeyer, U., y otros. (2007). Modulation of voltage-gated Na⁺ and K⁺ channels by pumiliotoxin 251D: A “joint venture” alkaloid from arthropods and amphibians. *Toxicon* .

Vinatoru, M. (2001). An overview of ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* .

Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. Munich: Springer.

Wake, D. B. (1991). Declining amphibian populations. *Science* .

Weldon, P. J., Kramer, M., Gordon, S., Spande, T. F., & Daly, J. W. (2006). A common pumiliotoxin from poison frogs exhibits enantioselective toxicity against mosquitoes. *PNAS* .

Wink, M. (2000). Interference of alkaloids with neuroreceptors an ion channels . *Studies in Natural Products Chemistry* .

Yoder, L. R., & Mahlberg, P. G. (2014). Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany* .

ANEXOS