



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de los principales compuestos presentes en secreciones obtenidas de las glándulas parótidas de *Rhinella marina*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. MARÍA FERNANDA DZIB HAU

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Alejandro Alagón Cano

[Instituto de Biotecnología](#)

Miembros del comité tutorial:

Dr. Gerardo Corzo Burguete

[Instituto de Biotecnología](#)

Dr. Baltazar Becerril Luján

[Instituto de Biotecnología](#)

México, D.F. Febrero, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Alejandro Alagón Cano. Se agradece el apoyo financiero para la realización del presente trabajo a DGAPA a través del proyecto IN-205214; a CONACyT a través de los proyectos INFR-2014 No. 224494 y CB-2013-01 No. 221343 así como por la beca # 357352 otorgada para estudios de posgrado. Se agradece al PAEP por el apoyo otorgado para la asistencia a un congreso.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia porque siempre me ha apoyado en todas las decisiones que he tomado aunque no sean de su agrado.

Agradezco al Dr. Alejandro Alagón Cano por aceptarme en su grupo de trabajo y abrirme las puertas de su familia, por los buenos y malos momentos que pasamos pero sobretodo por enseñarme de todo lo que puedo ser capaz.

Al Bioterio del Instituto de Biotecnología-UNAM por el apoyo con los animales experimentales.

A los Doctores que formaron parte de mi comité tutorial: Dr. Baltazar Becerril Luján y Dr. Gerardo Corzo Burguete. Agradezco sus opiniones, correcciones y el tiempo dedicado para guiar este proyecto.

A los miembros de mi comité sinodal: Dra. Silvia Marquina Bahena, Dr. José Luis Viveros Ceballos, Dr. Daniel Segura González, Dra. Georgina Gurrola Briones y Dr. César Ferreira Batista; quienes realizaron importantes comentarios para mejorar este trabajo.

Agradezco el apoyo administrativo por parte de Angélica Linares en el laboratorio, así como a Antonio Bolaños Guillén y Gloria Villa Herrera de la Unidad de Docencia.

A los técnicos del laboratorio: M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez, Biol. Felipe Olvera Rodríguez, Biol. Héctor Cardoso Torres y M. en C. Herlinda Clement Carretero, gracias por sus consejos y apoyo.

A todos los integrantes del laboratorio Alagón/ Corzo: Raúl, Memo, Yeli, Selma, Vianey, Ray, Nancy,

En especial quiero agradecer a Ulisom y Arely por ser mis “padres” de la maestría; Miguelom porque siempre me hiciste sonreír cuando más lo necesitaba (eres un foood); a mi compañero de mesa Checorro por su paciencia y calma en mis momentos de desesperación; al Masitro Rodrigo porque a pesar de que no nos conocimos mucho tiempo, las pisteaciones han sido muy buenas y han dejado muy buenos consejos; a la Dra Pi por las tremendas aventuras que hemos tenido y aún seguimos vivas (todavía nosé porqué seguimos juntas); a Nico por aceptarme tal y como soy; a Belem porque casualmente siempre estuvo conmigo en las buenas y en las malas; a Felipe por sus repentinas ocurrencias; a las hermanas Calderón (Cris y Arlene) por su apoyo y consejos; a Irving por su ayuda para inyectar ratones; a Ana porque siempre me recibió con mucha alegría; a Meli y Edgar por sus consejos y comentarios y por último a Daya e Irene por su amistad y su apoyo .

A Melisa y Nacho gracias por estar conmigo en todo momento y darme siempre buenos ratos de desestrés, todos los viajes, aventuras, consejos y la ayuda que me dieron en este tiempo, sin ustedes no sé qué habría hecho. De la misma manera a Manuel y a Karen por su valiosa amistad.

A Adrián por dejarme en mi destino, sea cual sea, siempre.

También quiero agradecer a las personas del CIQ que me apoyaron. En especial agradezco a la Dra. Silvia Marquina por el indudable apoyo que me brindó, así como también a Junior por sus consejos, enseñanzas y su amistad cuando menos lo esperé.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Familia Bufonidae.....	1
1.2. <i>Rhinella marina</i> (<i>Bufo marinus</i> , sapo marino, sapo de la caña).....	1
1.3. Distribución de la especie <i>Rhinella marina</i>	2
1.4. Composición química de las secreciones provenientes de las glándulas parótidas..	3
1.5. Intoxicación causada por el contacto con las secreciones de <i>Rhinella spp</i>	6
1.6. Tratamiento en caso de intoxicación con las secreciones de <i>Bufo spp</i>	7
2. Antecedentes	9
3. Justificación.....	12
4. Hipótesis	13
5. Objetivo general	13
6. Objetivos particulares.....	13
7. Metodología	14
7.1. Obtención y extracción de las secreciones provenientes de las glándulas parótidas.....	15
7.2. Análisis cualitativo de los extractos metanólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).....	15
7.3. Espectrometría de masas	16
7.4. Cromatografía en capa fina (CCF) fase normal.....	16
7.5. Purificación de los compuestos principales por cromatografía en placa preparativa..	17
7.6. Análisis cualitativo por RP-HPLC de las fracciones mayoritarias obtenidas por CPP.....	18
7.7. RMN de los principales componentes de interés.....	18
7.8. Toxicidad de las principales fracciones.	19
8. Resultados	20
8.1. Extracción de los componentes principales presentes en las secreciones.	20
8.2. Análisis cualitativo de las extractos metanólicos mediante RP-HPLC.....	20
8.3. Espectrometría de masas.	21
8.4. Purificación de los compuestos principales presentes en las secreciones.....	24
8.5. RMN.....	30
8.6 Pruebas de toxicidad en ratones.	49

9. <i>Discusión</i>	51
9.1. <i>Análisis cualitativo</i>	51
9.2. <i>Aislamiento de los principales compuestos presentes en la secreción</i>	52
9.3. <i>RMN</i>	53
9.4. <i>Letalidad de los bufadienólidos</i>	53
10. <i>Conclusiones</i>	56
11. <i>Perspectivas</i>	57
12. <i>Referencias bibliográficas</i>	61

Índice de Figuras

Figura 1. Ejemplar de <i>Rhinella marina</i> .	2
Figura 2. Distribución de la especie <i>Rhinella marina</i> en México.	3
Figura 3. Estructura química de un bufadienólido, bufalina (bufagina).	4
Figura 4. Estructura química de una bufotoxina, la marinobufotoxina.	5
Figura 5. Alcaloides presentes en las secreciones de diferentes especies de sapos americanos.	6
Figura 6. Estructura del derivado de la digoxina (DDMA, digoxina-dicarboximetoxilamina)	8
Figura 7. Bufadienólidos identificados en las secreciones de las glándulas parótidas de la especie <i>Rhinella marina</i> .	10
Figura 8. Sitios de colecta de los ejemplares de <i>Rhinella marina</i> .	14
Figura 9. Perfiles cromatográficos de las 3 extracciones realizadas.	21
Figura 10. Espectrometría de masas de la fracción 1.	22
Figura 11. Prueba de alcaloides con <i>p</i> -dimetilaminobenzaldehído.	23
Figura 12. Espectrometría de masas de la fracción 2.	23
Figura 13. Estructura química de la marinobufotoxina (2).	24
Figura 14. Espectrometría de masas de la fracción 3.	24
Figura 15. CCF fase normal del extracto metanólico correspondiente al ensayo 3 (Tabla 3)	25
Figura 16. Cromatograma de la fracción F4 obtenida por CPP.	26
Figura 17. Cromatograma de la fracción F7 obtenida por CPP.	27
Figura 18. CCF fase normal de la fracción F7 obtenida por CPP.	28
Figura 19. Cromatograma de la fracción F7-3 obtenida por CPP.	29
Figura 20. Cromatograma de la fracción F7-4 obtenida por CPP.	30
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz) con señales correspondientes a una δ -lactona.	31
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz) con señales características de protones base de oxígeno.	32
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz) con señales asignadas a grupos metino (CH), metileno (CH_2) y metilo (CH_3).	33
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz) del compuesto 3 .	34
Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 200 MHz) del compuesto 3 .	36
Figura 26. Espectro HETCOR correspondiente a la MBT.	38
Figura 27. Espectro DEPT correspondiente al compuesto 2 .	40
Figura 28. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) con señales características de la aglicona del bufadienólido.	42
Figura 29. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) con señales de hidrógenos alfa a un carbonilo e hidrógenos alfa a un heteroátomo.	43

Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) con señales características de la genina correspondiente a un bufadienólido.....	45
Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) con señales características de grupos carbonilo de amida, éster y ácido carboxílico	46
Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) con señales características para la suberoil-arginina.	48

Índice de tablas

Tabla 1. Cromatogramas obtenidos por RP-HPLC de las secreciones provenientes de las glándulas parótidas de <i>Rhinella marina</i>	11
Tabla 2. Sitios de colecta de los sapos usados en este trabajo.....	14
Tabla 3. Rendimientos obtenidos en las extracciones.	19
Tabla 4. Fracciones obtenidas por cromatografía en placa preparativa con el sistema de disolventes n-hexano/DCM/MeOH (4:5:1)	25
Tabla 5. Fracciones obtenidas por cromatografía en placa preparativa con el sistema de disolventes MeCN/MeOH (3:7)	28
Tabla 6. Dosis de la marinofugania administrada en ratones.....	49
Tabla 7. Dosis de la marinobufotoxina administrada en ratones.	50
Tabla 8. Valores de las DL ₅₀ de los compuestos tóxicos evaluados.	50
Tabla 9. Valores de los desplazamientos químicos de ¹ H y ¹³ C para el compuesto 3	58
Tabla 10. Valores de los desplazamientos químicos de ¹ H y ¹³ C para el compuesto 2	59

Lista de abreviaturas

Aprox	Aproximadamente
<i>brq</i>	Quintuplete ancho
<i>brt</i>	Triplete ancho
¹³ C	Carbono 13
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CPP	Cromatografía en placa preparativa
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble de doble
DCM	Diclorometano
DHB	Dehidrobufotenina
DL ₅₀	Dosis letal media
EE UU	Estados Unidos
ESI	Sistema de ionización por electrospray
Fab	Fragment antigen-binding
g	Gramos
¹ H	Protón
H ₂ O	Agua

I.V.	Intravenoso
<i>m</i>	Multiplete
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
μg	Microgramo
μl	Microlitro
min	Minuto
ml	Mililitro
MBG	Marinobufagina; 14,15-epoxi-3,5-dihidroxibufa-20,22-dienolido
MBT	Marinobufotoxina; 3-(N-suberoil argininil) marinobufagina.
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	Sodio-potasio ATPasa
RMN	Resonancia magnética nuclear
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
r.p.m	Revoluciones por minuto
<i>s</i>	Singulete
<i>t</i>	Triplete
TFA	Ácido trifluoroacético
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

Resumen

Rhinella marina es una especie de sapo nativo de América con una amplia distribución desde el sur de Texas hasta el centro de Brasil. En México se encuentra desde el sur de Sonora y Sinaloa por la vertiente del Pacífico, continuando hacia el sur hasta la península de Yucatán. Se caracteriza por su gran tamaño y poseer detrás de sus ojos dos grandes glándulas parótidas capaces de producir secreciones tóxicas cuando se encuentra bajo amenaza. En las secreciones se encuentran principalmente alcaloides y bufadienólidos (bufaginas y bufotoxinas). Los alcaloides tienen efecto alucinógeno mientras que los bufadienólidos son esteroides de tipo cardioactivo, los cuales aumentan la fuerza de contracción del corazón mediante la inhibición de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa.

Las secreciones de esta especie tienen diferentes usos en diversas partes del mundo. En Asia las consumen en pastillas como tratamiento medicinal y en América, en el período precolombino, culturas como la maya y olmeca le dieron un uso recreacional en sus rituales; sin embargo, en las secreciones se encuentran presentes los bufadienólidos que por su efecto cardioactivo pueden causar intoxicación en dosis inadecuadas.

En países como Australia, China y Brasil se han realizado estudios sobre la caracterización de los compuestos presentes en las secreciones empleando diversas técnicas cromatográficas, espectrométricas y espectroscópicas.

En México no se han realizado estudios sobre la determinación de los componentes presentes en la secreción de sapos de la especie *Rhinella marina*, por lo cual, en el presente trabajo se presenta un estudio del aislamiento, caracterización estructural y toxicidad de los componentes principales utilizando técnicas cromatográficas (CCF, CPP y RP-HPLC), identificación por técnicas espectrométricas (ESI) y espectroscópicas de resonancia magnética nuclear de una dimensión (C^{13} , H^1 , DEPT) y de dos dimensiones (HETCOR). De los componentes más importantes se identificaron: dehidrobufotenina (alcaloide), marinobufagina (bufogenina) y marinobufotoxina (bufotoxina). Además se analizaron por RP-HPLC secreciones obtenidas de especímenes provenientes de los

estados de Morelos y Puebla observando perfiles cromatográficos similares y sólo mínimas diferencias en la proporción de los componentes minoritarios.

Se determinó la toxicidad (DL_{50}) en ratones por vía I.V. de los bufadienólidos: marinobufagina y marinobufotoxina. La marinobufagina con una DL_{50} de 51 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ es más tóxica que su respectiva bufotoxina, la marinobufotoxina con 299 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. La signología observada para ambos compuestos consistió en dificultad para respirar, desorientación, temblor, convulsiones y espasmos musculares.

1. Introducción

1.1 Familia Bufonidae

Los miembros de la familia Bufonidae se conocen ampliamente con el nombre común de sapos. Tienen una de las distribuciones más grandes de todas las familias de anfibios actuales con 35 géneros reconocidos y 485 especies registradas, de estas especies, 35 se encuentran en México (Oliver *et al*, 2009).

La forma corporal es robusta y las piernas son relativamente cortas; tienen una piel típicamente engrosada y frecuentemente rugosa; usualmente se presentan sobre la cabeza crestas óseas, que muchas veces están queratinizadas; la locomoción es por saltos cortos o caminando. Esta habilidad restringida para dar saltos largos está compensada por la presencia de venenos o secreciones cutáneas defensivas, secretados principalmente en las glándulas parótidas, que generalmente son un par de abultamientos o agregaciones prominentes e hipertrofiadas, situadas sobre la cabeza y detrás de los ojos (Oliver *et al*, 2009).

1.2. *Rhinella marina* (*Bufo marinus*, *sapo marino*, *sapo de la caña*)

El sapo marino, es una especie de anfibio anuro, de la familia Bufonidae. Es de gran tamaño, color café y se caracteriza por sus grandes glándulas parótidas densamente porosas que se extienden lateralmente hacia los hombros (Figura 1). Los adultos miden entre 100 y 152 mm, y la máxima longitud que se ha registrado es de 238 mm en un ejemplar de Sudamérica; llegan a pesar más de 1.3 kg. Es un oportunista y aparentemente come casi todo objeto animado que pueda capturar, desde pequeños artrópodos hasta vertebrados pequeños. Están tan bien adaptados a la vida urbana que incluso se les ha visto comiendo alimento enlatado para perros o gatos, y aún pedazos de carne sueltos; todo esto indica una gran flexibilidad en su dieta y demuestra una falta de discriminación de presas. Es el anfibio americano más común y más ampliamente distribuido. (Oliver *et al*, 2009).



Figura 1. Ejemplar de *Rhinella marina*. Se señala su característica glándula parótida. Fotografía de Edgar Neri.

1.3. Distribución de la especie *Rhinella marina*

La distribución natural de esta especie se extiende desde 27° latitud norte en el sur de Texas y el oeste de México, hasta 10° latitud sur en el centro de Brasil. En México se encuentra desde el sur de Sonora, el extremo sur de Texas, la porción centro-oriental de Coahuila y Nuevo León hasta Sudamérica, el Istmo de Tehuantepec y la Península yucateca. Ausente en los estados del Altiplano Central y del Valle de México. Además este anfibio fue introducido en Florida, Jamaica, Puerto Rico, las Antillas, Hawái, entre otros (Figura 2) (Oliver *et al*, 2009).

El caso mejor conocido de introducción de este sapo se presentó en Australia, en donde se pensó terminaría con dos especies de escarabajos que estaban acabando con las plantaciones de caña de azúcar, pero esto no resultó; sin embargo su adaptabilidad, capacidad de reproducción y la ausencia de depredadores lo convirtieron en un exitoso invasor, capaz de extenderse en gran parte del territorio. En EEUU también se presentó esta situación en Hawái (Reeves, 2004).

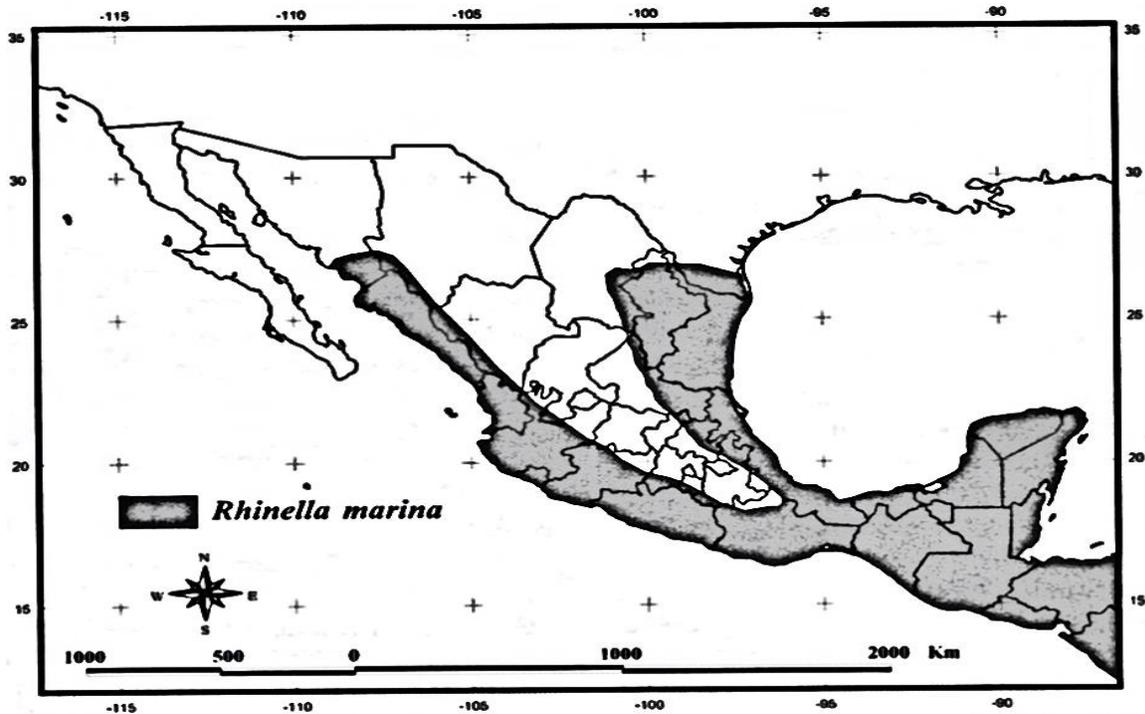


Figura 2. Distribución de la especie *Rhinella marina* en México (Oliver *et al*, 2009).

1.4. Composición química de las secreciones provenientes de las glándulas parótidas

La piel de los anfibios posee dos tipos principales de glándulas: mucosas y granulares. Las glándulas mucosas producen un moco que participa en diversas funciones como lubricación, humectación y control del pH de la piel. Las glándulas granulares son más grandes y abundantes que las mucosas, son responsables en la producción de secreciones tóxicas con efecto sobre numerosas especies de vertebrados. (Toledo y Jared, 1995).

La secreción liberada de las glándulas granulares que se encuentran en las glándulas parótidas de los sapos contiene principalmente bufadienólidos, bufotoxinas e indol-alcaloides. (Liu *et al*, 2007; Palumbo *et al*, 1975). En menores cantidades se encuentran componentes como: epinefrina, colesterol, ergosterol y 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Palumbo *et al*, 1975).

- *Bufadienólidos*

Los bufadienólidos o bufageninas son esteroides que cuentan con 24 átomos de carbono en donde se observa sobre C-17 β una lactona di-insaturada (C-20, C-22) de 5 átomos de carbono; los anillos A,B y C,D se encuentran unidos en posición *cis*, mientras que los anillos B y C se encuentran fusionados en posición *trans*; además puede tener un grupo hidroxilo 14 β o 14 β -15 β epóxido y en 3 β otro grupo hidroxilo (Figura 3) (Bhat *et al*, 2005; Nakanishi *et al*, 1975).

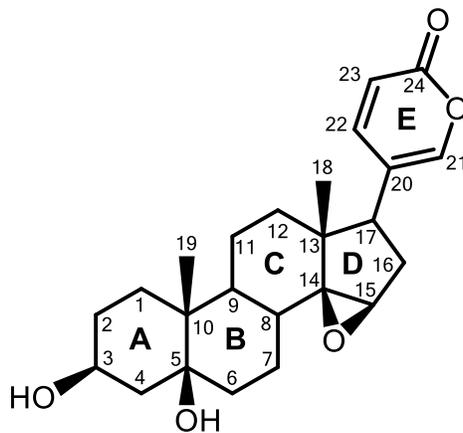


Figura 3. Estructura química de un bufadienólido, bufalina (bufagina).

Si sobre el C-3 hay una conjugación con un grupo sulfato o un éster de ácido dicarboxílico de un aminoácido ahora nos referimos a una bufotoxina. Los ácidos dicarboxílicos presentes en la bufotoxina pueden ser succínico, glutárico, adípico, pimélico o subérico; los aminoácidos que se encuentran son arginina, glutamina, histidina, 1-metilhistidina o 3-metilhistidina. Una característica de esta sustitución es que le brinda mayor polaridad a la respectiva genina (Figura 4) (Steyn y Van Heerden, 1998).

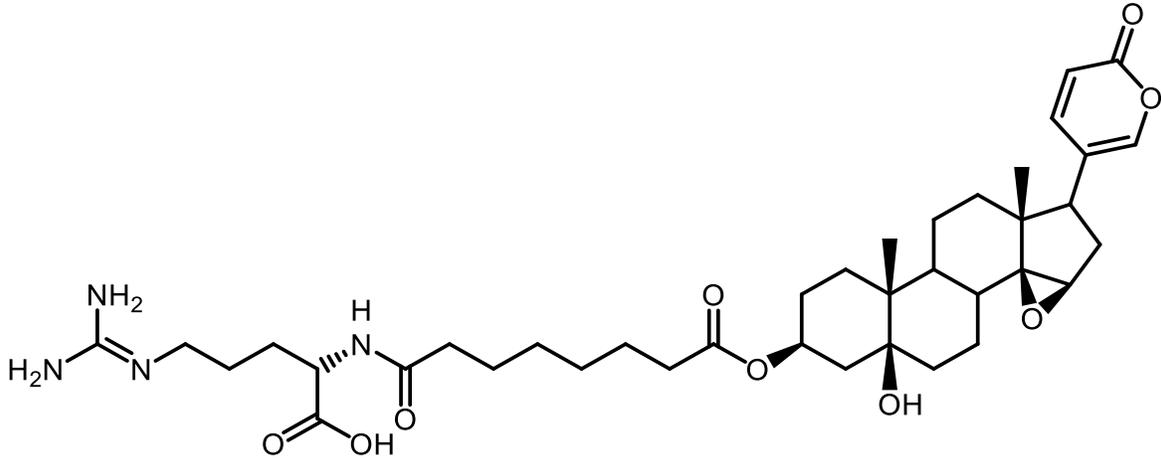


Figura 4. Estructura química de una bufotoxina, la marinobufotoxina.

Los bufadienólidos pertenecen a una clase de compuestos conocida como esteroides cardioactivos y dentro de esta clase también se encuentran los cardenólidos. La principal diferencia estructural entre bufadienólidos y cardenólidos es que los primeros tienen un anillo lactona de 6 miembros, mientras que los segundos contienen una lactona de 5 miembros y tienen unidos azúcares, un ejemplo de esta clase de compuestos es la digoxina (Brubacher *et al*, 1996). Los esteroides cardioactivos, inhiben la actividad de la enzima de membrana Na^+/K^+ -ATPasa presente en las células del miocardio; esta inhibición tiene un efecto inotrópico positivo (aumento en la fuerza de contracción del corazón) (Hyun *et al*, 2007).

- *Alcaloides*

Un alcaloide se define como una molécula orgánica que contiene al menos un heterociclo nitrogenado proveniente del metabolismo de algunos aminoácidos. Tienen propiedades alcalinas debido al par de electrones libres del átomo de nitrógeno (*N*) (Bergillos y Rivas, 2013). En las secreciones de los sapos, se encuentran principalmente alcaloides de tipo indol (Liu *et al*, 2007). En algunas especies de sapos americanos se han encontrado bufotenina, bufotenidina, dehidrobufotenina y bufotionina (Figura 5) (Deulofeu y Duprat, 1944).

Estas sustancias tienen gran afinidad y actividad sobre el sistema nervioso, ligándose específicamente a los receptores neuronales, provocando alteraciones en los sistemas acetilcolinérgicos y dopaminérgicos. En consecuencia se producen efectos alucinógenos, estimulantes y en algunos casos efectos sobre la contracción/relajación muscular (Bergillos y Rivas, 2013)

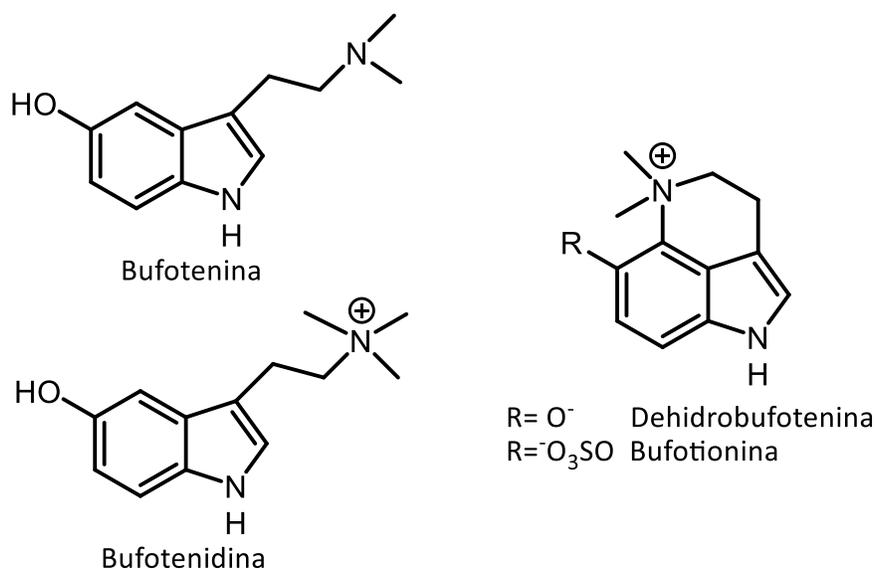


Figura 5. Alcaloides presentes en las secreciones de diferentes especies de sapos americanos.

1.5. Intoxicación causada por el contacto con las secreciones de *Rhinella spp*

Durante siglos, en diversas partes del mundo, se ha desarrollado un gran interés sobre las secreciones de los sapos. En China y Japón se usan las secreciones secas para diferentes propósitos médicos (expectorantes, estimulantes cardiacos, diuréticos, etc) (Palumbo *et al*, 1975). A pesar de los diferentes usos médicos que pueden tener las secreciones, existe un riesgo de intoxicación debido a la potente actividad cardiotónica y el estrecho margen terapéutico de los bufadienólidos (Gao *et al*, 2010)

Otro uso de las secreciones es como productos afrodisiacos; en EEUU se reportó el caso de 6 personas intoxicadas por el abuso en el consumo de píldoras afrodisiacas conocidas como “la piedra del amor”, presentándose el deceso de 4 individuos (66%) (Brubacher *et al*, 1996).

Las culturas mesoamericanas precolombinas emplearon sustancias alucinógenas con fines mágicos, terapéuticos y religiosos. La piel seca y fumada de *Bufo* spp, se usó para inducir estados de trance desde el periodo olmeca, así se han encontrado restos de estos sapos en complejos ceremoniales acompañando a los sacerdotes olmecas. Los cronistas del siglo XVI relataron que los mayas añadían la piel seca del sapo común (*Rhinella marina*) y tabaco para hacer más potentes sus bebidas alcohólicas. (Carod, 2011). Actualmente existen reportes en donde se informan las prácticas de lamer sapos para uso recreacional que acaban de manera fatal (Lyttle, 1993).

La intoxicación se genera por el contacto con heridas y mucosas (Bergillos y Rivas, 2013). Hay casos de intoxicación en mascotas, cuando éstas ingieren la secreción al morder o comer un sapo (Reeves, 2004). En EEUU se reportaron 94 casos de perros intoxicados en las ciudades de Florida, Colorado, Arizona, Texas y Hawái, siendo las especies causantes de las intoxicaciones *Rhinella marina* y *Bufo alvarius* con un 5% de decesos (Roberts *et al*, 2000). En Australia se reportaron 90 casos de intoxicación en mascotas causadas por *Rhinella marina*, donde la mayoría de las intoxicaciones se produjeron durante el verano, cuando empezó el periodo de lluvias y en invierno casi no se presentaron, siendo los decesos del 4% (Reeves, 2004).

1.6. Tratamiento en caso de intoxicación con las secreciones de *Bufo* spp

Los síntomas causados en las intoxicaciones por *Bufo* sugieren toxicidad por esteroides cardioactivos; los bufadienólidos son los compuestos involucrados (Brubacher *et al*, 1996). Cuando se presenta la intoxicación, las manifestaciones clínicas incluyen: debilidad generalizada, entumecimiento de la cavidad oral, ptialismo, membranas mucosas rojas, náuseas, vómitos, convulsiones, temblores y arritmias cardíacas. La mortalidad ocurre debido a fibrilación ventricular (Brubacher *et al*, 1996; Reeves, 2004)

El tratamiento contra intoxicaciones causadas por los componentes bufadienólidos, consiste en lavados orales si no se presentan los signos, pero si se ingiere el sapo se debe realizar una cirugía para remover al anfibio o dar múltiples dosis de carbón activado.

Cuando se presentan signos severos se deben administrar dosis de fluidos, fármacos como diazepam, atropina, barbitúricos, propanolol y dosis de fragmentos Fab anti-digoxina (Eubig 2001, Reeves 2004).

Los fragmentos Fab anti-digoxina provienen de anticuerpos que reaccionan contra un derivado de la digoxina, el DDMA (digoxina-dicarboximetoxilamina) (Figura 6), que contiene al grupo esteroideo, el anillo de lactona (5 miembros) y se acopla a una proteína acarreadora inmunogénica, KLH (Keyhole Limpet Hemocianin). Los anticuerpos son purificados por cromatografía de afinidad y digeridos con papaína para generar fragmentos Fab. El mecanismo de acción de los fragmentos Fab es mediante la unión a digoxina y en consecuencia su neutralización, reduciendo sus efectos cardiotóxicos (Thillaivinayagalingam *et al*, 2007)

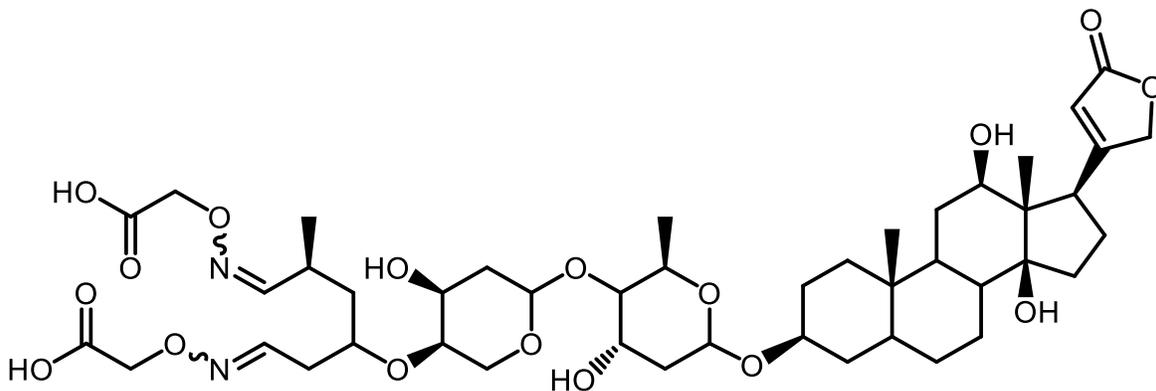


Figura 6. Estructura del derivado de la digoxina (DDMA, digoxina-dicarboximetoxilamina).

Por la similitud estructural entre bufadienólidos y cardenólidos, se neutraliza a los bufadienólidos, por medio de una reacción cruzada, siendo estos anticuerpos el tratamiento más efectivo en caso de una intoxicación severa (Brubacher *et al*, 1996). Sin embargo, en comunicación personal con la Dra. Leslie Boyer del Instituto VIPER de la Universidad de Arizona, informó que la neutralización es muy baja.

2. Antecedentes

Hasta ahora en México el único trabajo que se tiene con respecto a los compuestos químicos presentes en las secreciones de sapos pertenecientes a la familia Bufonidae es una tesis de Arvizu del año 1986. Ésta es una recopilación acerca de todo lo que se conocía hasta esa época sobre las secreciones, desde su composición química hasta el tratamiento en casos de intoxicación (Arvizu, 1986). Por otra parte, la única información que se tiene con respecto a casos de intoxicación por contacto con las secreciones de *Rhinella marina* es a través de comunicación personal en casos ocurridos en mascotas.

Para caracterizar a los principales compuestos presentes en las secreciones se usan diversas técnicas en conjunto. Las técnicas más usadas para la separación analítica de los bufadienólidos, son la cromatografía gas-líquido, cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución (Kamano *et al*, 1999). La elucidación estructural de los compuestos presentes en la secreción se realiza con el uso de la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas (Steyn y Van Heerden, 1998).

Mediante el uso en conjunto de diversas técnicas cromatográficas, espectrométricas y espectroscópicas se han identificado los principales componentes tóxicos de tipo esteroide presentes en las secreciones de las glándulas parótidas de la especie *Rhinella marina*, estos compuestos corresponden a la telocinobufagina, bufalina, resibufogenina y marinobufagina. De éstos, en mayor abundancia se encuentra la marinobufagina (Figura 7) (Gao *et al*, 2010; Ferreira *et al*, 2013).

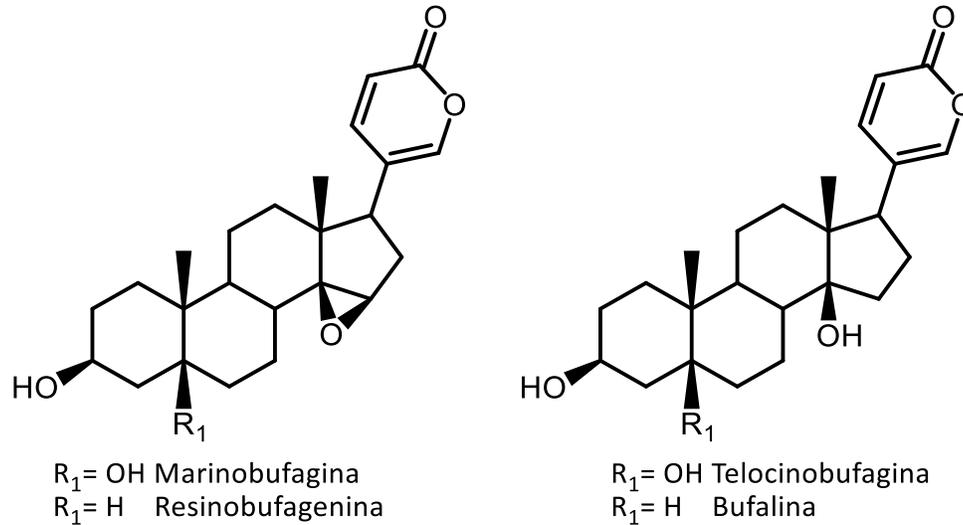


Figura 7. Bufadienólidos identificados en las secreciones de las glándulas parótidas de la especie *Rhinella marina*.

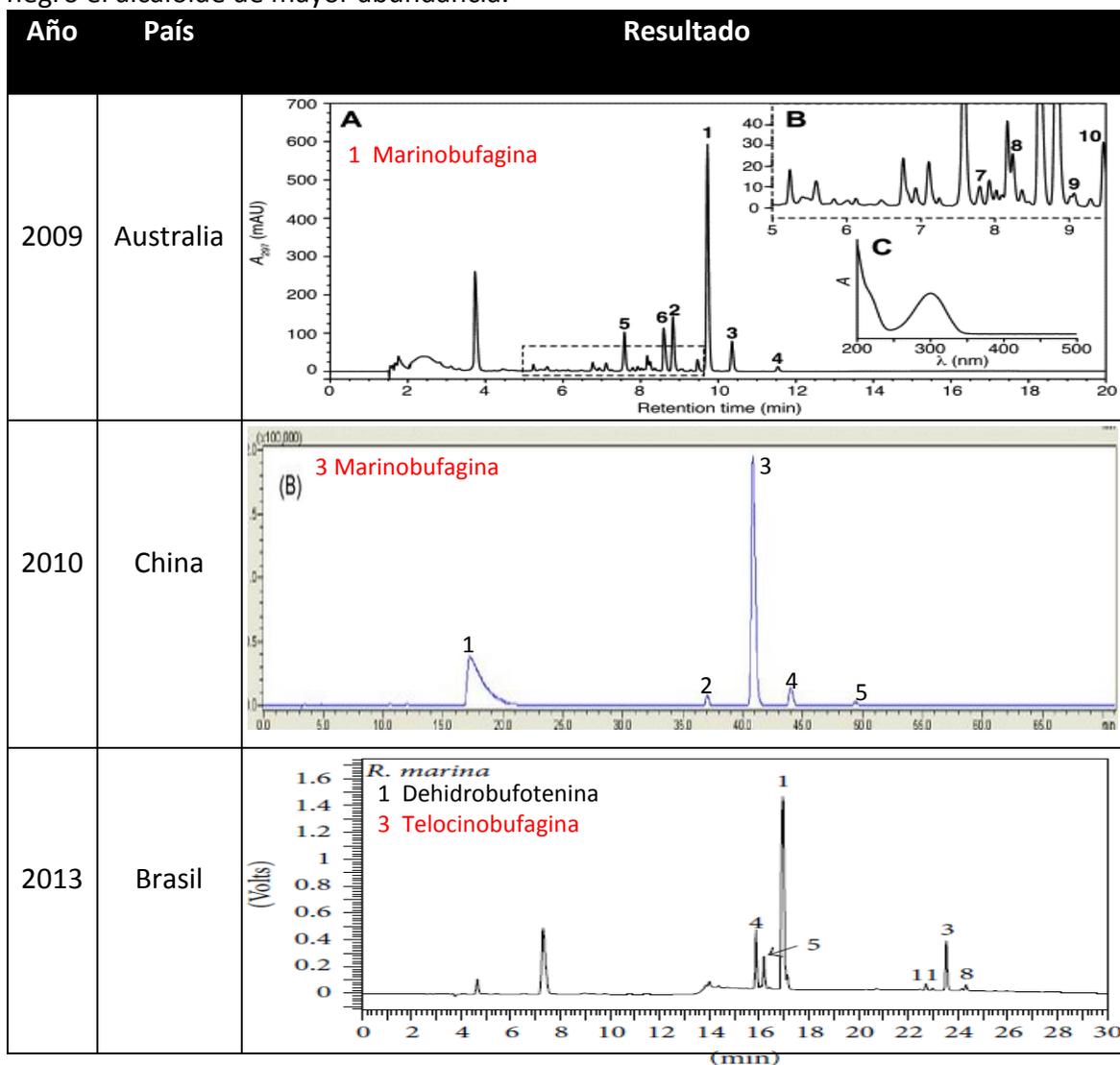
Además se han encontrado diferencias en las secreciones en individuos de diferentes regiones. Así, en un estudio realizado en 2009 en la especie *Rhinella marina* introducida en Australia se encontró en el extracto butanólico la presencia de diversos componentes esteroides. De éstos el componente mayoritario fue la marinobufagina (Hayes *et al*, 2009) (Tabla 1).

En 2010 se realizó un estudio comparativo entre diferentes especies de bufónidos y en los extractos metanólicos de secreciones pertenecientes a la especie *Rhinella marina* se encontraron 5 componentes, la suberoil-arginina y 4 bufadienólidos (telocinobufagina, marinobufagina, bufalina y resinobufagenina) (Gao *et al*, 2010) (Tabla 1). El bufadienólido que se encontró en mayor proporción corresponde a la marinobufagina.

En 2013 se realizó un estudio en diferentes especies de bufónidos sudamericanos. En los extractos acuosos de *Rhinella marina* se encontraron 3 compuestos de tipo alcaloide (dehidrobufotenina, serotonina y N'-metil-serotonina). De los compuestos esteroides se encontraron 3 sustancias (telocinobufagina, bufalina y marinobufagina). La dehidrobufotenina es el componente mayoritario entre los componentes alcaloides y la telocinobufagina es el más abundante entre los bufadienólidos (Sciani *et al*, 2013) (Tabla 1).

Estos trabajos también demuestran que diferentes disolventes utilizados en la extracción de los componentes de interés muestran un patrón diferente con respecto al análisis cualitativo.

Tabla 1. Cromatogramas obtenidos por RP-HPLC de las secreciones provenientes de las glándulas parótidas de *Rhinella marina*. En rojo señala el esteroide más abundante y en negro el alcaloide de mayor abundancia.



3. Justificación

Rhinella marina es una especie de bufónido con una amplia distribución en México. Su abundancia puede provocar intoxicaciones por contacto accidental con sus secreciones sobretodo en mascotas, representando un peligro para la salud, incluso provocar la muerte por falta de atención médica. No existen estudios en el país sobre la composición química de las secreciones, por lo cual el presente trabajo contribuirá a generar conocimiento respecto a la química de los componentes más abundantes presentes en *Rhinella marina* de origen mexicano para generar información útil en el área clínica en caso de un envenenamiento.

4. Hipótesis

En las secreciones obtenidas de las glándulas parótidas de *Rhinella marina* de México, se encontrarán principalmente compuestos de tipo esteroide (bufaginas y bufotoxinas) y alcaloide (con anillo indol).

5. Objetivo general

Caracterizar los compuestos de mayor abundancia presentes en las secreciones provenientes de las glándulas parótidas de *Rhinella marina*.

6. Objetivos particulares

- Obtener secreciones provenientes de las glándulas parótidas en *Rhinella marina*.
- Realizar la extracción de los principales componentes presentes en las secreciones.
- Analizar cualitativamente los extractos.
- Purificar los compuestos mayoritarios de los extractos.
- Caracterizar las estructuras de los compuestos mayoritarios presentes en los extractos.
- Determinar la toxicidad de los principales compuestos tóxicos.

7. Metodología

Las secreciones utilizadas en el presente trabajo corresponden a 7 ejemplares de la especie *Rhinella marina*. Los sitios de colecta se encuentran descritos en la Figura 8, Tabla 2.

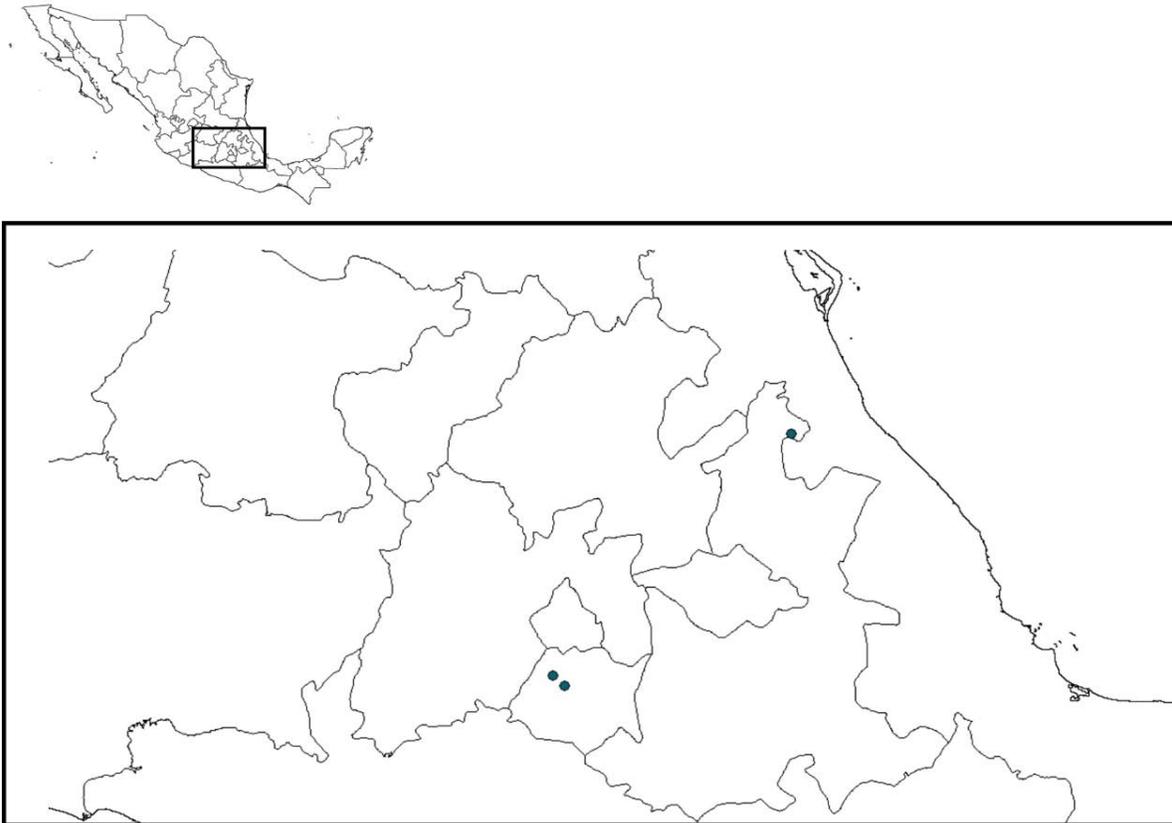


Figura 8. Sitios de colecta de los ejemplares de *Rhinella marina*.

Tabla 2. Sitios de colecta de los sapos usados en este trabajo.

Ejemplar	Localidad	Estado
1	Jiutepec	Morelos
2	Tlaltizapán	Morelos
3	Tlaltizapán	Morelos
4	Tlaltizapán	Morelos
5	Tlaltizapán	Morelos
6	Venustiano Carranza	Puebla
7	Venustiano Carranza	Puebla

7.1. Obtención y extracción de las secreciones provenientes de las glándulas parótidas.

La obtención de las secreciones se realizó mediante compresión manual de las glándulas parótidas, tratando de colocar las glándulas del sapo enfrente de una caja de Petri de vidrio. Las secreciones obtenidas se dejaron secando a la sombra y una vez secas se pulverizaron en un mortero para posteriormente realizar la extracción utilizando un equipo Soxhlet.

La extracción utilizando equipo Soxhlet, es un método de extracción continuo utilizado para muestras sólidas y consiste en colocar el material a extraer, previamente molido y pesado en papel filtro, que se introduce en la cámara de extracción conectada por una parte a un matraz balón de fondo plano y por otra a un refrigerante. El disolvente contenido en el balón se calienta a ebullición, el vapor asciende por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante, cayendo sobre el material, cuando alcanza el nivel suficiente sifona por el tubo, regresando al balón el disolvente cargado con los compuestos a investigar, repitiéndose varias veces el ciclo de extracción (Lamarque, 2008).

Para la extracción de los compuestos de interés, se colocó 1 g de la secreción pulverizada en papel filtro, éste se colocó en el extractor Soxhlet y se añadieron 125 ml de metanol absoluto (MeOH). El proceso de extracción se realizó durante 6 horas a una temperatura entre 80-85°C. El disolvente de la extracción se eliminó en un rotavapor. Posteriormente la muestra seca se resuspendió en 10 ml de MeOH, se tomaron alícuotas de 1 ml y se colocaron en 10 tubos Eppendorf de 1.5 ml. El disolvente de las alícuotas se eliminó en un concentrador de vacío. Las muestras secas se guardaron en congelación.

7.2. Análisis cualitativo de los extractos metanólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

La RP-HPLC utiliza una presión elevada para forzar a un disolvente a pasar por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución. La fase estacionaria (resina en la columna) es no polar y el disolvente es más polar (Harris, 2006). 1 mg de muestra se analizó en una columna analítica C-18 (Vydac

#201TP54; 5µm, 4.6mm, 250 mm). Se usaron dos disolventes, el disolvente A (H₂O +TFA 0.1%) y el disolvente B (MeCN + TFA 0.1%). Para el análisis se utilizó un gradiente de 20-60% del disolvente B en 40 min a un flujo de 1 ml/min. La longitud de onda de análisis en la que se realizó el monitoreo de los compuestos de interés fue de 294 nm.

7.3. Espectrometría de masas

La cromatografía líquida/espectrometría de masas es la herramienta predominante para identificar compuestos de una mezcla compleja y elucidar su estructura (Liu *et al*, 2010). Por su parte, la espectrometría de masas puede proporcionar información estructural y así facilitar la identificación estructural de los compuestos desconocidos, incluso permite la detección de cantidades menores o trazas de muestra (Ye, 2005).

Las fracciones principales obtenidas por HPLC se analizaron en un espectrómetro de masas Thermo Scientific LCQ Fleet con un sistema de ionización por electrospray (ESI). como fase móvil se utilizó acetonitrilo al 70% con 0.1% de ácido acético y la detección iónica realizada en modo positivo.

7.4. Cromatografía en capa fina (CCF) fase normal

La cromatografía en capa fina es una técnica de adsorción sólido-líquido. La fase móvil asciende por capilaridad a través de una capa delgada de adsorbente adherida a un soporte. Los soportes más utilizados son placas de vidrio, aluminio o materiales plásticos. Los adsorbentes empleados habitualmente incluyen sílica gel, alúmina, hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, conteniendo algún material que permita que la fase estacionaria se mantenga sobre el soporte. Esta técnica permite separar los componentes de una mezcla, determinar el grado de pureza de un compuesto, comparar la composición de diferentes muestras y realizar el seguimiento de una reacción (Lamarque, 2008).

Antes de llevar a cabo la separación de grandes cantidades de muestra por cromatografía en placa preparativa (CPP), se establecieron las condiciones realizando separaciones

analíticas del extracto metanólico por cromatografía en capa fina (CCF) sobre cromatofolios Merk DC F254, empleando como fase estacionaria sílica gel 60 F₂₅₄.

Se usaron dos sistemas de disolventes: n-hexano/DCM/MeOH (4:5:1) para separar los compuestos menos polares y MeCN/MeOH (3:7) para separar los compuestos más polares. Como agente revelador se utilizó H₂SO₄ al 10% en MeOH.

7.5. Purificación de los compuestos principales por cromatografía en placa preparativa

Para obtener mayores cantidades de muestra de los principales compuestos, se realizó la purificación utilizando cromatografía en placa preparativa de fase normal (20X20 cm, sílica gel 60 F₂₅₄, 2mm, Whatman) colocando 278.1 mg de muestra disueltos en 15 ml de MeOH. La placa se colocó en una cámara de elución para cromatografía con el sistema de disolventes n-hexano/DCM/MeOH (4:5:1). 1 cm antes de que el disolvente alcance el extremo superior de la placa, ésta se retiró de la cámara de elución, hasta la evaporación del disolvente y con una lámpara de luz UV se visualizaron los compuestos de interés como bandas horizontales. Con la finalidad de obtener una mejor separación de los compuestos de interés, se realizó la elución de la placa dos veces más, es decir, al término de la primera corrida, la placa se dejó secar y volvió a eluirse con el mismo disolvente. Este procedimiento se repitió una tercera vez al término de la segunda corrida.

Las bandas visualizadas mediante lámpara de luz UV se marcaron con un lápiz de grafito, a continuación se rasparon y pulverizaron sobre papel aluminio. Cada una de las fracciones pulverizadas se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 50 ml con 20 ml de MeOH, se les colocó una barra magnética y se dejaron agitando sobre un agitador magnético durante una noche. Después se dejó en reposo con la finalidad de sedimentar la sílica durante una hora para separar la sílica del MeOH. Posteriormente los sobrenadantes se centrifugaron durante 30 min a 4000 r.p.m. y los sobrenadantes resultantes se colocaron en matraces de bola de 50 ml para eliminar el disolvente en un rotavapor.

Para la separación de los compuestos con mayor polaridad presentes en la secreción, se utilizó un segundo sistema de disolventes: MeCN/MeOH (3:7). Se colocaron 110.2 mg

disueltos en 8 ml de MeOH de una fracción muy polar (ver más adelante la Tabla 4) realizando el mismo procedimiento que para la separación de los compuestos menos polares.

7.6. Análisis cualitativo por RP-HPLC de las fracciones mayoritarias obtenidas por CPP

Para conocer el grado de pureza de cada una de las fracciones obtenidas por CPP, éstas se analizaron por RP-HPLC. Las condiciones fueron las mismas que se usaron para el análisis cualitativo de los extractos metanólicos.

7.7. RMN de los principales componentes de interés

Ciertos átomos, al igual que los electrones, tienen núcleos con espín. El giro de estas partículas cargadas -la circulación de la carga- genera un momento magnético a lo largo del eje del espín, de modo que estos núcleos actúan como minúsculos imanes de barra. Este fenómeno se presenta en los núcleos de los átomos del hidrógeno (^1H) y del isótopo minoritario del carbono (^{13}C) y al colocarlos en un campo magnético externo, puede alinearse de dos formas: a favor o en contra del campo externo. La alineación con el campo es la más estable, debiendo absorberse energía para invertir el minúsculo imán y así colocarlo alineado contra el campo, que es la situación menos estable. Al aplicar la energía necesaria para invertir el minúsculo imán, se produce la absorción de ésta y se observa una señal, el espectro de resonancia magnética nuclear (Morrison y Boyd, 1998).

Los espectros de RMN para la marinobufagina se obtuvieron de un espectrómetro Varian MERCURY a 200 MHz para ^1H y ^{13}C . Los espectros de RMN para la marinobufotoxina se obtuvieron en un espectrómetro Varian INOVA a 400 MHz para los experimentos de ^1H , DEPT y HETCOR; el espectro de resonancia del ^{13}C se obtuvo en un espectrómetro Varian Mercury a 100 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se reportaron en partes por millón (ppm) con respecto a la referencia interna de tetrametilsilano (TMS). Las constantes de acoplamiento (J) están dadas en (Hz). La multiplicidad de las señales se denotaron con las siguientes abreviaturas: *s* (singulete), *d* (doblete), *t* (tripleto), *dd* (doble de dobles), *m*

(multiplete), *brq* (quintuplete ancho) y *brt* (triplete ancho). Los disolventes deuterados usados fueron CD₃OD y CDCl₃.

7.8. Toxicidad de las principales fracciones.

La DL₅₀ se definió como la cantidad de fracción capaz de matar al 50% de la población de ratones (Theakston y Reid, 1983) y se expresó en microgramos del compuesto por ratón (µg/ratón). Para este procedimiento se utilizaron ratones de la cepa CD1, sexo indistinto, entre 18 y 20 g de peso. La vía de administración fue intravenosa en la vena caudal de la cola. Se inyectaron diferentes dosis de las fracciones disueltas en MeOH en un volumen de 500 µl de PBS (1X), en donde la proporción final del MeOH es de 1:10, a grupos de 3 ratones. Después de 24 horas se registró el número de muertos. El porcentaje de mortalidad se graficó en función del logaritmo de la cantidad de muestra administrada y el análisis se realizó en una curva sigmoidea a través del método de regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism 4.03.

Las cantidades de muestra administradas se cuantificaron por absorbancia a una longitud de onda de 294 nm, asumiendo que 12.5 unidades de absorbancia representan 1 mg/ml (Dinan *et al*, 2001).

8. Resultados

8.1. Extracción de los componentes principales presentes en las secreciones.

En la Tabla 3 se muestran los rendimientos obtenidos en la extracción de los compuestos de interés a partir de las secreciones secas usando el equipo Soxhlet. Se realizaron 3 extracciones, una de ellas con especímenes colectados en Puebla (ensayo 1) y las otras dos con especies colectadas en Morelos (ensayos 2 y 3). La muestra del ensayo 1 corresponde a dos individuos colectados en la misma localidad de Puebla, la muestra del ensayo 2 contiene 0.26 g de secreción de un individuo proveniente del municipio de Jiutepec y 0.74 g de otro individuo proveniente de Tlaltizapán, la muestra del ensayo 3 corresponde 3 individuos capturados en Tlaltizapán. Se observó un rendimiento entre el 30-40% para cada una de las muestras.

Tabla 3. Rendimientos obtenidos en las extracciones.

Ensayo	Procedencia de la muestra	Cantidad de muestra (g)	Extracto obtenido (g)	% Rendimiento
1	Puebla	1	0.36	36
2	Morelos	1	0.40	40
3	Morelos	1	0.43	43

8.2. Análisis cualitativo de los extractos metanólicos mediante RP-HPLC.

En la Figura 9 se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos por RP-HPLC de los 3 extractos metanólicos correspondientes a las secreciones provenientes de los estados de Puebla (a, ensayo 1) y Morelos (b, c; ensayos 2 y 3 respectivamente). En todos los extractos se encontraron 3 fracciones mayoritarias (flecha roja): la fracción 1, más hidrofílica con un tiempo de retención aprox. de 5 min; las fracciones 2 y 3, más hidrofóbicas con un tiempo de retención aprox. de 24 y 27 min. A pesar de que las secreciones provienen de individuos de diferentes localidades, e inclusive de diferentes estados, se observó un perfil cromatográfico muy similar entre los 3 extractos metanólicos. Se observaron diferencias en la abundancia de algunos compuestos

minoritarios y el extracto que presentó mayor diferencia con respecto a la abundancia de compuestos corresponde a secreciones de individuos provenientes de Tlaltizapán (c).

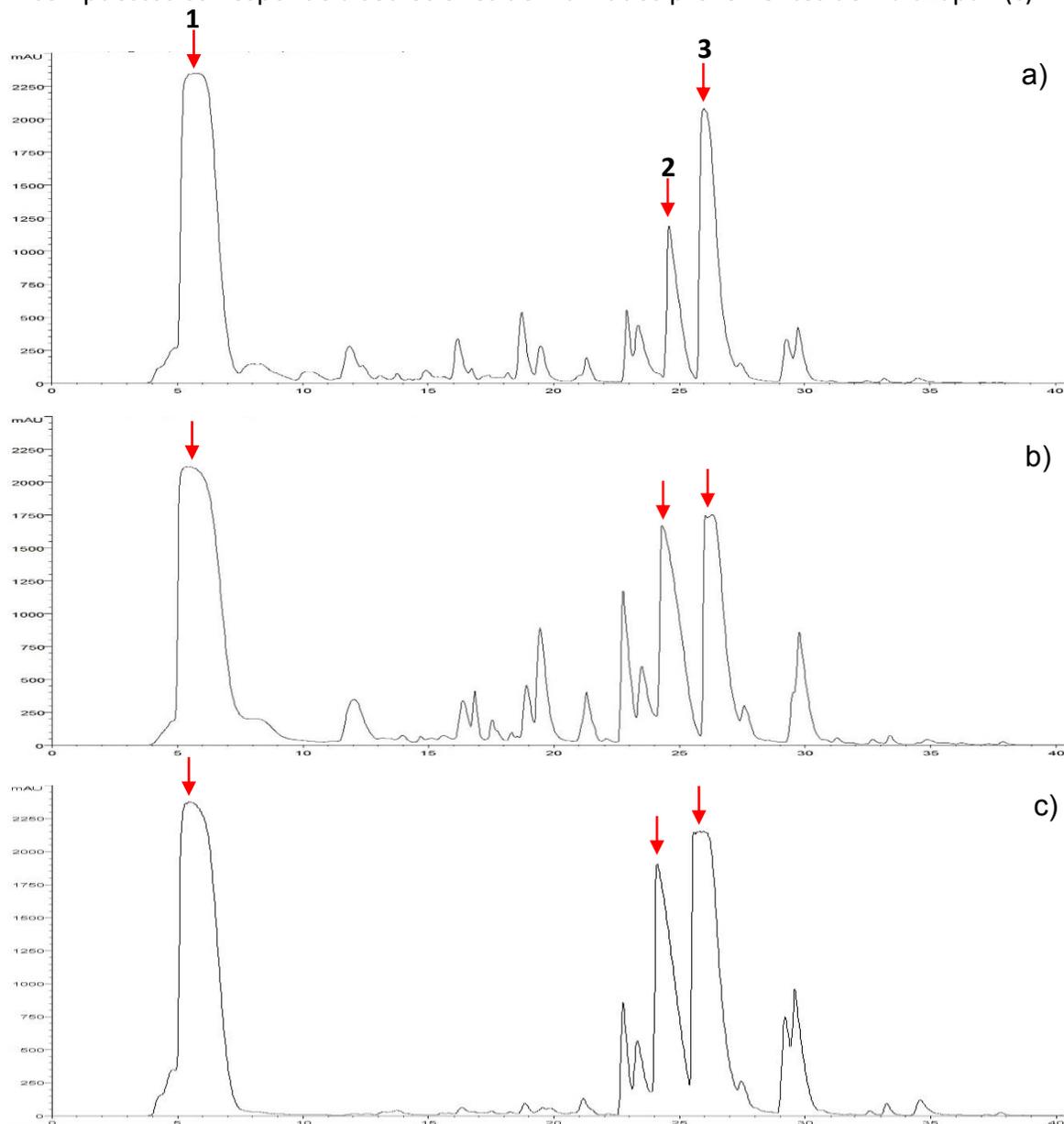


Figura 9. Perfiles cromatográficos de las 3 extracciones realizadas. a) Perfil cromatográfico de la muestra proveniente de Puebla. b,c) perfiles cromatográficos de las muestras provenientes de Morelos. Con flechas rojas se señalan tres fracciones principales.

8.3. Espectrometría de masas.

La primera parte de la caracterización de los compuestos presentes en las secreciones se logró mediante espectrometría de masas. Se encontraron iones con m/z entre 200 y 700,

éstos nos muestran que tenemos una mezcla de diferentes compuestos correspondientes a alcaloides, suberoil-arginina, bufadienólidos y bufotoxinas.

En la fracción 1 se encontraron dos iones principales, el más abundante con 331.33 (100% de abundancia relativa) y el segundo con 203.08 (60% de abundancia relativa). Estos iones correspondieron a la suberoil-arginina (**1**) y a la dehidrobufotenina (**1'**) respectivamente. La suberoil-arginina (**1**) es un ácido dicarboxílico de 8 carbonos unido a un fragmento de arginina, mientras que la dehidrobufotenina (**1'**) es un alcaloide de tipo indol (Figura 10).

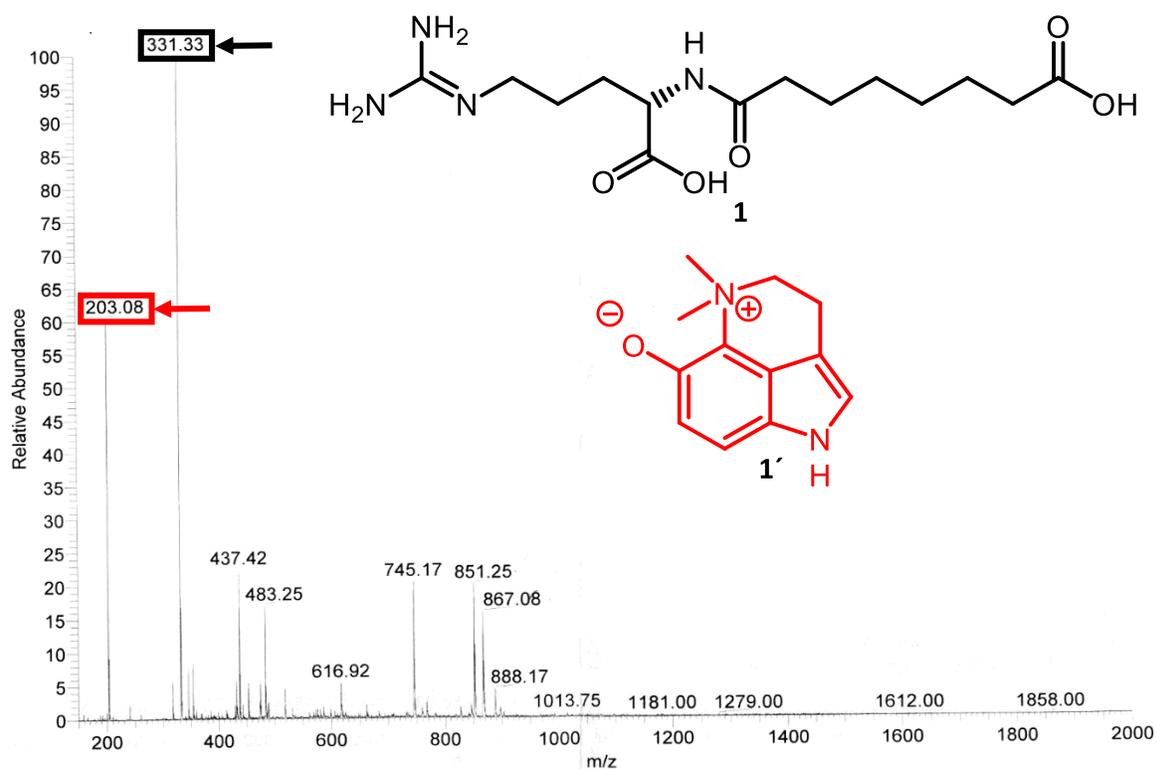


Figura 10. Espectrometría de masas de la fracción 1. En un recuadro rojo se muestra el ion correspondiente a la dehidrobufotenina (**1'**) y en negro se señala el ion correspondiente a la suberoil-arginina (**1**).

Para corroborar la presencia del alcaloide de tipo indol se realizó la prueba de detección de alcaloides con el reactivo *p*-dimetilaminobenzaldehído. Como control positivo se usó triptófano y como controles negativos se usaron la fracción 2 (bufadienólido) y agua. La determinación fue positiva al observar una coloración violeta al agregar el reactivo en el

extracto metanólico, en la fracción 1 y en una solución de triptófano. En el control negativo no se observó algún cambio de coloración (Figura 11).



Agua (-) Triptófano (+) Extracto (+) Fracc 1 Esteroide
Figura 11. Prueba de alcaloides con *p*-dimetilaminobenzaldehído. El agua y un esteroide dan una prueba negativa (sin cambio de coloración). El triptófano, el extracto metanólico y la fracción 1, dan una prueba positiva (cambio de coloración).

La segunda fracción principal presentó un ion con m/z de 713.67, el cual corresponde a la bufotoxina conocida como marinobufotoxina (**2**). Este componente está formado por el bufadienólido marinobufagina (**3**) y en el C-3 se presenta una esterificación con la suberoil-arginina (**1**) (Figura 12 y 13).

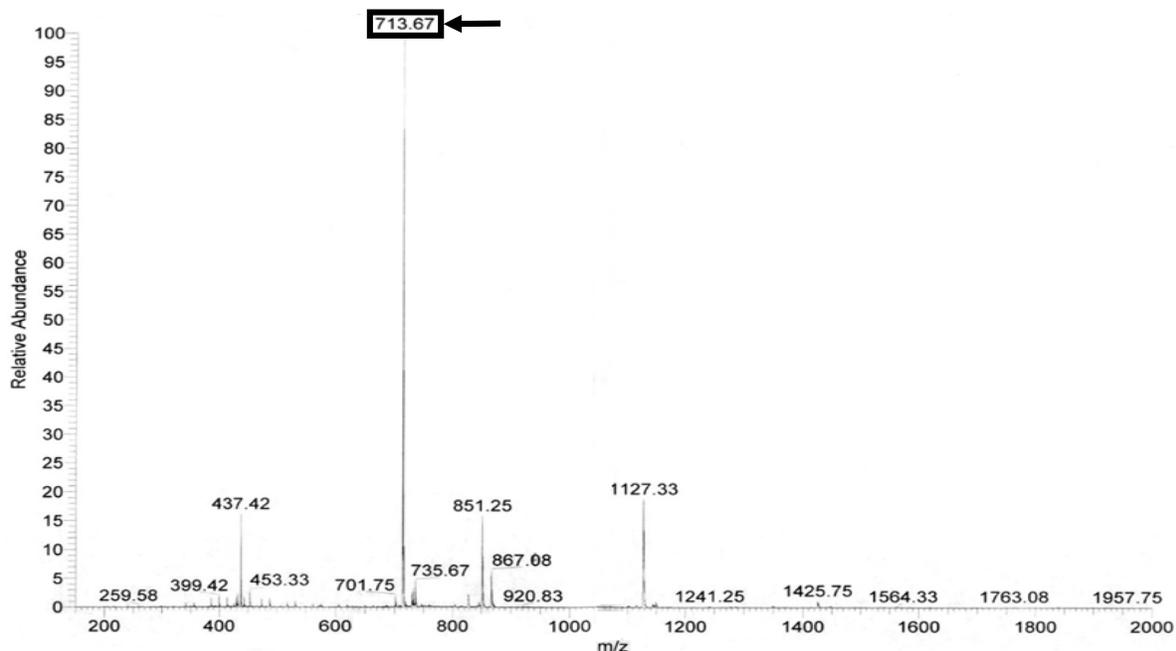


Figura 12. Espectrometría de masas de la fracción 2. En negro se muestra el ion correspondiente a la marinobufotoxina (**2**).

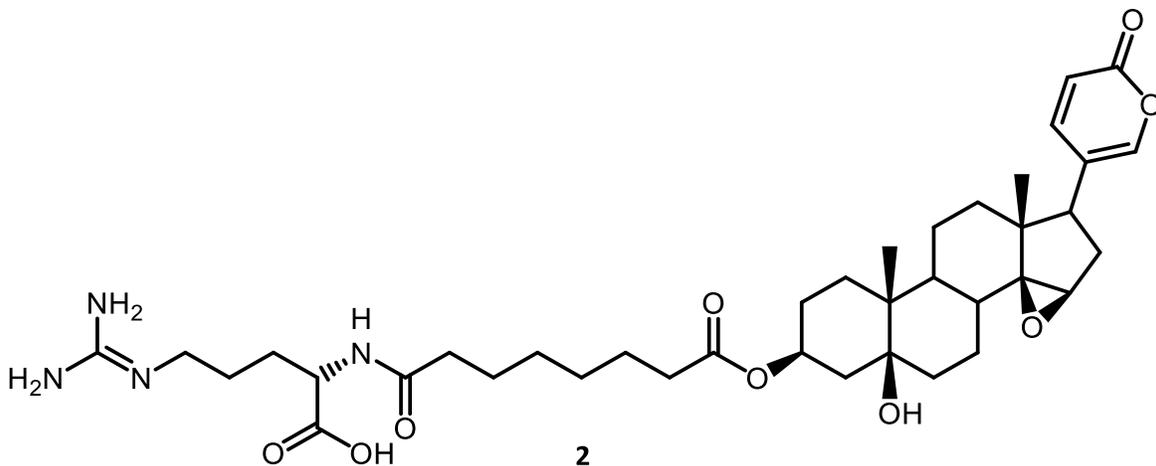


Figura 13. Estructura química de la marinobufotoxina (**2**).

La tercera fracción más abundante, presentó un ion principal con m/z de 401.33 (100%) correspondiente al bufadienólido marinobufagina (**3**) (Figura 14).

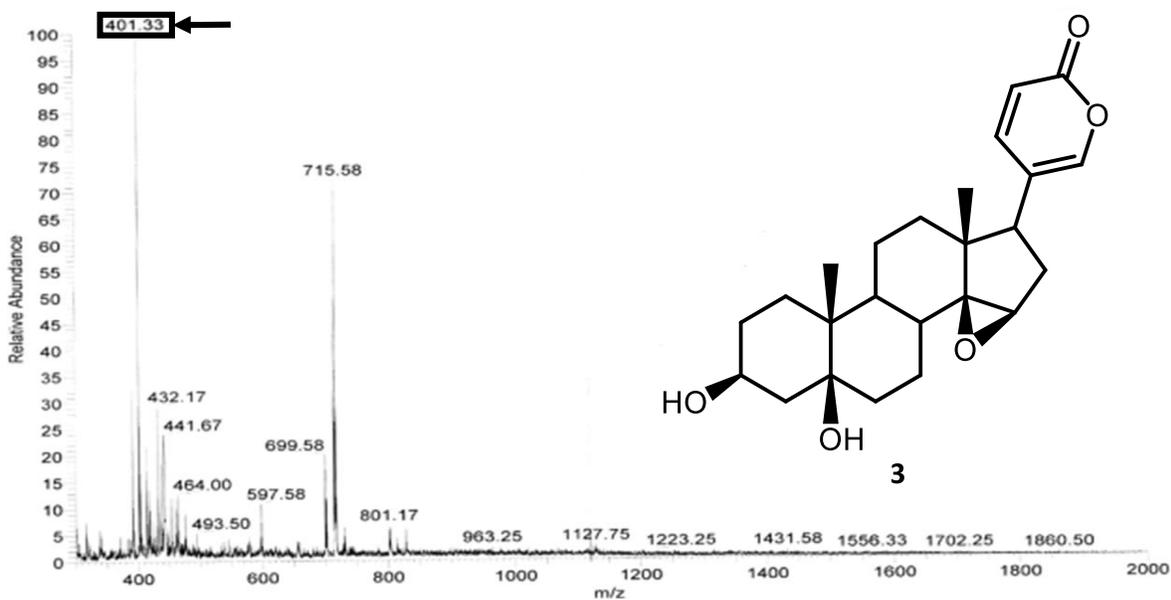


Figura 14. Espectrometría de masas de la fracción 3. En un recuadro negro se marca el ion correspondiente a la marinobufagina (**3**).

8.4. Purificación de los compuestos principales presentes en las secreciones.

Antes de realizar la CPP para separar cantidades mayores de muestra, se realizó una prueba por CCF para corroborar que el sistema de disolventes usado proporciona una buena separación de los compuestos de interés (Figura 15). Para estos experimentos se

utilizó la muestra correspondiente al ensayo 3 (Tabla 3), debido a que los compuestos minoritarios se encuentran en cantidades muy bajas.

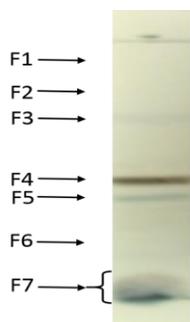


Figura 15. CCF fase normal del extracto metanólico correspondiente al ensayo 3 (Tabla 3). El sistema de disolventes usado fue n-hexano/DCM/MeOH (4:5:1). Como revelador se usó H₂SO₄ en MeOH al 10%.

n-hexano/DCM/MeOH (4:5:1)

Con el sistema de disolventes n-hexano/DCM/MeOH (4:5:1) se separaron los compuestos menos polares. De esta separación cromatográfica en placa preparativa se obtuvieron 7 fracciones, de éstas, la fracción F4 y la fracción F7 fueron las más abundantes con 62.1 y 110.2 mg respectivamente. Para este procedimiento se aplicaron 278.1 mg de muestra y al final se recuperaron 209.9 mg obteniendo un rendimiento del 74% (Tabla 4).

Tabla 4. Fracciones obtenidas por cromatografía en placa preparativa con el sistema de disolventes n-hexano/DCM/MeOH (4:5:1). En rojo se muestran las fracciones con mayor cantidad de muestra.

Fracción	mg obtenidos	%
F1	4.5	2.1
F2	3.6	1.7
F3	4.7	2.2
F4	62.1	29.5
F5	18.2	8.6
F6	4.6	2.1
F7	110.2	52.5

Se analizaron por RP-HPLC las fracciones más abundantes obtenidas por CPP. Al analizar el grado de pureza mediante RP-HPLC de la fracción F4 obtenida por CPP se observó un alto grado de pureza. Como podemos observar en el cromatograma (Figura 16), para esta fracción se observa un compuesto mayoritario en una proporción del 94%, este porcentaje nos permitió llevar a cabo los análisis espectroscópicos (RMN) con la seguridad

de que el 6 % restante no afecta en los experimentos para establecer la estructura química inequívoca.

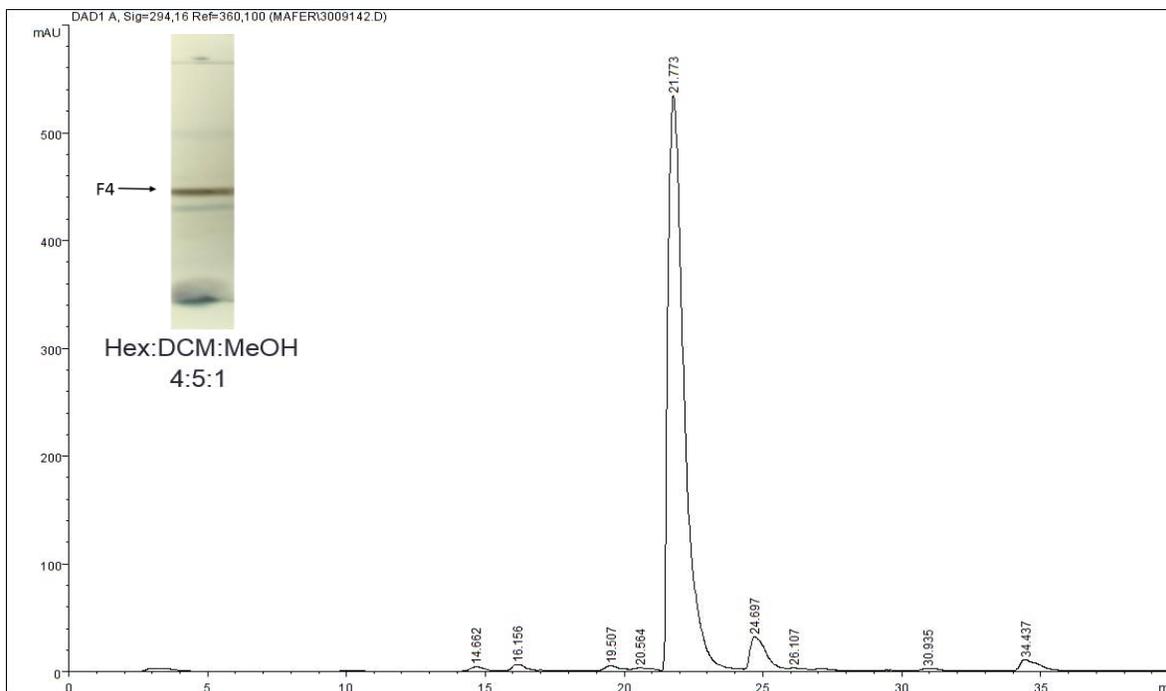


Figura 16. Cromatograma de la fracción F4 obtenida por CPP. En la CCF se señala con una flecha la ubicación de la fracción F4 obtenida por CPP.

La fracción F7 obtenida por CPP se observó como una mezcla de 2 compuestos mayoritarios por RP-HPLC (Figura 17).

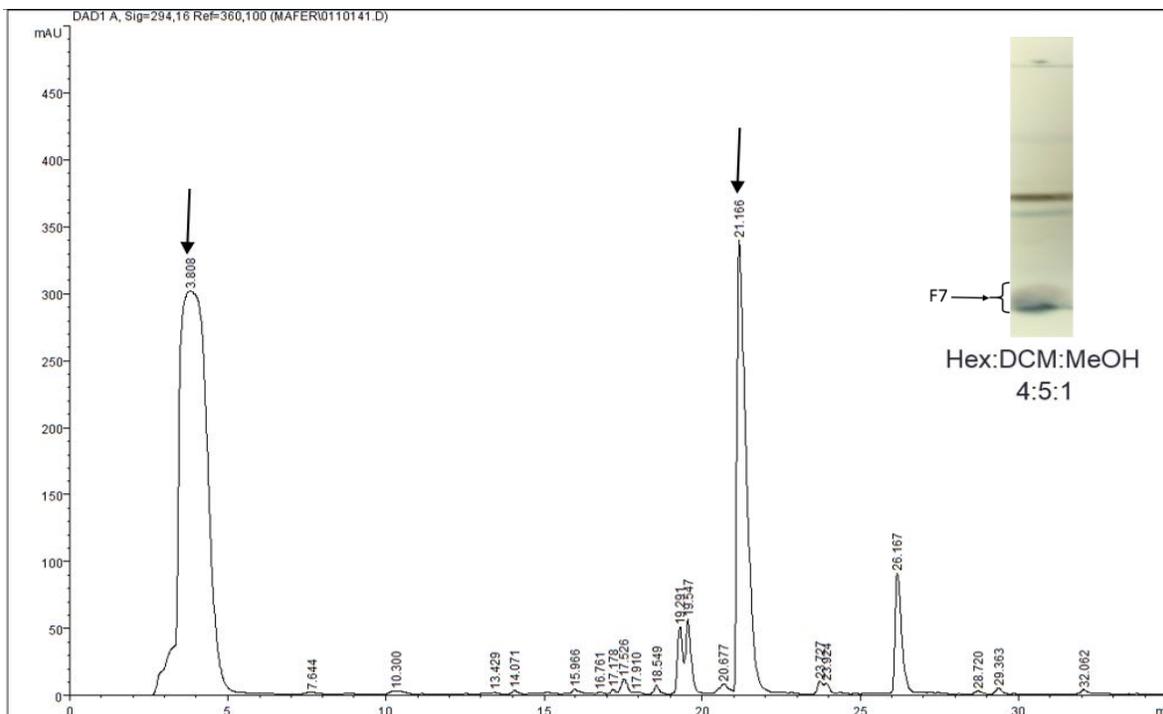


Figura 17. Cromatograma de la fracción F7 obtenida por CPP. En el cromatograma se señalan con flechas los 2 componentes mayoritarios. En la CCF se señala con una flecha la ubicación de la fracción F7 obtenida por CPP.

Como se observa en la Figura 15, ambas fracciones no presentaron un desplazamiento significativo con el sistema de disolventes n-hexano/DCM/MeOH (4:5:1) en CCF y CPP, por lo que estos compuestos son muy polares para este sistema de disolventes, sin embargo los disolventes usados en el RP-HPLC tienen la polaridad necesaria para poder llevar a cabo la separación de los compuestos.

Tomando como referencia los sistemas de elución utilizados en RP-HPLC, se realizó un ensayo en CCF fase normal de la fracción F7 obtenida mediante CPP (Figura 15) ahora utilizando el sistema MeCN/MeOH (3:7), observando una separación significativa de los 2 componentes mayoritarios observados en el cromatograma (Figura 18).

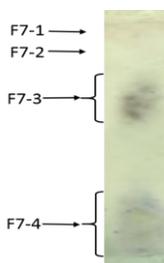


Figura 18. CCF fase normal de la fracción F7 obtenida por CPP. El sistema de disolventes usado fue MeCN/MeOH (3:7). Como revelador se usó H₂SO₄ en MeOH al 10%.

MeCN/MeOH (3:7)

Se realizó una cromatografía en placa preparativa de la fracción F7 utilizando los disolventes MeCN/MeOH (3:7). De este experimento se obtuvieron 4 fracciones, de las cuales, las fracciones F7-3 y F7-4 se obtuvieron 29.5 y 40.7 mg, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Fracciones obtenidas por cromatografía en placa preparativa con el sistema de disolventes MeCN/MeOH (3:7). En rojo se muestran las fracciones con mayor cantidad de muestra.

Fracción	mg obtenidos	%
F7-1	13.0	15.16
F7-2	2.5	2.9
F7-3	29.5	34.42
F7-4	40.7	47.4

El análisis por RP-HPLC mostró que la fracción F7-3 obtenida por CPP no presentó un alto grado de pureza (Figura 19), sin embargo, se realizaron los experimentos de RMN con dicha pureza.

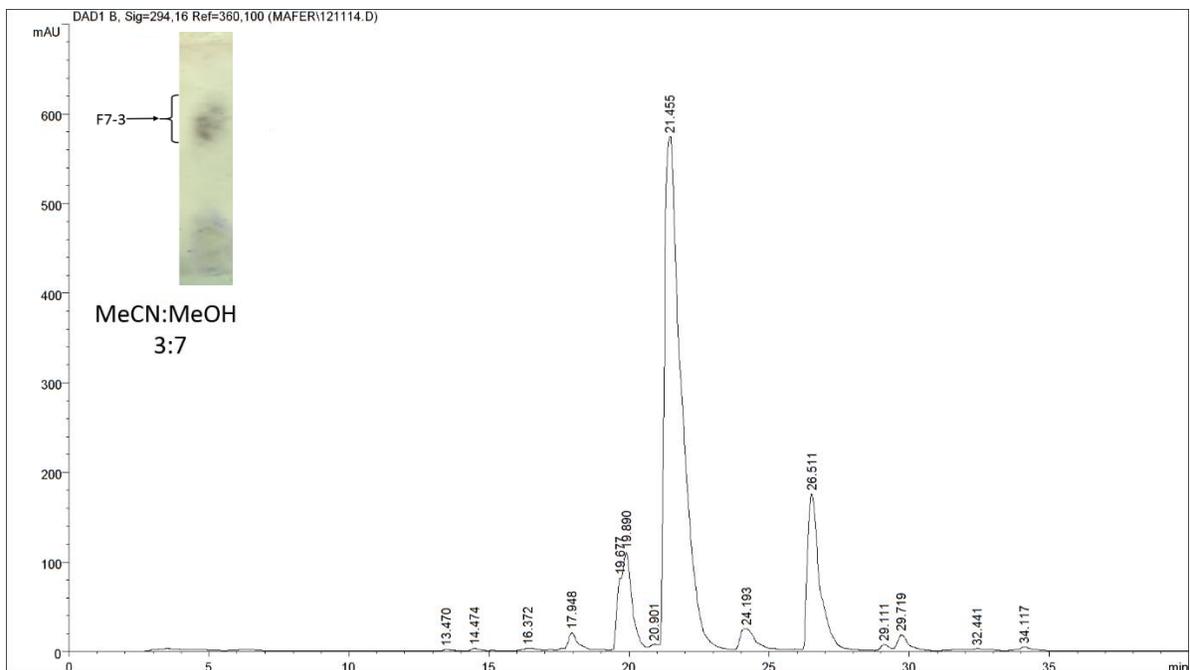


Figura 19. Cromatograma de la fracción F7-3 obtenida por CPP. En la CCF se señala con una flecha la ubicación de la fracción F7-3 obtenida por CPP.

La fracción F7-4 obtenida por CPP (Tabla 5) con el sistema de disolventes MeCN/MeOH (3:7) presentó un alto grado de pureza (Figura 20) mediante HPLC, sin embargo, de la misma manera como se muestra en la fracción 1 de la figura 10 mediante la técnica de espectrometría de masas se observó la presencia de 2 compuestos principales que corresponden al alcaloide (**1'**) y a la suberoil-arginia (**1**). El sistema de disolventes MeCN/MeOH (3:7) utilizado, no presentó la polaridad necesaria para separar los compuestos **1'** y **1**, por tal motivo no se realizaron los experimentos de resonancia para la fracción F7-4.

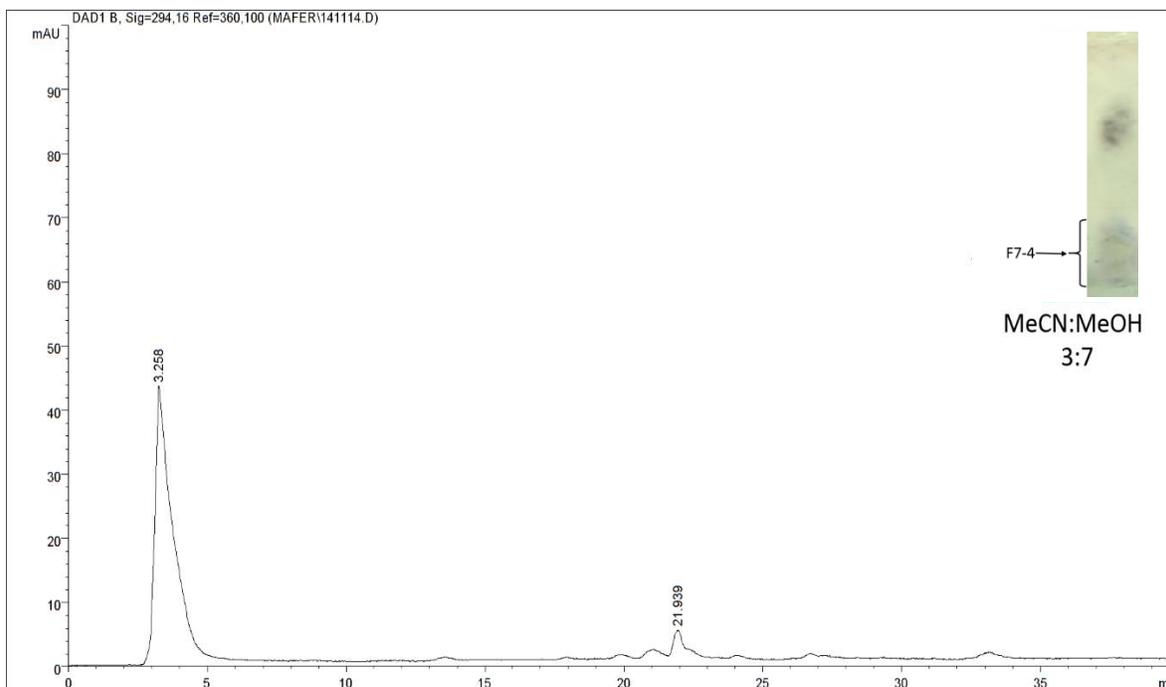


Figura 20. Cromatograma de la fracción F7-4 obtenida por CPP. En la CCF se señala con una flecha la ubicación de la fracción F7-4 obtenida por CPP.

8.5. RMN

Para determinar la estructura química de los componentes más abundantes aislados por CPP se realizaron experimentos espectroscópicos de RMN (^{13}C , ^1H , DEPT y HETCOR).

Se tomaron 20 mg del compuesto obtenido por CPP mostrado en la Figura 16. El análisis por RMN de ^1H permitió identificar señales características para un compuesto de tipo bufadienólido, observando en el espectro un grupo de señales características para una δ -lactona (6.2-8.0 ppm); en 7.44 ppm se observa la señal doble ($J=2.4$ Hz) que corresponde al protón 21 y que se encuentra acoplado con el protón de la posición 22, para el protón 22 se observa una señal doble de doble debido al acoplamiento con los protones de la posición 21 y 23 (7.89 ppm, $J=2.4, 9.8$ Hz) y en 6.26 se observa la señal doble ($J=9.8$ Hz) para el protón 23 que se acopla con el protón de la posición 22. (Figura 21).

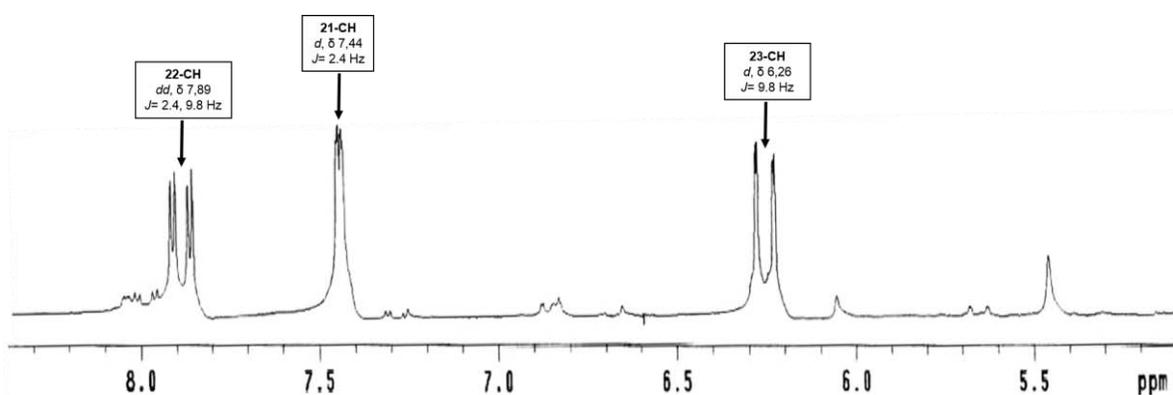
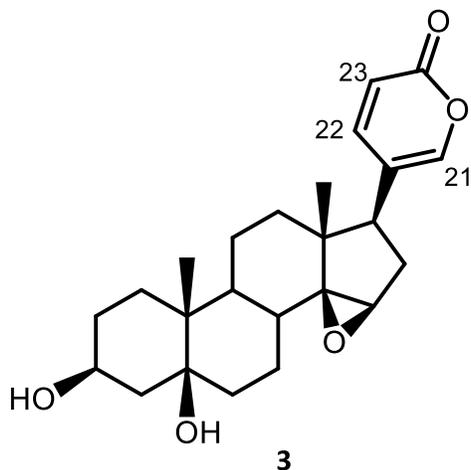


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz) con señales correspondientes a una δ -lactona.

Así como también se observan a campo intermedio (3.5-4.5 ppm) dos señales anchas características para protones base de oxígeno, las cuales en una estructura de tipo bufadienólido corresponden a los protones de la posición 3 (4.12 ppm) y 15 (3.69 ppm) (Figura 22).

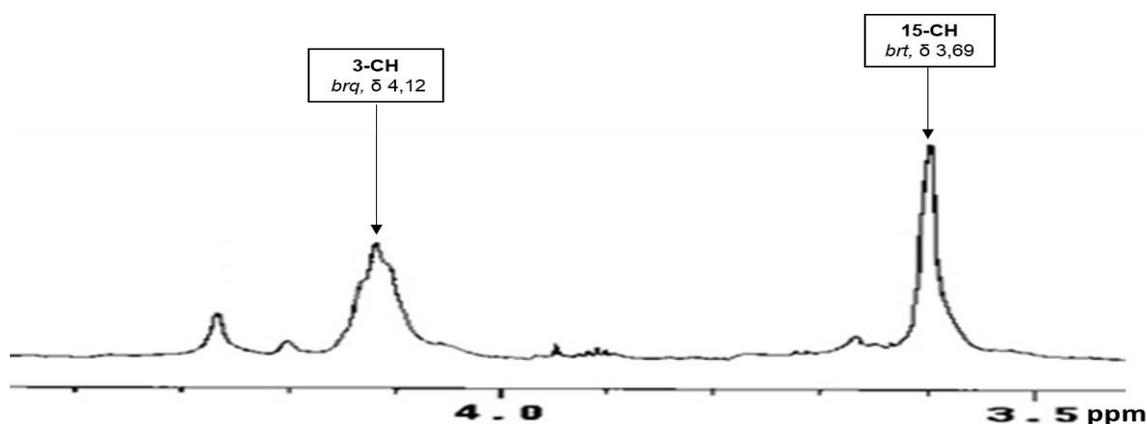
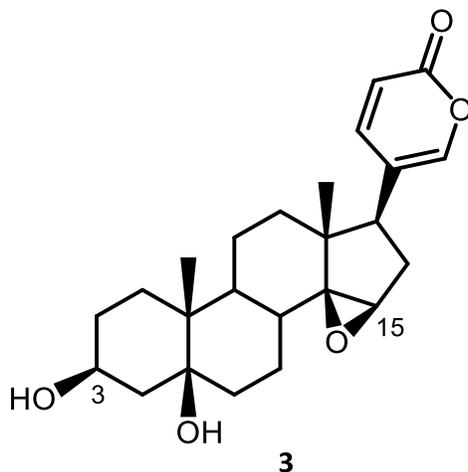


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz) con señales características de protones base de oxígeno.

En 0.97 ppm y 0.78 ppm se observan dos señales simples características de grupo metilo unidos a carbonos cuaternarios correspondientes a los protones 19 y 18 respectivamente, así como también se observan un grupo de señales complejas que debido a su multiplicidad y desplazamiento químico entre 1 ppm y 3 ppm son asignadas a protones de grupos metino (CH) y metileno (CH_2) (Figura 23).

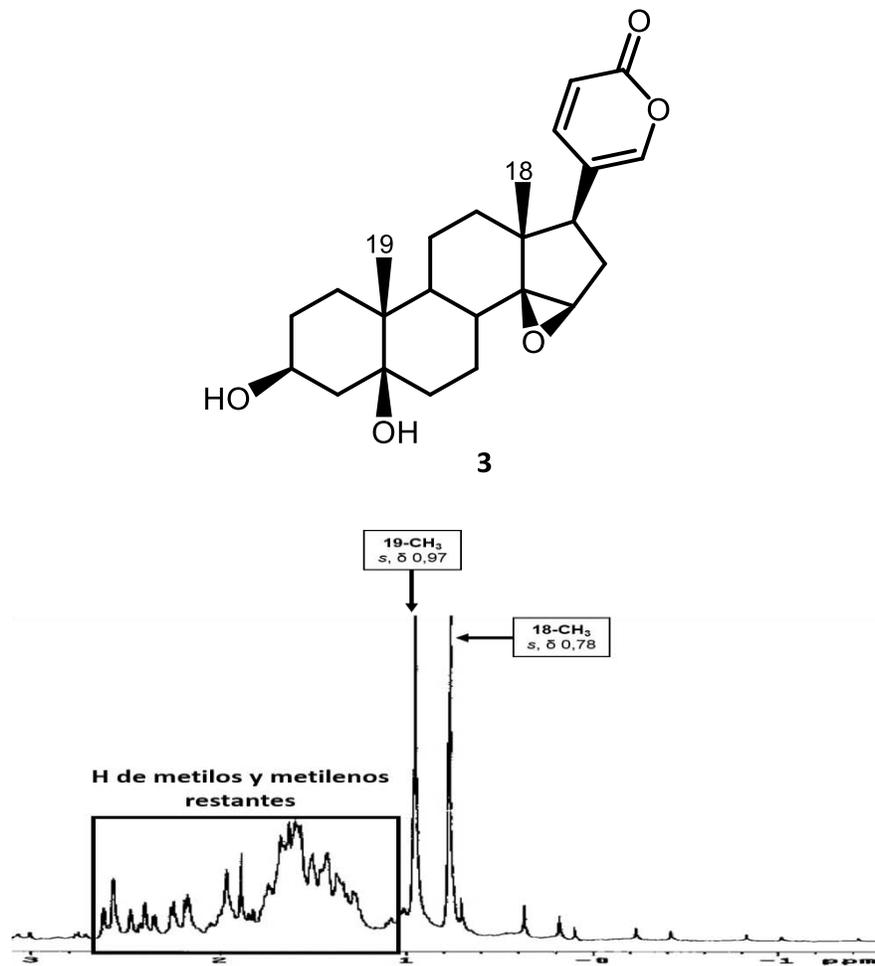


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz) con señales asignadas a grupos metino (CH), metileno (CH_2) y metilo (CH_3).

Una vez explicado cada uno de los fragmentos estructurales observados en el experimento de RMN de ^1H , podemos asignar la estructura para el compuesto identificado como el bufadienólido marinobufagina (**3**). El espectro completo para este compuesto se muestra en la Figura 24.

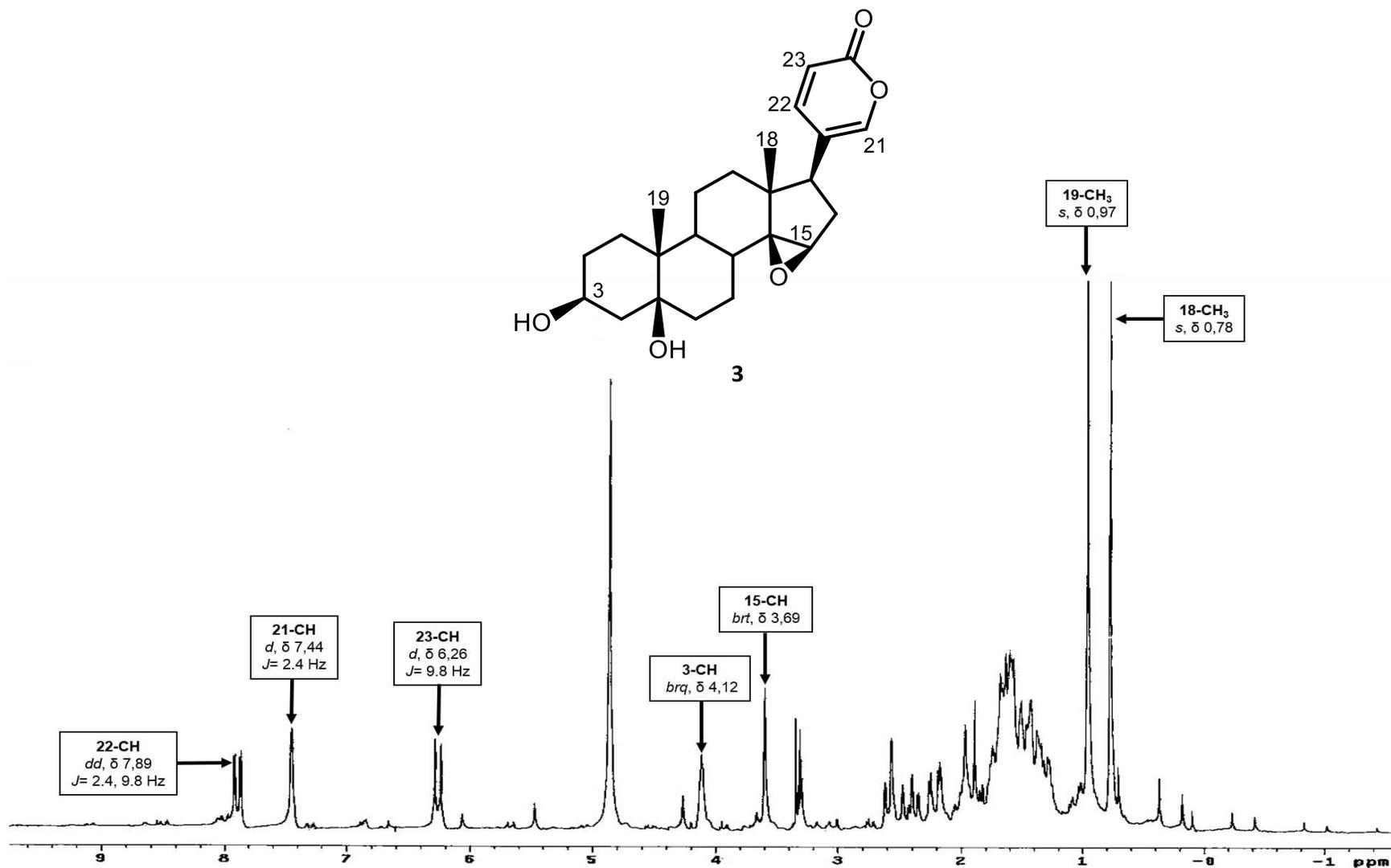


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz) del compuesto 3.

Señales correspondientes a los protones presentes en el compuesto **3**:

RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz, **3**) δ : 7.89 (*dd*, $J=2.4, 9.8$, 1H, H-22), 7.44 (*d*, $J=2.4$, 1H, H-21), 6.26 (*d*, $J=9.8$, 1H, H-23), 4.12 (*brq*, 1H, H-3), 3.69 (*brt*, 1H, H-15), 2.57 (*brt*, $J=7.2$, 1H, H-17), 2.21 (*dd*, $J=4.6, 14.8$, 2H, H-4), 2.21(*dd*, $J=4.6, 3.2$, 2H, H-16), 1.98 (*m*, 1H, H-8), 1.83 (*m*, 2H, H-1), 1.66 (*m*, 2H, H-6), 1.64 (*m*, 2H, H-12), 1.63 (*m*, 2H, H-2), 1.63 (*m*, 2H, H-7) 1.57 (*m*, 1H, H-9), 1.39 (*m*, 2H, H-11), 0.97 (*s*, 3H, H-19), 0.78 (*s*, 3H, H-18).

La estructura propuesta para el compuesto **3** está constituida por 6 carbonos cuaternarios (C), 8 metinos (CH), 8 metilenos (CH_2) y 2 metilos (CH_3) dando un total de 24 átomos de carbono. La presencia de éstos fue corroborada mediante el experimento de RMN ^{13}C (Figura 25).

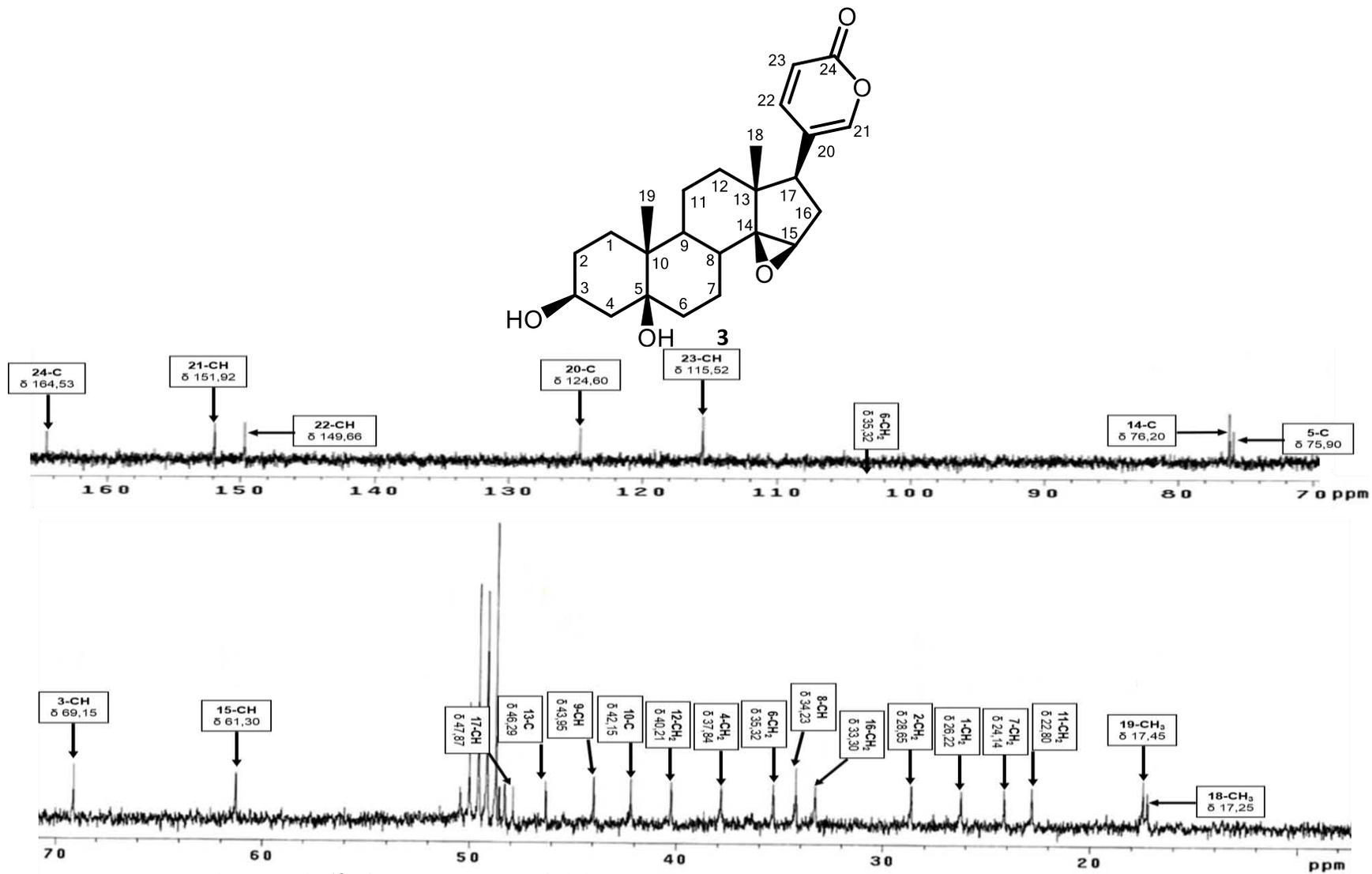


Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 200 MHz) del compuesto 3.

Señales correspondientes a los carbonos presentes en el compuesto 3:

RMN ^{13}C (CD_3OD , 200 MHz, compuesto **3**) δ : 164.53 (C-24), 151.92 (C-21), 149.66 (C-22), 124.60 (C-20), 115.52 (C-23), 76.20 (C-14), 75.90 (C-5), 69.15 (C-3), 61.30 (C-15), 47.87 (C-17), 46.29 (C-13), 43.95 (C-9), 42.15 (C-10), 40.21 (C-12) 37.84 (C-4), 35.32 (C-6), 34.23 (C-8), 33.30 (C-16), 28.65 (C-2), 26.22 (C-1), 24.14 (C-7), 22.80 (C-11), 17.45(C-19), 17.25(C-18).

Los experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C permiten establecer la siguiente fórmula molecular condensada: $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$ (P.M: 400 g/mol). El peso molecular para esta estructura fue corroborado mediante el espectro de masas (Figura 14).

Se tomaron 20 mg de la fracción F7-3 obtenida por CPP con el sistema de disolventes MeCN/MeOH (3:7) (Figura 19) para su análisis por RMN.

Existen experimentos bidimensionales que permiten observar correlaciones homonucleares y heteronucleares (COSY, HSQC o HETCOR y HMBC) que ayudan a establecer correlaciones entre átomos de hidrógeno y carbono a una, dos y tres ligaduras; de esta manera, se evidencia la conectividad directa o indirecta de los átomos de hidrógeno y carbono involucrados en la estructura molecular del compuesto que se pretende identificar mediante una propuesta estructural.

Los experimentos antes mencionados son necesarios para un análisis estructural; sin embargo, sólo fue posible obtener para el compuesto **2** un experimento bidimensional heteronuclear (HETCOR) que permitió corroborar las correlaciones protón-carbono claves del fragmento estructural suberoil-arginina. En la Figura 26 podemos observar en el espectro las correlaciones C-H siguientes: a campo más bajo se observa la correlación protón-carbono de la posición 23 (115.52 y 6.27 ppm); así como, las correspondientes a los protones con sus respectivos carbonos de las posiciones 3 (72.29 y 5.13 ppm); 33 (55.44 y 4.27 ppm); 26 y 31 (38.75 y 2.17 ppm); 16 y 4 (37.36 y 2.25 ppm); 19 (17.31 y 0.98 ppm) y 18 (17.16 y 0.78 ppm).

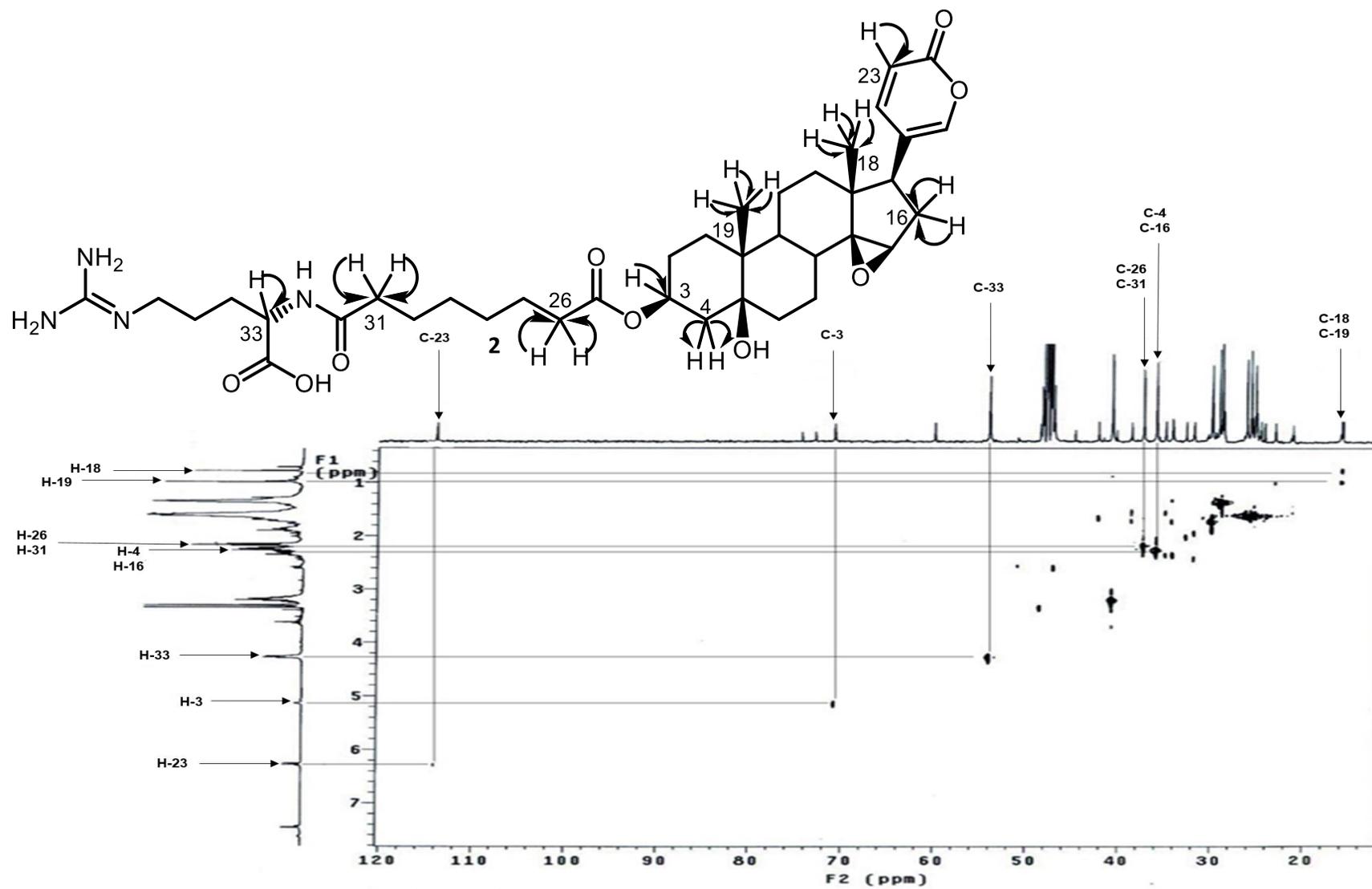


Figura 26. Espectro HETCOR correspondiente a la MBT.

En el experimento DEPT solamente se observan las señales de CH, CH₂ o CH₃. No se observan señales correspondientes a carbonos cuaternarios. El análisis de los experimentos de ¹³C junto con el experimento DEPT permitió determinar señales correspondientes para carbonos cuaternarios, metinos (CH), metilenos (CH₂) y metilos (CH₃). Con estos experimentos se encontraron diez carbonos cuaternarios; 6 de ellos se encuentran en la aglicona: el carbonilo de la posición C-24 y el carbono C-20 de tipo sp² que forman parte de la δ-lactona, los carbonos base de oxígeno de las posiciones C-5 y C-14, por último los carbonos 10 y 13 de tipo sp³. Los 4 carbonos cuaternarios restantes corresponden al carbonilo del éster (C-25), carbonilo de una amida (C-32), carbonilo de un ácido carboxílico (C-38) y el carbono de una imina (C-37). También se observa la existencia de 9 metinos (CH), 17 metilenos (CH₂) y 2 metilos (CH₃) (Figura 27).

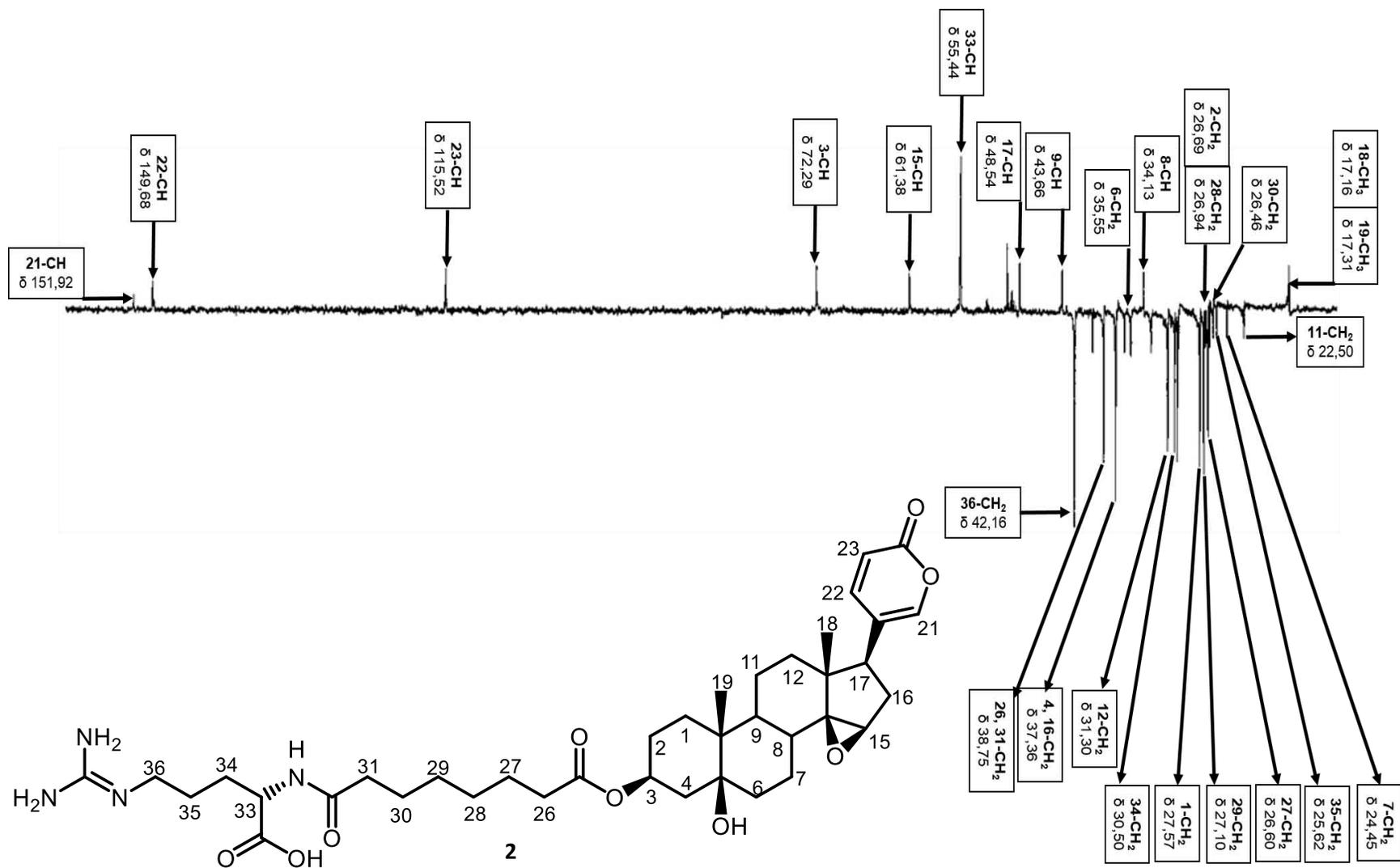


Figura 27. Espectro DEPT correspondiente al compuesto 2.

En el espectro de RMN de ^1H encontramos las señales características para el anillo δ -lactona (6-8 ppm), en 7.46 ppm se observa la señal doble ($J=1.6$ Hz) que corresponde al protón 21 y que se encuentra acoplado con el protón de la posición 22, para el protón 22 se observa una señal doble de doble debido al acoplamiento con los protones de la posición 21 y 23 (7.90 ppm, $J=2.4, 9.6$ Hz) y en 6.27 se observa la señal doble ($J=9.6$ Hz) para el protón 23 que se acopla con el protón de la posición 22. Este grupo de señales junto con las observadas en 5.13 ppm (*brq*, H-3), 3.34 (*brt*, H-15), 0.98 (*s*, 3H-19) y 0.78 (*s*, 3H-18) son características de un esqueleto base de un bufadienólido (Figura 28).

De manera adicional en el espectro de RMN de ^1H se observa en 4.27 ppm una señal múltiple que por su desplazamiento químico se trata de un protón base de heteroátomo (N) y se encuentra doblemente influenciado por grupos carbonilos (H-33), en 3.34 ppm se encuentra otra señal múltiple con protones base de heteroátomo (N) correspondiente al H-36, así como también se observan dos grupos de señales traslapadas en 2.17 ppm (*t*, $J=7.2, 7.6$ Hz) que se asignan a protones alfa a un grupo carbonilo (H-26 y H-31) (Figura 29).

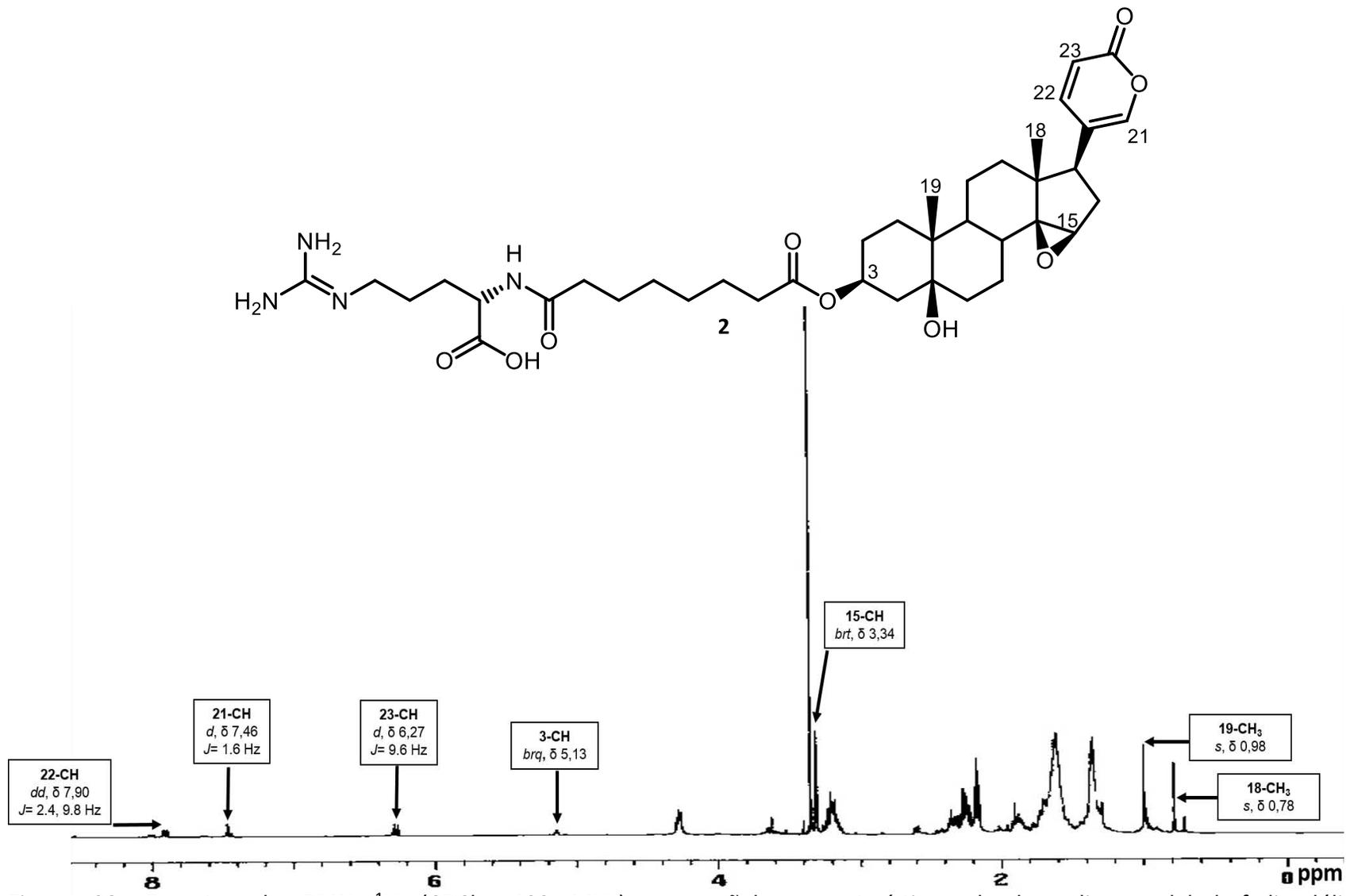


Figura 28. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) con señales características de la aglicona del bufadiendólido.

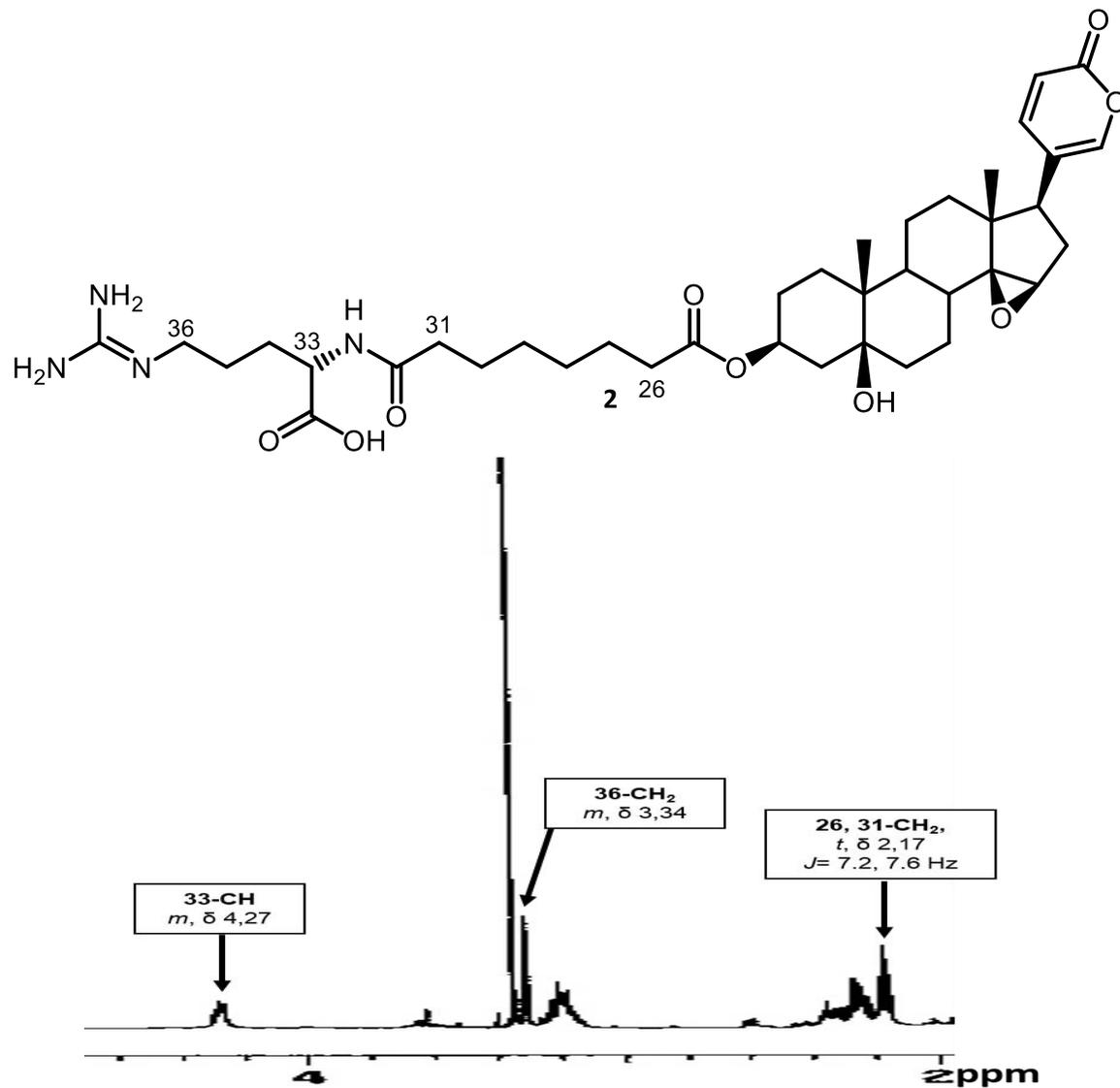


Figura 29. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) con señales de hidrógenos alfa a un carbonilo e hidrógenos alfa a un heteroátomo.

Entre 1.6 y 2.4 ppm se observan señales múltiples características para protones (metinos y metilenos) de una cadena hidrocarbonada. Este grupo de señales identifican la presencia de la suberoil-arginina, el cual se encuentra unido en la posición 3 de la aglicona.

Evidencia de esta sustitución se observa en el desplazamiento químico de 4.12 ppm cuando hay un grupo hidroxilo, a 5.13 ppm cuando se encuentra un grupo carbonilo (*brq*, H-3). La información proporcionada indica que el compuesto identificado es la conjugación del compuesto **3** con la suberoil-arginina (**1**), es decir, nos encontramos con la bufotoxina correspondiente (**2**).

Señales correspondientes a los protones presentes en el compuesto **2**:

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, marinobufotoxina) δ: 7.90 (*dd*, *J*=2.4, 9.6, 1H, H-22), 7.46 (*d*, *J*=1.6, 1H, H-21), 6.27 (*d*, *J*=9.6, 1H, H-23), 5.13 (*brq*, 1H, H-3), 4.27 (*m*, 1H, H-33), 3.34 (*brt*, 1H, H-15), 3.34 (*m*, 1H, H-36), 2.28 (*brt*, *J*=7.4 Hz, 1H, H-17), 2.25 (*dd*, *J*=7.2, 11.2 Hz; 2H, H-4), 2.25 (*dd*, *J*=7.2 y 7.6 Hz; 2H, H-16), 2.17 (*t*, *J*=7.2, 7.6 Hz, 2H, H-26), 2.17 (*t*, *J*=7.2, 7.6 Hz; 2H, H-31), 1.93 (*m*, 2H, H-34), 1.91 (*m*; 2H, H-1), 1.71 (*m*; 1H, H-8), 1.68 (*m*; 2H, H-2), 1.64 (*m*; 2H, H-35), 1.63 (*m*; 2H, H-30), 1.61 (*m*; 2H, H-6), 1.58 (*m*; 2H, H-27), 1.53 (*m*; 2H, H-7), 1.53 (*m*; 1H, H-9), 1.41 (*m*; 2H, H-28), 1.38 (*m*; 2H, H-29), 1.36 (*m*; 2H, H-11), 1.33 (*m*; 2H, H-12), 0.98 (*s*; 3H, H-19), 0.78 (*s*; 3H, H-18).

En el espectro de RMN de ¹³C se observan las señales para los carbonos C-3 (72.29 ppm), C-5 (74.37 ppm), C-14 (75.83 ppm), C-15 (61.38 ppm), C-20 (124.61 ppm), C-21 (151.92 ppm), C-22 (149.68 ppm), C-23 (115.52 ppm) y C-24 (158.83 ppm) que caracterizan a la genina de un bufadienólido (Figura 30).

De manera adicional a las señales descritas en la Figura 28 se observan tres señales más entre 164 y 180 ppm que son características de grupo carbonilo de una amida (C-32), un éster (C-25) y un ácido carboxílico (C-38) (Figura 31).

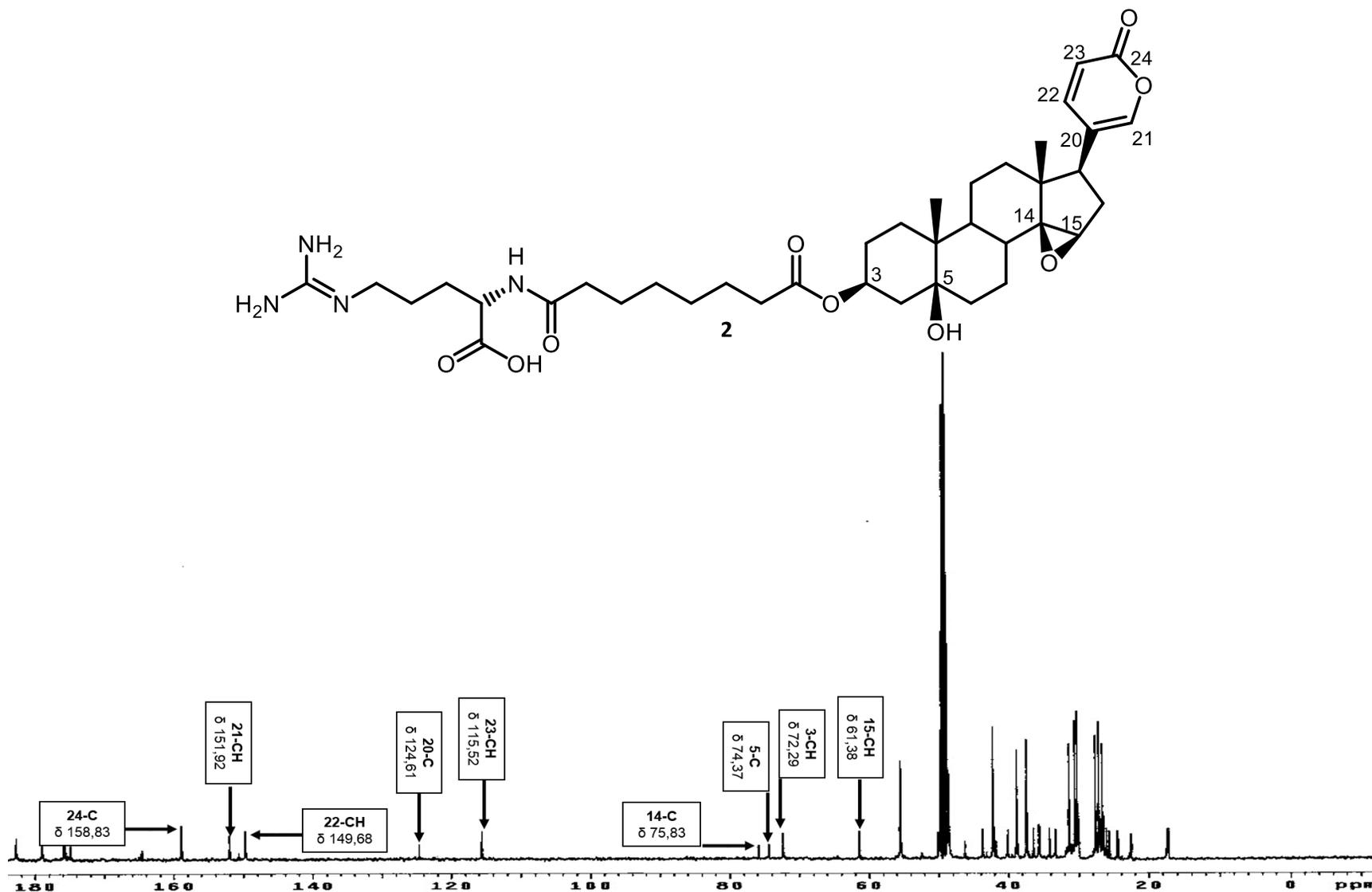


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) con señales características de la genina correspondiente a un bufadienólido.

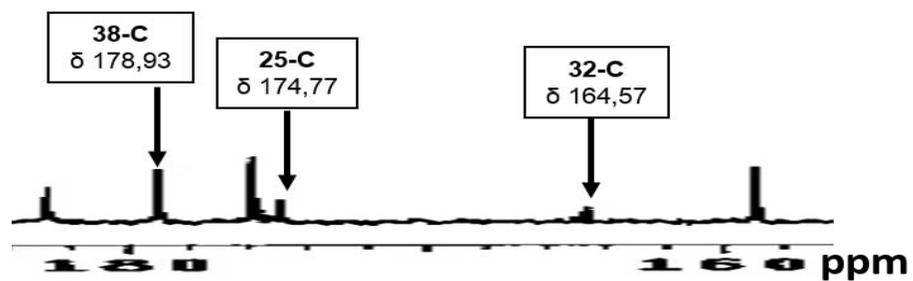
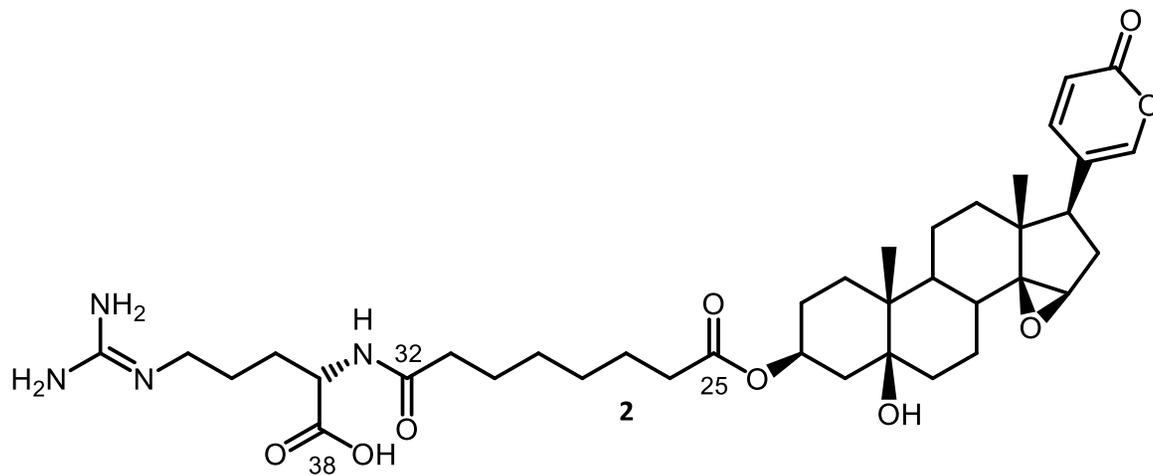


Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) con señales características de grupos carbonilo de amida, éster y ácido carboxílico.

Las señales de carbonilo 178.93 (C-38), 174.77 (C-25) y 164.57 (C-32) observadas en el espectro de ^{13}C junto con las señales que aparecen en 158.83 (C-37), 55.44 (C-33), 38.75 (C-26), 38.75 (C-31) y 42.16 (C-36), dan evidencia sobre la presencia del fragmento correspondiente a la suberoil-arginina (**1**) (Figura 32).

Señales correspondientes a los carbonos presentes en el compuesto **2**:

RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz, compuesto **2**) δ : 178.93 (C-38), 174.77 (C-25), 164.57 (C-32), 158.83 (C-37, C-24), 151.92 (C-21), 149.68 (C-22), 124.61 (C-20), 115.52 (C-23), 75.83 (C-14), 74.37 (C-5), 72.29 (C-3), 61.38 (C-15), 55.44 (C-33), 48.54 (C-17), 46.22 (C-13), 43.66 (C-9), 42.16 (C-36), 40.06 (C-10), 38.75 (C-31, C-26), 37.36 (C-16, C-4), 35.55 (C-6), 34.13 (C-8), 31.30 (C-12), 30.50 (C-34), 27.57 (C-1), 27.10 (C-29), 26.94 (C-28), 26.69 (C-2), 26.60 (C-27), 26.46 (C-30), 25.62 (C-35), 24.45 (C-7), 22.50 (C-11), 17.31 (C-19), 17.16 (C-18).

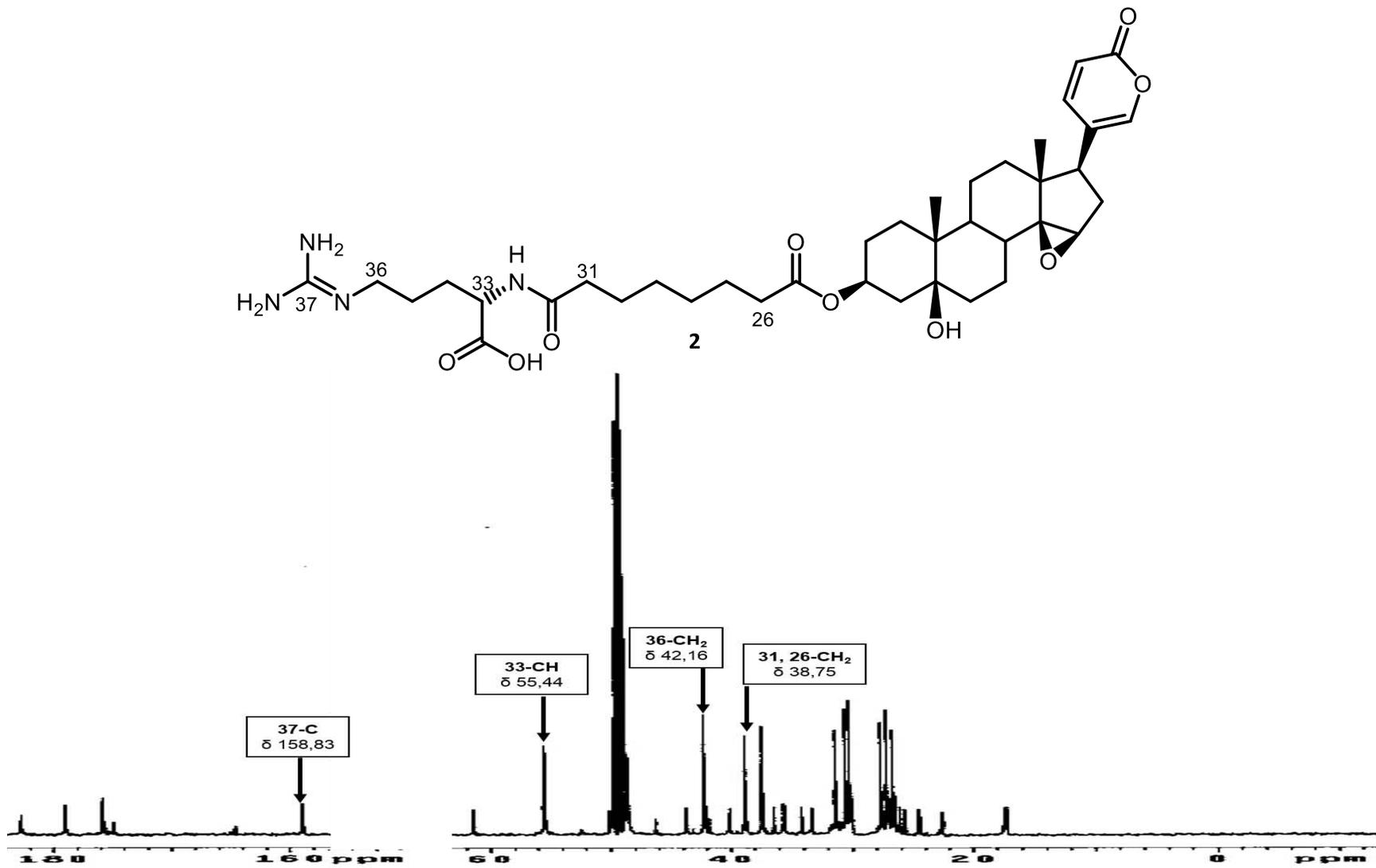


Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) con señales características para la suberoil-arginina.

Los datos espectroscópicos tanto de ^1H y ^{13}C dan evidencia sobre la existencia de 1 grupo hidroxilo, un epóxido, un éster alifático, un éster cíclico, una amida, un ácido carboxílico y un grupo guanidino. Tomando en consideración los heteroátomos de cada uno de éstos grupos funcionales llegamos a la fórmula $\text{C}_{38}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_9$ (P.M: 712 g/mol) que está de acuerdo con el ion molecular observado en el espectro de masas (Figura 12).

8.6 Pruebas de toxicidad en ratones.

El grupo de compuestos que causan principalmente los síntomas característicos en casos de envenenamiento corresponden a las bufogeninas y bufotoxinas. Debido a esto se realizaron pruebas de toxicidad del compuesto **3** (bufogenina) y del compuesto **2** (su respectiva bufotoxina), en ratones CD1 y se determinó la DL_{50} por vía intravenosa.

Para determinar la DL_{50} del compuesto **3** se administraron diferentes dosis de este bufadienólido (Tabla 6 y 8).

Tabla 6. Dosis de la marinobufagina administrada en ratones.

$\mu\text{g}/\text{ratón}$	Muerte	Signología
37.2	0/3	Agitación, calma, espasmos, convulsión y desorientación
46.5	1/3	Convulsión casi inmediata, temblor
55.8	2/3	Desorientación, agitación, temblor
74.4	3/3	Desorientación, convulsión
148.8	1/1	Muerte inmediata

La signología característica consistió en agitación acompañada de quietud, desorientación, temblor, espasmos y convulsiones. En dosis subletales, los ratones mostraron una recuperación aproximadamente 15 min después de la administración de la dosis, pero todavía se observaron temblores.

Las dosis administradas por vía I.V. para determinar la toxicidad del compuesto **2** se muestran en la Tabla 7 y en la Tabla 8 la aproximación de la dosis letal media.

Tabla 7. Dosis de la marinobufotoxina administrada en ratones.

$\mu\text{g}/\text{ratón}$	Muerte	Signología
74.4	0/3	-----
223.2	0/1	Desorientación, agitación, convulsión espontánea, temblor.
297.6	1/3	Desorientación, agitación, convulsión, temblor, doblamiento de espalda.
316.2	3/3	Muerte inmediata
334.8	3/3	Muerte inmediata
372.0	3/3	Muerte inmediata

La signología observada en los ratones fue muy similar a la que se observó para la genina; sin embargo, las convulsiones no fueron continuas, éstas se presentaron por lapsos. En dosis subletales, el tiempo de recuperación de los ratones fue de 40 min después de la administración del compuesto y aún se observaron signos de desorientación y temblores.

Tabla 8. Valores de las DL_{50} de los compuestos tóxicos evaluados.

Compuesto	DL_{50} ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	R^2	EC.
Marinobufagina	51	0.98	47-55
Marinobufotoxina	299	1	299-299

9. Discusión.

9.1. Análisis cualitativo.

En los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC (Figura 8) se observó primero una fracción mayoritaria hidrofílica, este comportamiento es característico de los alcaloides, por lo que asumimos que corresponde a esta clase de compuestos. Posteriormente observamos la aparición de compuestos más hidrofóbicos, los cuales podrían corresponder a bufadienólidos y bufotoxinas. Este patrón concuerda con trabajos previos realizados en *Rhinella marina* (Gao *et al*, 2010; Sciani *et al*, 2013).

La detección por RP-HPLC a 294 nm de los principales componentes se debe a que, por un lado, los alcaloides contienen un anillo de tipo indol, éste actúa como un cromóforo, permitiendo su detección en el espectro de UV a 221, 274 y 300 nm (Liu *et al*, 2007). Por otro lado los bufadienólidos tienen como cromóforo el anillo δ -lactona que brinda la característica de absorbancia en el UV de 296-299 nm.

En general, los 3 extractos metanólicos conservan las mismas 3 fracciones principales; sin embargo, se observaron diferencias en cuanto a los componentes minoritarios, en especial en el extracto metanólico correspondiente al ensayo 3. Se han reportado distintos perfiles cromatográficos en las secreciones de sapos de diferentes especies y entre individuos de la misma especie provenientes de diversas localidades geográficas, las diferencias son tanto de abundancia como de número y tipo de constituyentes (Gao *et al*, 2010).

Por espectrometría de masas, en la fracción más hidrofílica se encontraron dos iones, el más abundante corresponde a la suberoil-arginina; sin embargo, ésta carece de un cromóforo que nos permita su detección a 294 nm, por lo que no es posible detectarla por RP-HPLC (Gao *et al*, 2010). El segundo ion en abundancia corresponde a la dehidrobufotenina, principal alcaloide aislado en las glándulas parótidas de *Rhinella marina* (Märki, 1961) además, la prueba con *p*-dimetilaminobenzaldehído permitió corroborar la presencia de este compuesto.

Hasta ahora se han reportado 4 bufadienólidos presentes en secreciones de la especie *Rhinella marina*. De esta clase de compuestos, se encuentra principalmente a la marinobufagina y en menores cantidades se encuentran los bufadienólidos correspondientes a la telocinobufagina, bufalina y resibufogenina (Gao *et al*, 2010; Ferreira, 2013). En especímenes de *Rhinella marina* del continente australiano se han encontrado los 4 componentes reportados (marinobufagina, telocinobufagina, bufalina y resibufogenina) y además la presencia en menores cantidades de otros bufadienólidos como, arenobufagina, marinobufotoxina, hellebrigenina, éster de marinobufagina-3-pimeloil-L-arginina, éster de bufalina-3-pimeloil-L-arginina y bufalitoxina (Hayes *et al*, 2009; Jing *et al*, 2013). Los resultados encontrados por Hayes *et al*, 2009 pueden ser debido al sistema de disolventes utilizado para la extracción, ya que dependiendo del disolvente se pueden obtener mayor o menores cantidades de ciertos bufadienólidos y alcaloides

9.2. Aislamiento de los principales compuestos presentes en la secreción.

Para la separación de los bufadienólidos por CCF fase normal existen diversos sistemas de disolventes reportados en la literatura (Meyer y Linde, 1971), se decidió usar el sistema n-hexano/DCM/MeOH (4:5:1) (Kamano *et al*, 1999) debido a que se observó una buena separación del extracto metanólico. Este sistema permitió separar al compuesto más hidrofóbico de los 3 más abundantes, a la marinobufagina, con un alto grado de pureza para su posterior elucidación estructural.

La marinobufotoxina es la conjugación en el C-3 de la marinobufagina con la suberoil-arginina, esta conjugación tiene grupos polares (carbonilo, carboxilo, guanidino) por lo que la polaridad con la respectiva genina cambia, haciéndola más polar. La dehidrobufotenina es un alcaloide y una característica que presentan éstos es que la polaridad depende de la forma en la que se encuentren (bases o sales), siendo polares si se encuentran en forma de sales. Por RP-HPLC se observa una separación de la MBT y DHB, en base a esto se decidió utilizar el sistema de disolventes MeCN/MeOH (3:7), para la separación por placa preparativa. Esta mezcla de disolventes tuvo la polaridad necesaria

para lograr la separación de estos compuestos en placa; sin embargo, con el sistema empleado no se logró obtener la MBT con un alto grado de pureza, pero esto no impidió que se realizaran los experimentos de RMN.

9.3. RMN

Para la determinación estructural de los bufadienólidos, la resonancia magnética nuclear (RMN) es una herramienta de gran valor. Mediante esta técnica se detectaron las señales características de los carbonos correspondientes al anillo de lactona (C-20, C-21, C-22, C-23, C-24) y sus protones correspondientes (H-21, -H-22 y H-23) (Steyn y Van Heerden, 1998).

Los experimentos de HETCOR y DEPT llevados a cabo para la marinobufotoxina permitieron facilitar la asignación y correlación de señales, debido a que por el grado de pureza de la muestra, se lograron observar ciertas señales correspondientes a las impurezas en el ^{13}C y ^1H .

9.4. Letalidad de los bufadienólidos

Con un 94% de pureza para la marinobufagina (Figura 16), se realizaron las pruebas de letalidad, encontrando una DL_{50} de 51 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ por vía I.V. Esta dosis es similar a la determinada por Yoshida *et al*, 1976; en donde también se observó la misma signología en los ratones envenenados (temblores, convulsiones, espasmos).

La marinobufotoxina no se encontró completamente pura (Figura 19); sin embargo, con un 70% de pureza, se realizaron las pruebas de letalidad. Para este compuesto se aplicaron dosis más altas en ratones, pero en estas cantidades la muestra no se disolvió completamente por lo que sólo se obtuvieron valores aproximados para obtener la DL_{50} (299 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) vía I.V.

La signología observada fue muy similar a la marinobufagina, con la diferencia de que las convulsiones y los temblores se presentaron por lapsos y no fueron continuos como con la respectiva genina y los ratones tardaron más tiempo en recuperarse.

No hay información con respecto a la DL_{50} de la MBT; sin embargo, en este trabajo encontramos que la bufotoxina es menos tóxica que su respectiva genina. Este dato nos lleva a una pregunta: ¿por qué es más tóxica la genina que la bufotoxina?. Para contestar esta interrogante se deben considerar 4 factores importantes: la pureza de la muestra, la solubilidad de la muestra, la sustitución en el C-3 por la suberoil-arginina y la presencia de las diferentes isoformas de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa.

Con respecto al primer factor, la MBT presentó un grado de pureza del 70%, por lo que los contaminantes presentes en menores cantidades pueden afectar la actividad biológica de la muestra y en consecuencia se deben administrar mayores cantidades de la sustancia de interés.

En el segundo factor, la muestra, al ser administrada en mayores cantidades no presentó una muy buena disolución.

En el tercer factor, la sustitución en el C-3 con la suberoil-arginina, además de modificar la polaridad de la genina, también podría alterar la unión con el receptor. Se necesita de una disposición conformacional por parte del esteroide en donde los anillos A y D puedan interactuar directamente con el blanco (Del Valle *et al*, 2003). En el caso de la marinobufagina, la interacción con el receptor es más favorable cuando en el C-3 tenemos la presencia de un grupo hidróxilo (OH) que cuando tenemos la sustitución de un grupo voluminoso, como es el caso de la marinobufotoxina, quizá la suberoil-arginina genera pequeños cambios en el anillo A que no permiten la correcta interacción del esteroide con el receptor.

Con respecto a las diferentes isoformas de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, existen 4 isoformas de la subunidad α y 3 de la subunidad β , éstas permiten formar numerosas combinaciones de complejos $\alpha\beta$ entre los tejidos, brindando diferentes características incluyendo diferencias en la sensibilidad hacia los diferentes esteroides cardioactivos. Así, un cardenólido puede inhibir en pequeñas cantidades a la bomba presente en el cerebro pero esas cantidades no presentan inhibición en el tejido renal (Bagrov *et al*, 2009). Entonces podríamos pensar que la sustitución en el C-3 de la MBT modifica la sensibilidad

hacia el receptor que en la MBG potencia su actividad tóxica y ahora la especificidad de la bufotoxina pudiera estar dirigida hacia otro receptor que se encuentra en un tejido diferente.

10. Conclusiones

- Los perfiles cromatográficos de las extracciones metanólicas presentaron un patrón muy similar, a pesar de que las muestras analizadas provenían de diferentes estados del país.
- En todos los extractos metanólicos se identificaron 3 compuestos principales: dehidrobufotenina (alcaloide), marinobufagina (bufadienólido) y marinobufotoxina (bufotoxina).
- La presencia de la suberoil-arginina se detectó por espectrometría de masas pero no por RP-HPLC. Este compuesto se encontró en conjunto con la dehidrobufotenina y no se logró su separación por CPP.
- Por CPP se purificaron cantidades suficientes de marinobufagina y marinobufotoxina para la identificación de sus estructuras químicas mediante los experimentos de RMN; sin embargo, el primer compuesto se obtuvo con un alto grado de pureza, mientras que a pesar de que el segundo no tuvo la pureza deseada se obtuvo su estructura por RMN.
- La marinobufotoxina podría ser menos tóxica que su respectiva genina, la marinobufagina.

11. Perspectivas

- Separar a la dehidrobufotenina y la suberoil-arginina.
- Obtener mayores cantidades de secreción para la caracterización de los compuestos minoritarios.
- Realizar una extracción usando dos fases para separar los compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos y la posterior purificación por cromatografía en columna de grandes cantidades de muestra.
- Realizar los ensayos de toxicidad con otros disolventes menos tóxicos y que sean capaces de disolver las muestras a evaluar.
- Evaluación del efecto tóxico de la marinobufotoxina con un alto grado de pureza.

Tabla 9. Valores de los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C para el compuesto **3**.

C	δ ^1H ppm	δ ^{13}C ppm	
1	1.83 (<i>m</i> , H-1)	26.22 (C-1)	CH ₂
2	1.63 (<i>m</i> , H-2)	28.65 (C-2)	CH ₂
3	4.12 (<i>brq</i> , H-3)	69.15 (C-3)	CH
4	2,21 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =4.6 y 14.8 Hz; H-4)	37.84 (C-4)	CH ₂
5	-----	75.90 (C-5)	C
6	1.66 (<i>m</i> , H-6)	35.32 (C-6)	CH ₂
7	1.63(<i>m</i> , H-7)	24.14 (C-7)	CH ₂
8	1.98 (<i>m</i> , H-8)	34.23 (C-8)	CH
9	1.57 (<i>m</i> , H-9)	43.95 (C-9)	CH
10	-----	42.15 (C-10)	C
11	1.39 (<i>m</i> , H-11)	22.80 (C-11)	CH ₂
12	1.64 (<i>m</i> , H-12)	40.21 (C-12)	CH ₂
13	-----	46.29 (C-13)	C
14	-----	76.20 (C-14)	C
15	3.69 (<i>btr</i> , H-15)	61.30 (C-15)	CH
16	2,21(<i>dd</i> ; <i>J</i> =4.6 y 3.2 Hz; H-16)	33.30 (C-16)	CH ₂
17	2.57 (<i>btr</i> , <i>J</i> =7.2 Hz; H-17)	47.87 (C-17)	CH
18	0.78 (<i>s</i> ; H-18)	17.25 (C-18)	CH ₃
19	0.97 (<i>s</i> ; H-19)	17.45 (C-19)	CH ₃
20	-----	124.6 (C-20)	C
21	7.44 (<i>d</i> , <i>J</i> =2.4 Hz; H-21)	151.92 (C-21)	CH
22	7.89 (<i>dd</i> , <i>J</i> =2.4 y 9.8 Hz; H-22)	149.66 (C-22)	CH
23	6.26 (<i>d</i> , <i>J</i> =9.8 Hz; H-23)	115.52 (C-23)	CH
24	-----	164.53 (C-24)	C

Tabla 10. Valores de los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C para el compuesto **2**.

	δ ^1H ppm	δ ^{13}C ppm	
1	1.91 (<i>m</i> ; H-1)	27.57 (C-1)	CH ₂
2	1.68 (<i>m</i> ; H-2)	26.69 (C-2)	CH ₂
3	5.13 (<i>brq</i> , H-3)	72.29 (C-3)	CH
4	2.25 (<i>dd</i> , $J=7.2$ y 11.2 Hz; H-16)	37.36 (C-4)	CH ₂
5	-----	74.37 (C-5)	C
6	1.61 (<i>m</i> ; H-6)	35.55 (C-6)	CH ₂
7	1.53 (<i>m</i> ; H-7)	24.45 (C-7)	CH ₂
8	1.71 (<i>m</i> ; H-8)	34.13 (C-8)	CH
9	1.53 (<i>m</i> ; H-9)	43.66 (C-9)	CH
10	-----	40.06 (C-10)	C
11	1.36 (<i>m</i> ; H-11)	22.50 (C-11)	CH ₂
12	1.33 (<i>m</i> ; H-12)	31.30 (C-12)	CH ₂
13	-----	46.22 (C-13)	C
14	-----	75.83 (C-14)	C
15	3.34 (<i>brt</i> ; H-15)	61.38 (C-15)	CH
16	2.25 (<i>dd</i> , $J=7.2$ y 7.6 Hz; H-16)	37.36 (C-16)	CH ₂
17	2.28 (<i>brt</i> , $J=7.4$ Hz; H-17)	48.54 (C-17)	CH
18	0.78 (<i>s</i> ; H-19)	17.16 (C-18)	CH ₃
19	0.98 (<i>s</i> ; H-19)	17.31(C-19)	CH ₃
20	-----	124.61 (C-20)	C
21	7.46 (<i>d</i> , $J=1.6$ Hz; H-21)	151.92 (C-21)	CH
22	7.90 (<i>dd</i> , $J=2.4$ y 9.6 Hz; H-22)	149.68 (C-22)	CH
23	6.27 (<i>d</i> , $J=9.6$ Hz; H-23)	115.52 (C-23)	CH
24	-----	158.83 (C-24)	C
25	-----	174.77 (C-25)	C
26	2.17 (<i>t</i> , $J=7.2$ y 7.6 Hz; H-26)	38.75 (C-26)	CH ₂

27	1.58 (<i>m</i> ; H-27)	26.60 (C-27)	CH ₂
28	1.41 (<i>m</i> ; H-28)	26.94 (C-28)	CH ₂
29	1.38 (<i>m</i> ; H-29)	27.10 (C-29)	CH ₂
30	1.63 (<i>m</i> ; H-30)	26.46 (C-30)	CH ₂
31	2.17 (<i>t</i> , <i>J</i> =7.2 y 7.6 Hz; H-31)	38.75 (C-31)	CH ₂
32	-----	164.57 (C-32)	C
33	4.27 (<i>m</i> ; H-33)	55.44 (C-33)	CH
34	1.93 (<i>m</i> ; H-34)	30.50 (C-34)	CH ₂
35	1.64 (<i>m</i> ; H-35)	25.62 (C-35)	CH ₂
36	3.34 (<i>m</i> ; H-36)	42.16 (C-36)	CH ₂
37	-----	158.83 (C-37)	C
38	-----	178.93 (C-38)	C

12. Referencias bibliográficas.

- Arvizu, S. Intoxicación de perros por sapos venenosos del género Bufo: estudio recapitulativo. 1986, Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 47 págs.
- Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV. 2009. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev.* 61 (1): 9-38
- Bergillos, F; Rivas MA. 2013. Toxinología clínica. Lesiones por picaduras y mordeduras de animales. Bubok Publishing S.L. Tomo II. España. Pág. 465.
- Bhat SV, Nagasampagi BA, Sivakumar M. 2005. Chemistry of natural products. Narosa Publishing House. India. 1era edición. Pág. 106.
- Brubacher, J; Ravikumar, P; Bania, T; Heller, M; Hoffman, R. 1996. Treatment of toad venom poisoning with digoxin-specific Fab fragments. *Chest.* 110 (5): 1282-8.
- Carod, FJ. 2011. Alucinógenos en las culturas precolombinas mesoamericanas. *Neurología.* 30 (1): 42-49.
- Del Valle ML, Torres NJC, Zarco OG, Tenorio LFA, Pastelín HG. 2003. Estudio de la relación entre las características electromoleculares de los digitálicos y su acción farmacológica. *Arch Cardiol Mex* 73 (1). 11-17.
- Deulofeu, V; Duprat, E. 1944. The basic constituents of the venom of some south american toads. *J Biol Chem.* 153. 459-463.
- Dinan L, Harmatha J, Lafont R. 2001. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *Journal of Chromatography A.* 935. 105-123
- Eubig, P. 2001. Bufo species toxicosis: big toad, big problem. *Vet. Med.* 96: 594-599
- Ferreira, P; Lima, D; Debiasi, B; Soares, B; Machado, Kda; Noronha, Jda; Rodrigues, Dde; Sinhoin, A; Pessoa, C; Vieira, G. 2013. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. *Toxicon.* 72. 43-51.
- Gao, H; Zehl, M; Leitner, A; Wu, X; Wang, Z; Kopp, B. 2010. Comparison of toad venoms from different Bufo species by HPLC and LC-DAD-MS/MS. *J Ethnopharmacol.* 131 (2). 368-76.
- Harris DC. 2006. Análisis químico cuantitativo. Reverte. España. 3era edición. Págs. 608, 614
- Hayes, R; Piggott, A; Dalle, K; Capon, R. 2009. Microbial biotransformation as a source of chemical diversity in cane toad steroid toxins. *Bioorg Med Chem Lett.* 19 (6). 1790-2.

- Hyun, D; Kwon, T; Kim, K; Bae, J. 2007. Toad venom poisoning resembling digitalis intoxication and hyperkalemia: a case report. *Korean Circ J.* 37 (6).283-6.
- Jing, J; Ren, W; Li, C; Bose, U; Parekh, H; Wei, M. 2007. Rapid identification of primary constituents in parotoid gland secretions of the Australian cane toad using HPLC/MS-Q-TOF. *Biomed Chromatorgr.* 27 (6). 685-7.
- Kamano, Y; Nogawa, T; Kotake, A; Tozawa, M; Pettit, G. 1999. Separation of toad poison bufadienolides by hydrophobic gel. *J. liq. Chrom. & Rel technol.* 22 (16). 2455-65.
- Lamarque A. 2008. Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica. Brujas. Argentina. 1era edición. Págs. 51, 57-58.
- Liu, R; Luo, H; Li, Y; Yang, M; Li, H; Shen Y; Zhang, C; Su J; Zhang, W. 2007. Three new alkaloids from the traditional chinese medicine Chansu. *Helv Chim Acta.* 90 (12). 2427-31.
- Liu, Y; Xiao, Y; Xue, X; Zhang, X; Liang, X. 2010. Systematic screening and characterization of novel bufadienolides from toad skin using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 24 (5). 667-78.
- Lyttle T. 1993. Misuse and legend in the “toad Licking” phenomenon. *Int J Addict.* 28 (6). 521-38.
- Märki, F; Robertson, A; Witkop, B. 1961. Dehydrobufotenine, a novel type of tricyclic serotonin metabolite from *Bufo marinus*. *J Am Chem Soc.* 83 (15). 3341-2.
- Meyer K y Linde H. 1971. Collection of toad venoms and chemistry of the toad venom steroids. En *Venomous animals and their venoms 2*. Bücherl W y Buckley E. Academic Press. Nueva York.
- Morrison RT y Boyd RN. 1998. Química Orgánica. Pearson Educación. 5ta edición. E.U.A. Pág 568.
- Nakanishi, K; Goto, T; Ito, S. 1975. Natural Products Chemistry. Kodansha LTD. Japón. Vol 1, cap 6. P-469.
- Oliver, L; Woolrich, G; Lemos, J. 2009. La familia Bufonidae en México. México. Págs. 1,12, 101, 103-104.
- Palumbo, N; Perri, S; Read, G. 1975. Experimental induction and treatment of toad poisoning in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 167 (11). 1000-5.
- Reeves, M. 2004. A retrospective report of 90 dogs with suspected cane toad (*Bufo marinus*) toxicity. *Aust Vet J.* 82 (10). 608-11.
- Roberts, B; Aronsohn, M; Moses, B; Burk, R; Toll, J; Weeren F. 2000. *Bufo marinus* intoxication in dogs: 94 cases (1997-1998). *JAVMA.* 216 (12). 1941-4.

Sciani JM; Angeli CB; Antoniazzi MM; Jared C; Pimenta DC. 2013. Differences and similarities among parotoid macrogland secretions in South American toads: a preliminary biochemical delineation. *Scient World J.* 2013(2013):1–9. doi:10.1155/2013/937407.

Steyn, P; Van Heerden F. 1998. Bufadienolides of plant and animal origin. *Nat Prod Rep.* 15. 397-413.

Theakston, R; Reid, H. 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull World Health Organ.* 61 (6). 949-956.

Thillaivinayagalingam, P; Newcombe, A; O'Donovan, K; Francis, R; Keshavarz-Moore, E. 2007. Detection and quantification of affinity ligand leaching and specific antibody fragment concentration within chromatographic fractions using surface plasmon resonance. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 48. 179–88.

Toledo, R; Jared, C. 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp Biochem Physiol.* 111 (1). 1-29.

Ye, M; Guo, D. 2005. Analysis of bufadienolides in the Chinese drug ChanSu by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 19 (13). 1881-92.

Yoshida S. Kamano Y. Sakai T. 1976. Studies on the surface anesthetic activity of bufadienolides isolated from ch'an su. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 24 (8). 1714-7.