

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN PARA LA SALUD EN AMÉRICA LATINA (CISeAL)

**LABORATORIO DE INVESTIGACIONES DE CITOGÉNÉTICA Y BIOMOLÉCULAS
DE ANFIBIOS (LICBA).**

Título de disertación:

Separación y caracterización de alcaloides producidos en la piel de dendrobátidos ecuatorianos de las especies *Epipedobates darwinwallacei* y *Epipedobates anthonyi*, mediante técnicas espectroscópicas y cromatográficas.

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Químicas
con mención en Química Analítica**

Nombre del estudiante: Alex Nicolay Torres Campaña

Quito, 2019

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica, del Sr. Alex Nicolay Torres Campaña ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

MSc. Eva Isabel Cipriani Ávila
Directora de la disertación
Quito 12, de febrero del 2019.

A mis Padres y Hermanos, con quienes compartir la vida siempre será la mayor aventura.

Cuando el tiempo llegue, prefiero estar a su lado.

AGRADECIMIENTOS

A ti por ser el ángel más bello de mi vida, mi bendición y fuerza, te agradeceré toda la vida Mamá. Eres indudablemente la razón por la cual puedo ser diferente y a quien dedico con mayor emoción este logro. Jamás podré olvidar el primer día de este arduo camino, ese beso y abrazo que llevaré conmigo por siempre.

A ti Papá, por jamás resignarte a las adversidades de la vida, por ser quien siempre cede, te agradezco infinitamente. Todo tu esfuerzo por permitirme llegar hasta aquí, solo puedo agradecerlo y devolverlo de esta manera. Espero algún día convertirme en tan solo un poco del buen hombre que eres.

A ustedes Hermanos, Sebastián, Isabel, Pablo y Gabriel, por ser mis mejores amigos, a quienes les debo mis mayores alegrías y con quienes siempre puedo contar, les agradezco por siempre haber iluminado mi camino y ser el refugio en mis peores momentos.

A ti Samantha, que con tus ojos llenos de bondad y amor siempre puedes ver algo especial en mí, te quiero agradecer por crecer de mi mano y soñar en que podemos alcanzarlo todo. De igual manera agradecer a tu familia, quienes siempre supieron recibirme con los brazos abiertos.

A mis compañeros de aula y amigos, David, Denisse, Dominique, Andrea y Nicole, por todo su apoyo día a día, en todo momento, clase por clase. Seguramente la vida nos reunirá nuevamente.

A mis profesores Pablo Pozo, Eliza Jara y Cristina Mena por compartir conmigo su pasión por la química, y en especial a mi directora Isabel Cipriani, quien me brindo además de su tutoría y conocimiento, su amistad.

A Miryan Rivera y al Centro de Investigaciones de Enfermedades Infecciosas de América Latina (CISeAL), y al Laboratorio de Investigaciones de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA), mi más profundo agradecimiento por brindarme todas las facilidades para llevar a cabo el desarrollo del presente trabajo de disertación.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 ANFIBIOS.....	13
1.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS ANFIBIOS.....	14
1.1.2 LA PIEL DE LOS ANFIBIOS.....	15
1.1.3 DEFENSA QUÍMICA.....	16
1.2 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	19
1.2.1 OBJETIVO GENERAL	19
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1 REVISIÓN PREVIA DE PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.....	21
2.1.1 PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN	21
2.1.2 PROTOCOLOS DE ANÁLISIS.....	22
2.1.3 COLECCIÓN, EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS... 22	
2.2 RE ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS PUROS, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A UN DETECTOR DE MASAS (GC- MS).....	23

2.3 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE SEPARACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON UN DETECTOR UV-VISIBLE	23
2.4 ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES SEPARADAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A UN DETECTOR DE MASAS.	26
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
3.1 RE ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS PUROS, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A UN DETECTOR DE MASAS (GC-MS).....	27
3.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE SEPARACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON UN DETECTOR UV-VISIBLE	35
4. CONCLUSIONES	37
5. RECOMENDACIONES	39
6. BIBLIOGRAFÍA	41
7. FIGURAS	44
8. TABLAS	47
9. ANEXOS	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A1) 44
- Figura 2. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2) 44
- Figura 3. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3) 45
- Figura 4. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A4) 45
- Figura 5. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS, a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S) .. 46
- Figura 6. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS, a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates boulengeri* (muestra B1) 46
- Figura 7. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS, a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates boulengeri* (muestra B2) 47
- Figura 8. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS, a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates tricolor* (muestra T1) 47
- Figura 9. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS, a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates tricolor* (muestra T2) 48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Alcaloides lipofílicos más comunes en la piel de dendrobátidos	47
Tabla 2. Codificación de muestras colectadas por Cipriani, 2006.	49
Tabla 3. Instrumentación y condiciones cromatográficas utilizadas por Cipriani, en el 2006, para el análisis de alcaloides lipofílicos provenientes de la piel de dendrobátidos, mediante GC-MS.....	53
Tabla 4. Instrumentación y condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de alcaloides lipofílicos provenientes de la piel de dendrobátidos, mediante GC-MS....	53
Tabla 5. Instrumentación y condiciones cromatográficas utilizadas para la separación de alcaloides lipofílicos provenientes de la piel de dendrobátidos, mediante HPLC.	54
Tabla 6. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A1), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)	55
Tabla 7. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A2), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)	56
Tabla 8. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)	57
Tabla 9. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A4), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)	58

Tabla 10. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS).....	59
Tabla 11. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie <i>Epipedobates boulengeri</i> (muestra B1), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)	60
Tabla 12. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie <i>Epipedobates boulengeri</i> (muestra B2), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)	61
Tabla 13. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie <i>Epipedobates tricolor</i> (muestra T1), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)	62
Tabla 14. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie <i>Epipedobates tricolor</i> (muestra T2), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)	64
Tabla 15. Propiedades físicas de alcaloides lipofílicos de configuración absoluta muestras <i>Epipedobates anthonyi</i> y <i>darwinwallacei</i>	64

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de masas de 1,4-Quinolizidina con un tiempo de retención de 28.119 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A1).....	71
Anexo 2. Espectro de masas de 5,6,8-Indolizidina (277E), con un tiempo de retención de 28.616 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A1).	72
Anexo 3. Espectro de masas de 5,6,8-Decahidroquinolina (223Q) Cis, con un tiempo de retención de 20.595 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A1).....	72
Anexo 4. Espectro de masas de 5,8-Indolizidina (209B), con un tiempo de retención de 28.264 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A1).	72
Anexo 5. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 28.824 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A1).....	72
Anexo 6. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 28.958 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A1).....	72
Anexo 7. Espectro de masas de Indolizidina (231C), con un tiempo de retención de 27.880 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A1).....	72

Anexo 8. Espectro de masas de Alopumiliotoxina (341A), con un tiempo de retención de 40.233 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A1).	72
Anexo 9. Espectro de masas de Decahidroquinolina (195A), con un tiempo de retención de 21.155 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A1).....	72
Anexo 10. Espectro de masas de 3,5 Pirrolizidina (223H), con un tiempo de retención de 29.238 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A2).	72
Anexo 11. Espectro de masas de 3,5 Indolizidina (223J), con un tiempo de retención de 27.186 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A2).	72
Anexo 12. Espectro de masas de 3,5 Octahydrohistrionicotoxina (291A), con un tiempo de retención de 37.788 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A2).	72
Anexo 13. Espectro de masas de Alopumiliotoxina (323B), con un tiempo de retención de 41.405 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A2).	72
Anexo 14. Espectro de masas de Decahidroquinolina (275B), con un tiempo de retención de 35.435 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A2).....	72
Anexo 15. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (249), con un tiempo de retención de 28.710min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A2).....	72

Anexo 16. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 28.948min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A2).....	72
Anexo 17. Espectro de masas de Pumiliotoxina A, con un tiempo de retención de 37.995min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A2).	72
Anexo 18. Espectro de masas de Pumiliotoxina B, con un tiempo de retención de 41.715min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A2).	72
Anexo 19. Espectro de masas de Pumiliotoxina (251D), con un tiempo de retención de 28,378min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A2).	72
Anexo 20. Espectro de masas de Pumiliotoxina (277B), con un tiempo de retención de 36.057 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A2).	72
Anexo 21. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (275C), con un tiempo de retención de 31.549 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).	72
Anexo 22. Espectro de masas de 3,5-Pirrolizidina (223H) Cis, con un tiempo de retención de 24.243 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).....	72
Anexo 23. Espectro de masas de 3,5-Pirrolizidina (223H) Cis, con un tiempo de retención de 29.238 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).....	72

Anexo 24. Espectro de masas de 3,5-Pirrolizidina (239K) Cis, con un tiempo de retención de 31.135 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).....	72
Anexo 25. Espectro de masas de 3,5-Pirrolizidina (239K) Cis, con un tiempo de retención de 29.373 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).....	72
Anexo 26. Espectro de masas de 5,8-Indolizidina (219F), con un tiempo de retención de 25.373 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).	72
Anexo 27. Espectro de masas de 5,8-Indolizidina (223), con un tiempo de retención de 27.186 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).	72
Anexo 28. Espectro de masas de 7-cloro, 4-metil-quinolina, con un tiempo de retención de 24.616 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).....	72
Anexo 29. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (221), con un tiempo de retención de 22.264 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).....	72
Anexo 30. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (249), con un tiempo de retención de 28.710 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).....	72
Anexo 31. Espectro de masas de Epibatidina, con un tiempo de retención de 29.870 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).	72

Anexo 32. Espectro de masas de Pumiliotoxina (251D), con un tiempo de retención de 28.378 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).	72
Anexo 33. Espectro de masas de Pumiliotoxina A, con un tiempo de retención de 38.441 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).....	72
Anexo 34. Espectro de masas de Pumiliotoxina B, con un tiempo de retención de 41.715 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).....	72
Anexo 35. Espectro de masas de Tricíclico (205B), con un tiempo de retención de 21.828 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A3).....	72
Anexo 36. Espectro de masas de 5,6,8-Indolizidina (231B), con un tiempo de retención de 25.932min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A4).	72
Anexo 37. Espectro de masas de Alopumiliotoxina (341A), con un tiempo de retención de 40.233 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A4).	72
Anexo 38. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (235V), con un tiempo de retención de 24.357 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A4).....	72
Anexo 39. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 25.507 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A4).....	72

Anexo 40. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 27.290 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A4).....	72
Anexo 41. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 28.948 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A4).....	72
Anexo 42. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 26.585 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A4).....	72
Anexo 43. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 22.264 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A4).....	72
Anexo 44. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 28.699 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A4).....	72
Anexo 45. Espectro de masas de Tricíclico (193C), con un tiempo de retención de 22.523 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates anthonyi</i> (muestra A4).....	72
Anexo 46. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (223AB), con un tiempo de retención de 23.570 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72
Anexo 47. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (195B), con un tiempo de retención de 18.419 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72

Anexo 48. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (223AB), con un tiempo de retención de 23.145 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72
Anexo 49. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (239Q), con un tiempo de retención de 27.850 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72
Anexo 50. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (223AB), con un tiempo de retención de 22.834 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72
Anexo 51. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (223AB), con un tiempo de retención de 22.855 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72
Anexo 52. Espectro de masas de 3,5,8-Indolizidina (239), con un tiempo de retención de 28.192 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72
Anexo 53. Espectro de masas de 3,5,8-Indolizidina (239), con un tiempo de retención de 28.461 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72
Anexo 54. Espectro de masas de 4,6-Quinolizidina (195C), con un tiempo de retención de 19.891 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72
Anexo 55. Espectro de masas de 4,6-Quinolizidina (195C), con un tiempo de retención de 20.595 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72

Anexo 56. Espectro de masas de 4,6-Quinolizidina (195C), con un tiempo de retención de 25.093 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72
Anexo 57. Espectro de masas de 5,8-Indolizidina (203A), con un tiempo de retención de 22.751 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72
Anexo 58. Espectro de masas de 5,8-Indolizidina (217B), con un tiempo de retención de 25.632 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72
Anexo 59. Espectro de masas de 5,8-Indolizidina (217B), con un tiempo de retención de 25.891 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72
Anexo 60. Espectro de masas de Octahydrohistrionicotoxina (291A), con un tiempo de retención de 37.788 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).	72
Anexo 61. Espectro de masas de Alopumiliotoxina (323B), con un tiempo de retención de 41.394 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).....	72
Anexo 62. Espectro de masas de Decahidroquinolina (195A), con un tiempo de retención de 21.155 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).	72
Anexo 63. Espectro de masas de Decahidroquinolina (195A), con un tiempo de retención de 22.772 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).	72

Anexo 64. Espectro de masas de Decahidroquinolina (223F), con un tiempo de retención de 25.466 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).	72
Anexo 65. Espectro de masas de Decahidroquinolina (211A), con un tiempo de retención de 26.969 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).	72
Anexo 66. Espectro de masas de Decahidroquinolina (223F), con un tiempo de retención de 27.124 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).	72
Anexo 67. Espectro de masas de Tricíclico (195C), con un tiempo de retención de 22.513 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).	72
Anexo 68. Espectro de masas de Pumiliotoxina B, con un tiempo de retención de 41.716 min, obtenido con ranas de la especie <i>Epipedobates darwinwallacei</i> (muestra S).	72

RESUMEN

Después de 50 años de investigaciones y más de 700 artículos publicados, el legado de John Daly lo procede aún después de su muerte en el 2008. Sus investigaciones sobre sustancias secretadas a través de la piel de dendrobátidos, son de gran interés en la comunidad científica para el tratamiento y atenuación del dolor provocado por enfermedades irreversibles y degenerativas en los seres humanos. Entre las especies analizadas de dendrobátidos, se encuentran distintas especies de ranas ecuatorianas, que se caracterizan primordialmente, por su pequeño tamaño y los colores llamativos de su piel, los mismos que son atribuidos a alcaloides lipofílicos bio-acumulados, secuestrados a partir de su dieta. El presente trabajo de disertación tuvo como objetivo separar y caracterizar los alcaloides lipofílicos generados en la piel de ranas ecuatorianas, de las especies *Epipedobates anthonyi* y *Epipedobates darwinwallacei*, a partir del análisis de su extracto metanólico puro, mediante las técnicas analíticas de cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En la especie *Epipedobates anthonyi*, muestra A1, se identificaron siete tipos de alcaloides lipofílicos, reportados como: 1,4-quinolizidina, indolizidina, 5,8-indolizidina, 5,6,8-indolizidina, alopumiliotoxina, deoxypumiliotoxina y decahidroquinolina. Mientras tanto, en el extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates darwinwallacei*, muestra S, se identificaron catorce tipos de alcaloides lipofílicos, reportados como: 1-metil, 2-(5 hexenil), 5-(8 nonenil)-pirrolidina, 1,4-quinolizidina, 2-(4 pentenil), 6-pentil-piperidina, 2,6-dibutil, 4-metil-piperidina, 3,5-indolizidina, 3,5,8-indolizidina, 4,6-quinolizidina, 5,8-indolizidina, octahydrohistrionicotoxina, octahydroquinolina, alopumiliotoxina, decahidroquinolina, pumiliotoxina B y tricíclico. El presente trabajo buscaba establecer un protocolo para la separación y purificación de los alcaloides presentes en las especies de estudio. Luego de realizar el fraccionamiento de cada uno de los extractos metanólicos por HPLC y el re-análisis de estas fracciones por GC-MS, no se logró identificar ninguno de los alcaloides lipofílicos esperados; la causa probable es la baja concentración de los alcaloides.

Palabras Claves: Alcaloides, Dendrobátidos, GC/MS, HPLC, Piel.

ABSTRACT

After 50 years of research and more of 700 articles published, the legacy of John Daly still remains even though his death in 2008. His research on substances secreted through the skin of dendrobatids, are of great interest to the scientific community for the treatment and attenuation of pain caused by irreversible and degenerative diseases in humans. Among the analyzed species of dendrobatids, there are different species of Ecuadorian frogs, which are characterized primarily by their small size and very colorful skin which are attributed to bio-accumulated lipophilic alkaloids, sequestered from their diet. The purpose of this dissertation work was to separate and characterize the lipophilic alkaloids bio-accumulated in the skin of Ecuadorian frogs. The species studied were *Epipedobates anthonyi* and *Epipedobates darwinwallacei*, starting by the pure methanolic extract analysis, through analytical techniques of gas chromatography coupled to a mass detector (GC-MS), High performance liquid chromatography (HPLC). In the species of *Epipedobates anthonyi*, sample A1, there were identified seven types of lipophilic alkaloids reported as: 1,4-quinolizidine, indolizidine, 5,8-indolizidine, 5,6,8-indolizidine, alopumiliotoxin, deoxy-pumiliotoxin and decahydroquinoline. Meanwhile, in the pure methanolic extract of the species *Epipedobates darwinwallacei* in sample S fourteen types of lipophilic alkaloids were identified as: 1-methyl, 2-(5 hexenyl), 5-(8 nonenyl)-pyrrolidine, 1,4-quinolizidine, 2-(4 pentenyl), 6-pentyl-piperidine, 2,6-dibutyl, 4-methyl-piperidine, 3,5-indolizidine, 3,5,8-indolizidine, 4,6-quinolizidine, 5,8-indolizidine, octahydrohistrionicotoxin, octahydroquinoline, alopumiliotoxin, decahydroquinoline, pumiliotoxin B and tricyclic. This present study sought to establish a protocol for the separation and purification of alkaloids present in the species analyzed. After the fragmentation of each of the methanol extracts by HPLC and the re-analysis of these fractions by GC-MS, it was not able to identify none of expected lipophilic alkaloids; the probable cause was due to the low concentrations of alkaloids.

Key Words: Alkaloids, Dendrobatids, HPLC, GC/MS, Skin

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANFIBIOS

El nombre de la clase Amphibia (proveniente de las raíces griegas *amphi*, que significa “ambas”, y *bios*, que significa “vida”) hace referencia a las dos fases de la vida, acuática y terrestre, que caracterizan al ciclo de vida de la mayoría de estas especies. Se estima que los primeros anfibios aparecieron en la tierra en el Devónico, hace unos 400 a 370 millones de años. Durante los siguientes 150 millones de años, hasta principios del Mesozoico, ocurrió una gran diversificación que dio origen a una enorme variedad de especies, pero la mayoría de ellos se extinguieron. De las pocas que sobrevivieron descendieron los anfibios modernos, los *Lissamphibia* (de *liss* “suave”, en alusión a la pérdida de escamas presentes en peces y anfibios extintos), con un poco más de 7500 especies conocidas hasta la actualidad. Se dividen en tres grandes grupos: las cecilias o ciegas (Orden *Gymnophiona*), las salamandras y tritones (Orden *Caudata*) y, los más conocidos y numerosos, las ranas y los sapos (Orden *Anura*) (Señaris, Ariesteguieta, Rojas, Rojas-Runjaic, 2018).

Los anfibios están presentes en todos los continentes, a excepción de la Antártida, desde el gélido Ártico hasta el inhóspito desierto de Atacama en Chile, y desde el nivel del mar hasta las cumbres del Himalaya a 5000 metros de elevación. Sin embargo, la mayor riqueza se encuentra en la franja tropical, especialmente en Sudamérica. Aquí, habitan un tercio de todos los anfibios del planeta, algo más de 2700 especies, en bosques cálidos y húmedos que ofrecen agua y, además, temperaturas óptimas para el desarrollo de todas las fases del ciclo de su vida (Señaris et al., 2018). Los anfibios cumplen roles importantes para el funcionamiento de los ecosistemas, pues como consumidores y presas, son un eslabón intermedio en la cadena de flujo de energía y nutrientes. A su vez, contribuyen con el bienestar del ser humano, ya que al producir sustancias con propiedades analgésicas, antibióticas, anticancerígenas, antiinflamatorias, insulino-trópicas, entre otras características, han

sido una especie sujeta a intensas investigaciones para el posible desarrollo de fármacos (Museo de Zoología PUCE, 2018). En el Laboratorio de Investigaciones de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, se han realizado varias investigaciones relacionadas a las propiedades de las sustancias secretadas a través de la piel de los anfibios, como el estudio de la resistencia a antimicrobianos en bacterias entéricas productoras de carbapenemasas, siendo inhibidas con secreciones peptídicas de *Atelopus elegans* (Cilveti, Rivera, Rodríguez, Alcocer. 2013), la identificación de secreciones peptídicas de 15 especies de anuros amazónicos con actividad antimicrobiana y anticancerígena (Vallejo, 2016), la evaluación de la actividad anticancerígena del extracto peptídico crudo de *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae) en células leucémicas (Po Hao, 2012), las pruebas antimicrobianas de secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae) en cinco especies de levaduras patógenas del género *Candida* (Vargas, 2012), entre otros.

El Ecuador alberga la cuarta anfibio-fauna más numerosa a nivel mundial, con un total de 602 especies descritas hasta la actualidad, siendo sólo superado por Brasil, Colombia y Perú. Si únicamente se considera la cantidad de especies por unidad de área, Ecuador es la región del planeta con la concentración más variada del orden Anura (ranas y sapos) con una variedad de 2440 especímenes por cada millón de kilómetros cuadrados (Museo de Zoología PUCE, 2018).

1.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS ANFIBIOS.

Los renacuajos de los anfibios son omnívoros que raspan las algas y otros materiales vegetales que se encuentren en el agua utilizando unos pequeños dentículos de sus aparatos bucales o filtran organismos microscópicos. Cuando son adultos, los anfibios se alimentan de invertebrados (artrópodos, insectos, gusanos, lombrices y crustáceos), aunque unas pocas especies también pueden consumir

pequeños vertebrados como serpientes, tortugas pájaros, ratones murciélagos y otras ranas (Señaris et al., 2018). Los anfibios han desarrollado estrategias para protegerse de los depredadores. Su primera defensa es, por lo general, permanecer inmóviles y pasar desapercibidos. Por ello, muchos tienen una coloración de camuflaje que los confunde con el sustrato y los hace pasar inadvertidos ante sus depredadores. Los sapos comunes y algunas otras especies simplemente se inflan de aire ante una amenaza, aumentando considerablemente el volumen de su cuerpo y aparentando ser más grandes. En algunas ranas, la presencia de sustancias tóxicas en la piel les permite disuadir a sus depredadores. Estas sustancias pueden estar asociadas a colores llamativos o aposemáticos que advierten a los depredadores de su peligrosidad (Señaris et al., 2018).

1.1.2 LA PIEL DE LOS ANFIBIOS.

El tegumento de los anfibios es uno de sus sistemas orgánicos más importantes, que se constituye principalmente por una capa dérmica y una epidérmica. Es un órgano respiratorio, sensorial, que resulta vital en el proceso de homeostasis hídrica y termorreguladora, además de permitir el reconocimiento de sexos y la reproducción de su especie (O'Malley, 2007). Los anfibios presentan dos tipos de glándulas en la piel: las mucosas y las granulares (venenosas). Las glándulas mucosas se extienden por toda la piel y segregan, continuamente, mucopolisacáridos lo que permite mantener su piel húmeda. En contraste, las glándulas venenosas están agregadas y su toxicidad varía desde tener un efecto irritante hasta llegar a ser letales para sus depredadores. Mientras unas especies están caracterizadas por presentar glándulas parótidas ubicadas dorsalmente, detrás de sus ojos, otras pueden tener glándulas en el mentón o en la región inguinal, pero en estos casos están asociadas a la reproducción o su función no es del todo conocida (Señaris et al., 2018). Se cree que las glándulas venenosas evolucionaron a partir de las mucosas como un mecanismo de defensa activado mediante estímulos nerviosos o humorales, que segregan alcaloides esteroideos que son letales para su predador (Field, 2011).

1.1.3 DEFENSA QUÍMICA

La defensa química de los organismos vivos, es una respuesta biológica a la constante amenaza a su especie. Este tipo de defensa se puede evidenciar en los genes de los organismos vivos en un rango que alberga desde organismos protistas hasta plantas, insectos e invertebrados. Puede ser desarrollada por tres posibles vías; la biosíntesis de químicos, el albergue de simbiontes tóxicos o el secuestro de tóxicos a partir de su entorno natural (Tarvin et al., 2016).

Estos organismos a menudo tienen una historia evolutiva complicada, en la que la adquisición de estas toxinas fue el resultado de procesos aleatorios en los que adaptaciones morfológicas o fisiológicas eran necesarias. El mecanismo por el cual un organismo evita la auto intoxicación, es una muestra de este proceso, en donde, a consecuencia de la constante exposición a la toxina, el espécimen desarrolla mecanismos de defensa y de inhibición. Tres mecanismos amplios subyacen a la resistencia química. La compartimentación, en donde, se alberga la toxina en una glándula especializada, la desintoxicación metabólica, como ejemplo el aumento de la expresión de enzimas, y la insensibilidad al sitio objetivo, en donde, se altera la capacidad de unión de la toxina (Tarvin et al., 2016).

La defensa química de alcaloides es especialmente interesante ya que tiene una compleja relación entre la especiación dietética, el secuestro alcaloideo, su bioacumulación y la auto resistencia a sus efectos (Tarvin et al., 2016). Una muestra de este tipo de defensa se puede evidenciar en las especies *Epipedobates anthonyi* y *Epipedobates darwinwallacei*, anuros pertenecientes a la familia de los Dendrobátidos, quienes proporcionan un marco para la investigación de la presencia de alcaloides en su piel.

La familia Dendrobatidae está constituida por un grupo de ranas originarias de Centroamérica y Sudamérica que viven en ecosistemas muy diversos tales como bosques nubosos, selvas tropicales de tierras bajas, y bosques andinos xerofíticos. Se

caracterizan principalmente por su coloración aposemática y por su tamaño que oscila entre 1 a 6 cm de longitud en función a sus edades y a la especie a la que pertenezcan. Su piel se caracteriza por contener una amplia gama de sustancias potencialmente mortales en baja concentración, que son secretadas por las glándulas cutáneas granulares. Estas sustancias, identificadas como alcaloides, cumplen con la función de protección frente a depredadores e infecciones bacterianas o protozoarias (Señaris et al., 2018).

Se ha descubierto más de 800 alcaloides liposolubles biológicamente activos en la piel de la familia de los dendrobátidos, identificados en varios linajes de ranas venenosas en todo el mundo (Daly, Spande, Garraffo, 2005). En un inicio se pensaba que el origen de estos alcaloides era el resultado de una biosíntesis, sin embargo, las distintas investigaciones realizadas por el grupo de investigación del National Institute of Health (NIH) de Estados Unidos, liderado por el bioquímico y farmacéutico John Daly, mostraron que la mayoría de estos alcaloides eran secuestrados sin cambios desde la dieta de artrópodos (hormigas, cien pies y escarabajos) (Saporito, Spande, Garraffo, Donnelly, 2009).

Entre los alcaloides identificados se encuentran las batracotoxinas, histrionicotoxinas, geofirotoxinas, y epabitidina de ranas venenosas neotropicales (Dendrobatidae), pumiliotoxinas, alopumiliotoxinas, homopumiliotoxinas y decahidroquinolinas de ciertos géneros de anuros de cuatro familias (Dendrobatidae, Mantellidae, Bufonidae y Miobatrachidae), una variedad de izidinas (pirrolizidinas, indolizidinas, quinolizidinas, lehmizidinas), pirrolidinas, piperidinas, diversos tricíclicos (relacionados en estructuras con las coccinelinas) y espiropirrolizidinas de las tres primeras de estas cuatro familias, las pseudophrynamies de un género de ranas australianas, y una variedad de alcaloides no clasificados aun de estructura indeterminada (Daly et al., 2005). La estructura química y las propiedades de los alcaloides lipofílicos encontrados con mayor frecuencia en la piel de los dendrobátidos, son presentadas en la Tabla 1.

El Ecuador a pesar de poseer una amplia riqueza natural, tiene contadas investigaciones relacionadas a la determinación de alcaloides en pieles de dendrobátidos. Estos estudios podrían generar conocimientos sustanciales para el desarrollo de muchos sectores económicos y la probabilidad de ser reconocidos como una potencia científica al divulgar y promover conocimiento. Daly y su grupo de investigadores focalizaron sus estudios en las especies de dendrobátidos neotropicales, incluyendo especies ubicadas en nuestro país. Sus publicaciones y desarrollo de metodologías son, hasta la actualidad, la guía más completa para la identificación de alcaloides lipofílicos.

En un estudio realizado en el país por Cipriani (2006), se realiza un procedimiento de extracción de los alcaloides presentes en la piel de cuatro especies de ranas de la familia de dendrobátidos mediante un proceso de maceración con metanol y una partición ácido-base. El análisis de las muestras purificadas se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS). Como resultado se lograron identificar 25 clases alcaloides y se clasificó alrededor de 40 en base a reportes bibliográficos. De igual manera, se detectaron cinco posibles nuevos alcaloides no descritos previamente.

La finalidad del presente estudio es continuar con la investigación realizada por Cipriani en el 2006, con la finalidad de separar y caracterizar los alcaloides que previamente fueron reportados en este estudio, mediante las técnicas analíticas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier y Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR) y cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS), técnicas que permitirán obtener una estructura tentativa de estos alcaloides.

1.2 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

Separar y caracterizar los alcaloides producidos en la piel de dendrobátidos ecuatorianos de las especies *Epipedobates anthonyi* y *Epipedobates darwinwallacei*, a partir de su extracto metanólico puro, mediante técnicas espectroscópicas y cromatográficas.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el estado de los extractos metanólicos puros, conservados desde el 2006, de los alcaloides lipofílicos generados a partir de la piel de las especies *Epipedobates anthonyi* y *Epipedobates darwinwallacei*, mediante la técnica analítica de cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS).

Separar los alcaloides presentes en los extractos metanólicos puros de los alcaloides lipofílicos generados a partir de la piel de las especies *Epipedobates anthonyi* y *Epipedobates darwinwallacei*, mediante la técnica analítica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Caracterizar los alcaloides lipofílicos separados mediante las técnicas analíticas: espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier acoplada a un accesorio de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR) y cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas (GC-MS).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo experimental del presente trabajo se divide en varias etapas: la revisión previa de protocolos experimentales para la colección, extracción, purificación y análisis de los alcaloides lipofílicos; el análisis de los resultados del trabajo desarrollado por Cipriani, en el 2006, de las especies *Epipedobates anthonyi*, *darwinwallacei*, *boulengeri* y *tricolor*; el re-análisis mediante GC-MS de todos los extractos metanólicos obtenidos en el trabajo de Cipriani, en el 2006. La optimización del método de separación de alcaloides mediante HPLC usando el extracto de *Epipedobates tricolor* (muestras T1), la aplicación del protocolo desarrollado para la separación de los alcaloides de las especies en estudio: *Epipedobates anthonyi*, *darwinwallacei*, (muestras A1 y S) y finalmente el análisis de las fracciones separadas mediante GC-MS.

El volumen de los extractos metanólicos de cada especie era aproximadamente de 1 mL. La optimización del método de separación de alcaloides mediante HPLC, y los análisis primarios por GC-MS, se los realiza utilizando el extracto de la especie *Epipedobates tricolor*, muestra T1, en el que Cipriani no identificó una significativa variedad de alcaloides. Se debe indicar que no fue posible realizar el análisis mediante FTIR-ATR, en razón a que en el análisis final mediante GC-MS, de las fracciones previamente separadas por HPLC y concentradas a sequedad, no se pudo identificar ningún tipo de alcaloide encontrado en el análisis inicial por GC-MS.

2.1 REVISIÓN PREVIA DE PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

2.1.1 PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

El método de referencia para la extracción de alcaloides en la piel de los dendrobátidos, es el desarrollado por Daly y Myers tras años de investigaciones. Este protocolo consiste en hacer una incisión en el vientre de la rana y suavemente retirar su piel. Es importante recalcar que para conservar a plenitud los alcaloides lipofílicos, se recomienda inducir a la muerte por asfixia o retirar la piel de la especie sin ser sacrificada. Cada muestra debe ser conservada en metanol, en una proporción de dos o más partes de metanol por cada parte de piel, a una temperatura de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las pieles deben ser cortadas en pequeños pedazos y maceradas por dos a tres veces con porciones separadas de metanol (1 parte de piel, 4-20 partes de metanol). Los extractos de metanol son diluidos con un volumen igual de agua. En algunos casos para muestras de pieles largas, los extractos de metanol son primero concentrados a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ al vacío. Los extractos acuosos son extraídos tres o cuatro veces con 1 mL de volumen de cloroformo. Estas mezclas son secadas sobre sulfato de sodio y concentradas a un volumen menor (1-10 mL) y se restaura el volumen original con n-hexano. El n-hexano contiene una cantidad de cloroformo, por lo que se extrae nuevamente por tres ocasiones con la mitad de volumen de ácido clorhídrico 0.1N (Daly et al., 1992).

Las fracciones combinadas de ácido clorhídrico 0.1 N son ajustadas a pH 9 con hidróxido de amonio 1N, seguido de una re-extracción en tres ocasiones con cloroformo, secado nuevamente sobre sulfato de sodio y evaporado a sequedad a 30°C al vacío. Varios de los alcaloides extraídos son altamente volátiles por lo cual el proceso de evaporación y concentración debe realizarse con mucho cuidado.

El residuo alcaloideo debe ser disuelto en metanol tal que 100 μL corresponde a 100 mg del peso original de la piel, y son conservadas con viales de vidrio con tapa

de teflón en congelamiento. Estas fracciones contienen principalmente alcaloides, pero también contaminantes como ésteres metílicos de grasa, esteroides, ftalatos, todos a niveles de trazas (Daly et al., 1992; Daly et al., 2005; Fitch et al., 2003; Cipriani, 2006; Saporito et al., 2009; Erazo, Ruano, López, 2016).

2.1.2 PROTOCOLOS DE ANÁLISIS.

Las distintas investigaciones realizadas sobre alcaloides en la piel de los anfibios, han sido desarrolladas y diseñadas para poder fácilmente comparar, tanto cualitativamente como cuantitativamente, los perfiles de alcaloides entre las poblaciones y las especies de dendrobátidos y otros anfibios. Las técnicas más utilizadas para el desarrollo de estas investigaciones son la cromatografía de capa fina TLC, la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS) y la cromatografía líquida acoplada a un detector de masas (LC-MS) (Daly et al., 1992; Hantak et al., 2013; Tamariz, Burgueño-Tapia, Vázquez, Delgado, 2018). La estructura interna y la configuración estereoquímica de las moléculas de alcaloides pueden obtenerse directamente al realizar un análisis mediante HPLC, FTIR o RMN (Daly et al., 2005).

2.1.3 COLECCIÓN, EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Todo el proceso de colección extracción y purificación de las muestras fueron realizados en el trabajo de investigación previo de Cipriani, en los meses de junio, julio y agosto del año 2006. Las pieles colectadas de las especies *Epipedobates anthonyi*, *darwinwallacei*, *boulengeri* y *tricolor* fueron procesadas mediante el protocolo de extracción, sugerido por Daly y Myers, y analizadas mediante GC-MS.

En la Tabla 2 se puede observar la localidad, fecha y ubicación de las muestras, además del código de campo asignado a cada espécimen. Todos los especímenes reposan en el museo de herpetología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

En la Tabla 3 se expone la instrumentación y condiciones cromatográficas utilizadas por Cipriani, en el 2006, para la identificación de alcaloides lipofílicos mediante GC-MS.

2.2 RE-ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS PUROS, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A UN DETECTOR DE MASAS (GC-MS).

Todos los extractos de las especies *Epipedobates anthonyi*, *boulengeri*, *tricolor* y *darwinwallacei*, una vez finalizado el estudio de Cipriani (2006) fueron conservados en los viales de vidrio ámbar y tapa de teflón bajo congelación por 12 años. Una vez que se retiraron los extractos de congelación se observó que la mayoría se encontraban en estado sólido, por lo que fueron disueltos en 1 mL de metanol. Se realizó el análisis de estos extractos mediante GC-MS con la finalidad de evaluar la validez de los mismos mediante la comparación con los alcaloides descritos con anterioridad. Los espectros de masas obtenidos en el nuevo análisis por GC-MS fueron analizados mediante el software *ChemStation Data Analysis*, comparando cada uno de los picos del espectro con la Biblioteca Virtual NIST MS y bibliográficamente con el artículo donde se realiza una tabulación de 800 alcaloides presentes en la piel de los anfibios (Daly et al., 2005). La instrumentación y las condiciones cromatográficas utilizadas para el nuevo análisis por GC-MS se encuentran descritas en la Tabla 4.

2.3 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE SEPARACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON UN DETECTOR UV-VISIBLE

Con el propósito de purificar y caracterizar los alcaloides encontrados, se propuso la optimización de un método de separación de alcaloides lipofílicos generados a partir de la piel de dendrobátidos, mediante HPLC (según metodología propuesta por Fitch et al., en el 2003).

Para la separación de los extractos alcaloideos, se hizo una amplia y meticulosa revisión bibliográfica con la finalidad de seleccionar las condiciones cromatográficas óptimas, con las que se puede obtener una eficiente separación cromatográfica. Es entonces que, se selecciona como fase móvil, agua desionizada (Fase A) y acetonitrilo (Fase B), ambas preparadas con un modificador orgánico (ácido acético glacial al 0.05%) a un flujo de 2 mL/ min. Fases utilizadas por Fitch et, al, en el 2003, para el aislamiento guiado por bio-ensayo de la epiquinamida. La optimización de las condiciones cromatográficas en el HPLC, fue desarrollada a partir del extracto de *Epipedobates tricolor*, debido a la poca cantidad de muestra remanente en los extractos conservados y al tipo de alcaloides presentes en las muestras de interés de las especies *Epipedobates anthonyi* y *darwinwallacei*, que de acuerdo al análisis inicial presentaban mayor variedad de alcaloides presentes y posibles alcaloides no identificados.

Antes del desarrollo cromatográfico, se realizó una limpieza del sistema con agua desionizada, metanol y acetonitrilo. Las fases fueron colocadas y purgadas en las líneas A y B respectivamente y la columna acondicionada, a las condiciones iniciales, por el tiempo equivalente a diez volúmenes de la columna. Se creó un nuevo método en el software Empower Pro, programando al equipo en modo gradiente, con un tiempo inicial de corrida de 60 minutos, con una variación desde 90% a 50% y 50 a 0% de la fase acuosa, durante 40 y 20 minutos respectivamente, con el detector Ultravioleta Visible trabajando a dos canales de detección (214 y 260 nm).

Como corrida preliminar se analizó metanol (blanco), con un volumen de inyección de 50 µL. En el cromatograma obtenido se pudo apreciar que la columna se encontraba en óptimas condiciones. Nuevamente se acondicionó la columna y se realizaron las corridas de prueba a volúmenes de 10, 50 y 200 µL a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates tricolor*, muestra T1. Después de realizar la primera corrida con 10 µL, se pudo apreciar, en el cromatograma, que la mayoría de picos aparecían después del minuto 40 de corrida, en donde la fase orgánica variaba del 50 al 100%, y que al final de la corrida, en el minuto 60 se observaba que no todos

los picos habían terminado de eluir de la columna, razón por la cual se realizó una segunda corrida de prueba, con el mismo volumen de inyección, y se apreció que cerca de minuto 73 ya solo era posible distinguir la línea base. Entonces se decidió aumentar el tiempo de corrida a 80 minutos.

Se procedió entonces a realizar nuevamente las corridas de prueba, limpiando y acondicionando la columna después de cada corrida. Al analizar cada uno de los cromatogramas se pudo apreciar que al inyectar un volumen de 200 μL , se obtienen picos más estrechos con una intensidad apreciablemente alta. Se definió el volumen óptimo de inyección a 250 μL , al solo contener cerca de 300 μL de muestra en los viales.

Finalmente se realizó la separación de las muestras de *Epipedobates anthonyi* (muestra A1) y *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S). En la Tabla 5 se describe la instrumentación y condiciones cromatográficas utilizadas para la separación de los extractos por HPLC. Se programó al colector de fracciones con un tiempo de colección cada 4 minutos, es decir que en los 80 minutos de corrida se colectaron un total de 20 muestras por cada especie. Todas las fracciones recolectadas fueron concentradas a sequedad y al vacío utilizando un equipo Thermo Fisher Scientific (SPD131DDA), a una temperatura de 35°C. El tiempo de concentración de cada fracción variaba en función de la proporción que contenía de fase acuosa y orgánica. Es entonces que, las fracciones que contenían un porcentaje mayor de fase acuosa, tardaban 6 horas en ser concentradas, a diferencia de las fracciones en las que el porcentaje de fase orgánica era mayor, que tardaban alrededor de 4 horas. Una vez concentradas las fracciones de cada especie, se decidió unir las fracciones afines, lo cual se realizó analizando los cromatogramas obtenidos, procurando que las fracciones coincidan con el perfil cromatográfico de los picos observados; es decir que de las 20 fracciones iniciales se obtuvieron 6 fracciones para cada especie cada una de 1 mL de volumen aproximadamente.

2.4 ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES SEPARADAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A UN DETECTOR DE MASAS.

Se analizaron 6 fracciones, de cada una de las especies en estudio, mediante GC-MS a las mismas condiciones con las que se realizó el análisis de los extractos metanólicos puros de cada especie (Ver Tabla 4).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RE-ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS PUROS, MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADA A UN DETECTOR DE MASAS (GC-MS).

Como resultado del re-análisis de los extractos metanólicos de cada especie mediante GC-MS, se obtuvieron nueve cromatogramas de iones totales (TIC), por sus siglas en inglés, Figura 1 a la 9, en los cuales se identificó la presencia de alcaloides lipofílicos, después de analizar cada uno de los picos observados mediante el software *ChemStation*, comparando sus espectros de masas de forma virtual y bibliográfica, con la biblioteca NIST MS Search y el artículo de tabulación de 800 alcaloides lipofílicos encontrados en la piel de los anfibios (Daly et al., 2005).

Los alcaloides identificados fueron cotejados, con los descritos con anterioridad por Cipriani en el 2006, con la finalidad de establecer el grado de coincidencia entre los resultados obtenidos. La comparación de los resultados obtenidos de cada especie se los puede ver en las Tablas 6 a la 14.

En el extracto metanólico de la especie *Epipedobates anthonyi*, muestra A1, Tabla 6, se identificaron siete tipos de alcaloides lipofílicos, reportados como: 1,4-quinolizidina, indolizidina, 5,8-indolizidina, 5,6,8-indolizidina, alopumiliotoxina, deoxypumiliotoxina y decahidroquinolina, de los cuales cinco coinciden con los nueve alcaloides reportados por Cipriani, en el 2006. Los alcaloides distintos en los dos trabajos de investigación son del tipo de la alopumiliotoxina, deoxypumiliotoxina, tricíclico y pumiliotoxina. Mientras que los alcaloides descritos por Cipriani como “no identificados” no fueron encontrados.

En el extracto metanólico de la especie *Epipedobates anthonyi*, muestra A2, Tabla 7, se identificaron diez tipos de alcaloides lipofílicos, reportados como: 4,6-quinolizidina, 3,5-pirrolizidina, 5,8-indolizidina, octahydrohistrionicotoxina, alopumiliotoxina, decahidroquinolina, piperidina, pumiliotoxina, pumiliotoxina A y Pumiliotoxina B, de los cuales cuatro coinciden con los ocho alcaloides reportados por Cipriani, en el 2006. Los alcaloides distintos a los reportados en los dos trabajos de investigación son del tipo de la 4,6-quinolizidina, 3,5-pirrolizidina, octahydrohistrionicotoxina, piperidina, pumiliotoxina A y B, 1,4-quinolizidina y homopumiliotoxina. Mientras que el alcaloide descrito por Cipriani como “sin clasificación” no fue encontrado.

En el extracto metanólico de la especie *Epipedobates anthonyi*, muestra A3, Tabla 8, se identificaron doce tipos de alcaloides lipofílicos, reportados como: 3,5-indolizidina, 3-5-pirrolizidina, 5,8-indolizidina, 7-cloro, 4-metil-quinolina, deoxypumiliotoxina, epibatidina, indolizidina, piperidina, pumiliotoxina, pumiliotoxina A y B y tricíclico, de los cuales tres coinciden con los ocho alcaloides reportados por Cipriani, en el 2006. Los alcaloides distintos a los reportados en los dos trabajos de investigación son del tipo de la 3,5-indolizidina, 3,5-pirrolizidina, 5,8-indolizidina, 4,6-quinolizidina, 3,5-pirrolizidina, octahydrohistrionicotoxina, piperidina, pumiliotoxina A y B, 1,4-quinolizidina y homopumiliotoxina. El alcaloide descrito por Cipriani como “sin clasificación” no fue encontrado. Un hallazgo importante en el presente estudio, fue la epibatidina con una probabilidad del 81%, que fue identificada mediante la biblioteca del equipo y que Cipriani no logró identificar como epibatidina si no como un compuesto de esta clase debido a las diferencias en su espectro de masas.

En el extracto metanólico de la especie *Epipedobates anthonyi*, muestra A4, Tabla 9, se identificaron seis tipos de alcaloides lipofílicos, reportados como: 5,6,8-indolizidina, alopumiliotoxina, deoxypumiliotoxina, homopumiliotoxina, pumiliotoxina B y tricíclico, de los cuales dos coinciden con los 6 alcaloides reportados por Cipriani, en el 2006. Los alcaloides distintos a los reportados en los dos trabajos de investigación

son del tipo de la 5,6,8-indolizidina, pumiliotoxina B, tricíclico, 1,4-quinolizidina, pumiliotoxina, 8-deoxypumiliotoxina.

En el extracto metanólico de la especie *Epipedobates darwinwallacei*, muestra S, Tabla 10, se identificaron catorce tipos de alcaloides lipofílicos, reportados como: 1-metil, 2-(5 hexenil), 5-(8 nonenil)-pirrolidina, 1,4-quinolizidina, 2-(4 pentenil), 6-pentil-piperidina, 2,6-dibutil, 4-metil-piperidina, 3,5-indolizidina, 3,5,8-indolizidina, 4,6-quinolizidina, 5,8-indolizidina, octahydrohistrionicotoxina, octahydroquinolina, alopumiliotoxina, decahydroquinolina, pumiliotoxina B y tricíclico, de los cuales dos coinciden con los 5 alcaloides reportados por Cipriani, en el 2006. Los únicos tipos de alcaloides en los que coinciden los dos trabajos de investigación son del tipo de la decahydroquinolina y alopumiliotoxina. El alcaloide descrito por Cipriani como “sin identificar” no fue encontrado.

En el extracto metanólico de la especie *Epipedobates boulengeri*, muestra B1, Tabla 11, se identificaron veinte tipos de alcaloides lipofílicos, reportados como: 1,4-quinolizidina, 2,6-dibutil, 4-metil-Piperidina, 3,5-indolizidina, 3,5-pirrolizidina, 3-butil-indolizidina, 5,6,8-indolizidina, 5,8-indolizidina, octahydrohistrionicotoxina, deoxyhomopumiliotoxina, deoxypumiliotoxina, indolizidina, histrionicotoxina, homopumiliotoxina, isotetrahistrionicotoxina, polizonimina, pumiliotoxina, pumiliotoxina A y B, espiropirrolizidina y espirolizidina, de los cuales seis coinciden con los diez alcaloides reportados por Cipriani, en el 2006. Los únicos tipos de alcaloides en los que coinciden los dos trabajos de investigación son del tipo de la 1,4-quinolizidina, 3,5-indolizidina, 5,8-indolizidina, deoxypumiliotoxina, histrionicotoxina y pirrolizidina.

En el extracto metanólico de la especie *Epipedobates boulengeri*, muestra B2, Tabla 12, se identificó dieciocho tipos de alcaloides lipofílicos, reportados como: 2-metil, 6-hexa, 3,5-dienil-quinolizidina, 3-butil-indolizidina, 3,5-indolizidina, 3,5-pirrolizidina, 4,6-quinolizidina, 5,6,8-indolizidina, 5,8-indolizidina, octahydrohistrionicotoxina, deoxyhomopumiliotoxina, indolizidina, histrionicotoxina, polizonimina, pumiliotoxina, pumiliotoxina A y B y espiropirrolizidina, de los cuales seis

coinciden con los diez alcaloides reportados por Cipriani, en el 2006. Los únicos tipos de alcaloides en los que coinciden los dos trabajos de investigación son del tipo de la 1,4-quinolizidina, 3,5-indolizidina, 5,6,8-indolizidina, histrionicotoxina, pirrolizidina y espiropirrolizidina.

En el extracto metanólico de la especie *Epipedobates tricolor*, muestra T1, Tabla 13, se identificó diecisiete tipos de alcaloides lipofílicos, reportados como: 1,4-quinolizidina, 3-butil-indolizidina, 3,5-pirrolizidina, 3-butil-Indolizidina, 4,6-quinolizidina, 5,6,8-indolizidina, 5,8-indolizidina, 6,7-dihydro, 5,8-indolizidina, octahydroquinolina, alopumiliotoxina, decahydroquinolina, indolizidina, lehmizidina, piperidina, pumiliotoxina y pumiliotoxina B, de los cuales cuatro coinciden con los alcaloides reportados por Cipriani, en el 2006.

En el extracto metanólico de la especie *Epipedobates tricolor*, muestra T2, Tabla 14, se identificó dieciocho tipos de alcaloides lipofílicos, reportados como: 1,4-quinolizidina, 3,5-indolizidina, 3,5-pirrolizidina, 3-butil-Indolizidina, 4,6-quinolizidina, 5,6,8-indolizidina, 5,8-indolizidina, 6,7-dihydro, 5,8-indolizidina, octahydroquinolina, alopumiliotoxina, decahydroquinolina, deoxypumiliotoxina, indolizidina, lehmizidina, piperidina, pumiliotoxina, pumiliotoxina A y B, de los cuales cinco coinciden con los seis alcaloides reportados por Cipriani, en el 2006. Los tipos de alcaloides en los que coinciden los dos trabajos de investigación son del tipo de 5,8-indolizidina, 6,7-dihydro, 5,8-indolizidina, alopumiliotoxina, decahydroquinolina y pumiliotoxina.

Aunque no se conoce con total certeza las propiedades de cada uno de los alcaloides identificados y su actividad química en los extractos metanólicos durante su periodo de conservación. Es posible explicar las coincidencias de los alcaloides identificados entre las dos investigaciones realizadas y entre las especies analizadas.

Los alcaloides derivados de la lisina, las quinolizidinas y los alcaloides indolizidínicos o Indolizidinas, son alcaloides estables que son identificados en casi todos los extractos analizados, siendo las Indolizidinas 5,8 di sustituidas y los 5,6,8 tri

sustituidas las de mayor incidencia. Estos compuestos son muy abundantes en la naturaleza y están presentes en organismos como bacterias, hongos, invertebrados e invertebrados, quienes co-habitan con los dendrobátidos explicando así su nivel de incidencia en los extractos analizados al igual que las pumiliotoxinas, que son también alcaloides indolizidínicos, que con frecuencia se sub-dividen en dos clases, las alopumiliotoxinas y las pumiliotoxinas B.

Para el análisis de variabilidad de los resultados obtenidos, se debe considerar que la capacidad de segregar alcaloides bio-acumulados en las glándulas granulares de la piel, es un rasgo propio de varias especies de Anuros. Se ha demostrado experimentalmente, que los alcaloides lipofílicos son secuestrados a partir de la dieta de artrópodos en varios linajes de dendrobátidos y que la eficiencia de captación de ciertos alcaloides varía en función de las especies, de su edad y la prolongación de su tipo de dieta. Por esta razón entre las especies analizadas, no coinciden a totalidad los alcaloides identificados, incluso entre las especies que co-habitan en la misma ubicación y que se alimentan bajo las mismas condiciones, lo que sugiere que el secuestro de alcaloides es un proceso discriminativo.

A los alcaloides identificados se los clasificó en función a un código alfa-numérico, asignado a los alcaloides lipofílicos de los Anuros, en relación a su masa exacta o nominal. Varios de los alcaloides identificados son isómeros estructurales o estereoisómeros. Lo que explica que varios picos, analizados en el espectro de masas, pueden ser atribuidos a un mismo compuesto. Se clasificó como no establecidos a las clases de alcaloides que fueron identificados pero con una probabilidad baja.

Al realizar la comparación entre los resultados obtenidos del análisis de cada muestra, con los reportados por Cipriani, en el 2006, se constató que la cantidad de alcaloides identificados era mayor, con excepción en la muestra de *Epipedobates anthonyi*, A1, en la que se identificaron ésteres metílicos de ácidos grasos en casi la totalidad de la corrida. La diferencia entre los resultados obtenidos en las dos investigaciones se atribuye a varios factores que deben ser considerados como: la

evolución de la tecnología utilizada, el avance en las investigaciones de alcaloides lipofílicos de dendrobátidos, la actualización de bibliotecas virtuales de espectros, las condiciones de conservación de las muestras, entre otros.

En cuanto a la evolución de la tecnología utilizada, en el 2006, Cipriani realiza su investigación con un equipo de GC-MS Hewlett Packard modelo 5890 Series II con un detector de masas modelo 5971, mientras que, en el presente estudio, se utilizó un equipo GC-MS Agilent modelo 7890 con un detector modelo 5977. Estos equipos difieren principalmente en sensibilidad, en el mayor grado de fragmentación de las moléculas, la calidad de sus componentes, la integración de todo el sistema cromatográfico, el tipo de conexiones que utiliza, el software, entre otros (Agilent, 2014). Cipriani, en el 2006, realizó la identificación de alcaloides solo utilizando el artículo de tabulación de 800 alcaloides lipofílicos propuesta por Daly et al., en el 2005.

En un inicio Daly, et al (1992), propuso una clasificación de los alcaloides encontrados en la piel de los dendrobátidos, considerándolos como “alcaloides de clase mayor” o “alcaloides de grado menor”, según la concentración y el grado de ocurrencia del alcaloide. En la actualidad, esta clasificación no tiene validez al ser comprobado de manera experimental que el grado de ocurrencia y concentración de los alcaloides presentes en la piel de los dendrobátidos, está relacionada a la distribución geográfica de las especies, la edad y sexo de los especímenes y a la prolongación de un tipo de dieta específico.

Los alcaloides bio-acumulados no tienen modificaciones en su estructura, es decir que, aunque se conocen muy superficialmente los mecanismos moleculares envueltos en el secuestro de los alcaloides, no sufren cambios (Hantak et al., 2013). Por esta razón se puede deducir que los alcaloides identificados en el presente estudio pueden ser clasificados por la ubicación de colección de los especímenes.

Al analizar todos los cromatogramas de iones totales (TIC) de cada especie de los dendrobátidos, se identificaron también varios compuestos distintos a los alcaloides

lipofílicos. Estos compuestos fueron ésteres metílicos de ácidos grasos, alcaloides lipofílicos, aminas biogénicas, péptidos y amidas. Pero a su vez se identificaron compuestos relacionados a los terpenos, como el D-limoneno, terpineno, pineno, medicamentos utilizados como la benzocaína usado como anestésico local y la colchicina usado para detener la división celular. Los primeros compuestos identificados distintos a los alcaloides se atribuyen a los compuestos propios de la piel de los dendrobátidos, en los que su presencia sugiere que la purificación de las muestras fue ineficiente. Los terpenos identificados pueden sugerir que la dieta de los dendrobátidos no solamente se basa en el consumo de artrópodos, sino que también puede estar relacionada con plantas y que posiblemente atraigan su atención al igual que los artrópodos por su contenido de alcaloides. Por último, la identificación de lumicolchicina, sugiere que se debe hacer estudios relacionados con la cantidad inyectada en cada especie y concluir si interviene en la determinación de alcaloides lipofílicos.

Todos los alcaloides identificados de las especies *Epipedobates anthonyi* y *darwinwallacei*, que tienen una configuración absoluta determinada son expuestos en la Tabla 15, en donde se puede apreciar sus propiedades relacionadas al análisis mediante GC-MS, su fórmula y peso molecular.

Varios de los alcaloides identificados, son estudiados con la finalidad de desarrollar nuevos fármacos y encontrar la cura a distintas enfermedades degenerativas en los seres humanos, como por ejemplo es el caso de la epibatidina, que es un alcaloide considerado como agente analgésico, con un potencial de 100 a 200 veces mayor a la morfina y que actúa sobre los receptores nicotínicos de la acetilcolina y no con los receptores opioides. Si bien se ha descubierto que la epibatidina tiene la desventaja de tener efectos no deseados en el sistema nervioso central, en las funciones gastrointestinales y cardiovasculares, se ha desarrollado análogos sintéticos dotados de esta molécula en los que se obtiene una mayor selectividad de acción y ventajas terapéuticas (Salehi et al., 2018).

Los alcaloides derivados de la lisina, es decir las quinolizidinas, licopodio, piperidina e indolizidinas, exhiben una amplia gama de propiedades farmacológicas anti-cancerígenas y anti-inflamatorias que son estudiadas a profundidad, al igual de los efectos que tienen sobre enfermedades de hipocolesterolemias, arritmias cardíacas e incluso en alzhéimer (Bunsupa, Yamazaki, Saito, 2017).

Las pumiliotoxinas (alopumiliotoxinas y homopumiliotoxinas), las histrionicotoxinas, las quinolizidinas y decahidroquinolinas, son alcaloides estudiados gracias al efecto que causan en los canales receptores de sodio, potasio y yodo en distintas células del cuerpo humano. Su actividad química es estudiada mediante aproximaciones electrofisiológicas y bioquímicas en receptores neuromusculares de mamíferos (Daly et al., 2005).

Las pirrolizidinas son alcaloides que tienen una actividad biológica alta que pueden inhibir a la enzima glicosidasa, lo que implica que tiene además de propiedades farmacológicas, propiedades bioquímicas y fisiológicas. Esta interrupción del metabolismo puede tener efectos citotóxicos (anticancerígenos), hipoglicémicos (antidiabéticos), fungicidas y antivirales en el tratamiento del VIH (Tamariz, Burgueño-Tapia, Vázquez, Delgado, 2018).

En los anexos, se pueden observar los espectros de masas obtenidos de las muestras A1, A2, A3, A4 y S. Solamente se muestran los espectros que se encontraron con una alta probabilidad al ser identificados en la biblioteca virtual. En cada espectro se muestra: el espectro obtenido, el espectro bibliográfico y la comparación entre los dos, además de su estructura molecular. No se muestran los espectros de los compuestos que solo fueron clasificados o que fueron identificados únicamente en base a la publicación de 800 alcaloides lipofílicos.

3.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE SEPARACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON UN DETECTOR UV-VISIBLE

Como se detalló en el procedimiento experimental, las condiciones iniciales para la optimización del método de separación mediante HPLC-UV/Vis, fueron seleccionadas en relación a un análisis bibliográfico de las investigaciones relacionadas a la separación de alcaloides lipofílicos de dendrobátidos. Como resultado se obtuvo que al variar el volumen de inyección de las muestras, cambia la simetría, intensidad y resolución de los picos con un volumen de 10, 50 y 200 μL , Resultando favorable el mayor volumen de inyección en donde la absorbancia de los picos aumenta. Se estableció que el volumen ideal de inyección era de 250 μL por muestra y que el tiempo de análisis ideal era de 80 minutos, en razón de que la mayoría de componentes de las muestras eluyen cerca del minuto 40, en donde el gradiente de elución cambia del 50 al 100% de la fase orgánica. Se estableció que el procedimiento de limpieza y acondicionamiento de todo el sistema cromatográfico debe ser exhaustivo, para evitar interferencias entre las muestras.

Después de la optimización de las condiciones cromatográficas, se obtuvieron dos cromatogramas de las especies *Epipedobates anthonyi* (muestra A1) y *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S), Figuras 10 y 11, con el detector UV/Vis trabajando a los canales de 214 y 260 nm. Los alcaloides fueron agrupados y recolectados cada 4 minutos después de eluir de la columna.

A pesar de haber obtenido señal por HPLC en las corridas de separación no se lograron identificar con claridad alcaloides en las fracciones concentradas y analizadas finalmente por GC-MS. Siendo la baja concentración de alcaloides, una de las posibles razones de este resultado.

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), trabajando conjuntamente con la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS), puede ser

el primer paso para el desarrollo total del perfil alcaloideo de distintas especies de dendrobátidos. Es importante indicar que Daly y su grupo de investigadores, para llevar a cabo sus estudios recolectaron cerca de 750 ranas de cada especie. A diferencia de Cipriani, en el que la cantidad de ranas recolectadas es significativamente menor.

En varios de los artículos publicados por el NIH sobre alcaloides lipofílicos presentes en la piel de anfibios, no se especifican los procedimientos utilizados para la colección de las muestras de cada especie, el tiempo que transcurre desde su captura a su análisis o si los especímenes permanecían fuera de su hábitat natural. Estas variables son relevantes al replicar los estudios realizados sobre los alcaloides lipofílicos presentes en la piel de los dendrobátidos, debido a que para obtener un perfil alcaloideo completo de cada espécimen, se compara los resultados obtenidos con los ya publicados en los artículos científicos.

4. CONCLUSIONES

La separación de los alcaloides lipofílicos presentes en los extractos metanólicos puros de las especies *Epipedobates anthonyi* y *Epipedobates darwinwallacei*, fue posible al optimizar las condiciones cromatográficas del HPLC modificando el volumen de inyección del extracto, el flujo de la fase móvil y el tipo de elución de la fase móvil. No obstante, y a pesar de obtener una señal clara del detector, no fue posible distinguir ninguno de los alcaloides en las fracciones al analizarlas por GC-MS. Siendo la causa más probable de esto, la baja concentración de los alcaloides, que imposibilita su análisis final mediante la técnica FTIR-ATR.

Al realizar el análisis preliminar de los extractos metanólicos puros de las especies *Epipedobates anthonyi* y *Epipedobates darwinwallacei*, mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS), se identificaron varios picos característicos de alcaloides, que coinciden con los reportados con anterioridad por Cipriani en el 2006. Esto validó el buen estado de los extractos a pesar del tiempo transcurrido.

Los alcaloides lipofílicos presentes en los extractos metanólicos puros de las especies *Epipedobates anthonyi* (muestra A1) y *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S) fueron caracterizados al comparar los patrones de fragmentación de los espectros de masas de cada especie con la biblioteca de espectros *NIST MS Search*, y el artículo publicado previamente por Daly et al., en el 2005, de tabulación de 800 alcaloides lipofílicos encontrados en la piel de los anfibios. En la especie *Epipedobates anthonyi* se identificaron siete tipos de alcaloides lipofílicos, reportados como: 1,4-quinolizidina, indolizidina, 5,8-indolizidina, 5,6,8-indolizidina, alopumiliotoxina, deoxypumiliotoxina y decahidroquinolina. Mientras tanto, en el extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates darwinwallacei*, muestra S, se identificaron catorce tipos de alcaloides lipofílicos, reportados como: 1-metil, 2-(5 hexenil), 5-(8 nonenil)-pirrolidina, 1,4-quinolizidina, 2-(4 pentenil), 6-pentil-piperidina, 2,6-dibutil, 4-metil-

piperidina, 3,5-indolizidina, 3,5,8-indolizidina, 4,6-quinolizidina, 5,8-indolizidina, octahydrohistrionicotoxina, octahydroquinolina, alopumiliotoxina, decahidroquinolina, pumiliotoxina B y tricíclico.

5. RECOMENDACIONES

Idealmente el análisis de alcaloides lipofílicos generados a partir de las pieles de dendrobátidos, se podría realizar mediante la técnica de LC-MS. Esta técnica es altamente sensible, tiene una alta reproducibilidad y evita el uso de dos técnicas diferentes al tener una integración total de su sistema, siendo esta última una cualidad de gran interés ya que en procedimiento experimental se puede eliminar la etapa de concentración de las fracciones colectadas, además, en LC-MS la muestra tiene un proceso de electro nebulización y una fragmentación blanda, a diferencia de la técnica analítica GC-MS, en la que el tipo de fragmentación es dura, lo cual ayudaría a determinar los pesos moleculares de los alcaloides más fácilmente. Esta técnica, en conjunto con la GC-MS, puede ser complementarias en la obtención de un perfil alcaloideo más amplio en los dendrobátidos. Sin embargo, si se desea separar y purificar específicamente un alcaloide se tendría que utilizar HPLC-UV, porque MS es un detector destructivo.

Se sugiere aumentar la cantidad de pieles colectadas de cada especie de dendrobátidos con la finalidad de obtener una variedad y concentración de alcaloides lipofílicos más alta. En estudios anteriores, la cantidad de muestras son aproximadamente de setecientas cincuenta pieles, por cada una de las especies de interés, mientras que en la presente investigación se utilizó una cantidad considerablemente menor de pieles de la especie *Epipedobates anthonyi*, *darwinwallacei*, *boulengeri* y *tricolor*.

Se recomienda hacer pruebas de afinidad de los alcaloides lipofílicos en distintas fases móviles, mezcladas a distintas proporciones, favoreciendo así a los alcaloides que se desea analizar en función de su polaridad, también la optimización en la etapa de purificación de las muestras para eliminar posibles interferencias en el análisis.

Las muestras colectadas deben ser sacrificadas en el momento de su colección con la finalidad de que su concentración de alcaloides sea representativa. Está demostrado que el método de sacrificio por hipotermia es el ideal en este tipo de análisis, que debe ser realizado en el menor tiempo posible.

Para ampliar la investigación de los alcaloides lipofílicos de cada especie se debe considerar el análisis del contenido estomacal de cada especie colectada y la posible presencia de alcaloides en otros órganos distintos a la piel, como ya ha sido comprobado en otros anfibios.

6. BIBLIOGRAFÍA

Agilent. (2014). ¿Why Upgrade My HP/Agilent 5890/6890 GC to an Agilent 7890B GC?. Catálogo de ventas en línea. Recuperado de:

https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/GCGCMS_Users_Meeting_Why_Upgrade_to_7890_GC.pdf

Bunsupa, S. Yamazaki, M. Saito, K. (2017). *Lysine-derived Alkaloids: Overview and Update on Biosynthesis and Medicinal Applications with Emphasis on Quinolizidine Alkaloids*. Revista Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. Volumen (12). Pp 1002-1012.

Celis, C. (2005). *Evaluación del Efecto del Extracto de Alcaloides de Dendrobates Truncatus (Anura: Dendrobatidae) Sobre Unión Neuromuscular de Mamífero*. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de Pre grado. Bogotá, Colombia.

Chivian, E. Bernstein A. (2015). *Preservar la vida. De cómo nuestra salud depende de la biodiversidad*. Fondo de Cultura Económica Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

Cipriani, E. (2006). *Análisis de Epibatidina en Pieles de Dendrobátidos ecuatorianos*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Tesis de pre grado. Quito, Ecuador.

Daly, J. Secunda, S. Garrafo, H. Spande, T. Wisnieski, A. Nishihira, C. Cover, J. (1992). *Variability in alkaloid profiles in neotropical poison frogs (Dendrobatidae): genetic versus environmental determinants*. Revista Toxicon. Volumen (30). Pp 887-898.

Daly, J. Spande, T. Garrafo, H. (2005). *Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds*. Revista Natural Products. Volumen (68). Pp 1556-1575.

Erazo, J. Ruano, L. López, A. (2016). *Comparación de la dieta y la composición de alcaloides de Dendrobates Truncatus (Dendrobatidae) entre dos zonas con diferentes grados de perturbación en un bosque seco*. Revista de Ciencias. Volumen (2). Pp 95-107.

Field, J. (2011). *Envenenamiento por Contacto Directo con Ranas Venenosas*. Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora. Volumen (28). Pp38-42.

Fitch, R. Garrafo, H. Spande, T. Yeh, H. Daly, J. (2003). *Bioassay-guided isolation of epiquinamide, a novel quinolizidine alkaloid and nicotinic agonist from an Ecuadoran poison frog, Epipedobates tricolor*. Revista Natural Products. Volumen (66). Pp 1345-1350.

Hantak, M. Grant, T. Reinsch, S. Meginnity, D. Loring, M. Toyooka, N. Saporito, R. (2013). *Dietary Alkaloid Sequestration in a Poison Frog: An Experimental Test of Alkaloids Uptake in Melanophryniscus stezneri (Bufonidae)*. Revista Chemical Ecology. Volumen (39). Pp1400-1406.

Museo de Zoología de la PUCE. (2018). *División de Anfibios*. BioWeb Ecuador. Recuperado el 06/08/2018 de <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/>

National Institute of Health (2018). *PubChem*. National Center for Biotechnology information. USA.

O'Malley, B. (2007). *Anatomía y Fisiología Clínica de Animales Exóticos*. Segunda edición. Editorial Servet. Pp 3-22.

Po Hao, C. (2012). *Evaluación de la actividad anticancerígena del extracto peptídico crudo de Agalychnis spurrelli (Anura: Hylidae) en leucemias*. Pontificia Universidad del Ecuador. Tesis de Pre-grado. Ecuador.

Cilveti, C. Rivera, M. Rodríguez, M. Alcocer, L. (2013). *Genotipaje de la resistencia a antimicrobianos en bacterias entéricas productoras de carbapenemasas y pruebas de inhibición con secreciones peptídicas de anfibios nativos*. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas (REMCA). Volumen (34). Pp 85-98.

Salehi, B. Rapposelli, S. Peron, G. Calina, D. Sharifi-Rad, M. Sharopov, F. Martins, N. Sharifi-Rad, J. (2018). *Epibatidine: A Promising Natural Alkaloid in Health*. Revista Biomolecules. Volumen (9).

Saporito, R. Spande, T. Garraffo, H. Donnelly, M. (2009). *Arthropod Alkaloids in Poison Frogs: A Review of the "Dietary Hypothesis"*. Revista Heterocycles. Volumen (79). Pp227-297.

Señaris, J. Aristequieta, M. Rojas, H, Rojas-Runjaic, F. (2018). *Guía ilustrada de los anfibios y reptiles del valle de Caracas, Venezuela*. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Venezuela. Pp 248.

Tamariz, J. Burgueño-Tapia, E. Vázquez, M. Delgado, F. (2018). *Pyrrolizidine Alkaloids*. The Alkaloids: Chemistry and Biology. Volumen (80). Pp 1-314.

Tarvin, R. Santos, J. O'Connell, L. Zakon, H. Cannatella, D. (2016). *Convergent Substitutions in a Sodium Channel Suggest Multiple Origins of Toxin Resistance in Poison Frogs*. Revista Molecular Biology and Evolution. Volumen (33). Pp 1068-1081.

Vallejo, G. (2016). *Identificación de secreciones peptídicas de 15 especies de anuros amazónicos con actividad antimicrobiana y anticancerígena, y su aporte como servicio ecosistemático de tipo de provisión*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Tesis de Maestría. Ecuador.

Vargas, A. (2012). *Pruebas antimicrobianas de secreciones cutáneas de Agalychnis spurrelli (Anura: Hylidae) en cinco especies de levaduras patógenas del género Candida*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Tesis Pre-grado. Ecuador.

7. FIGURAS

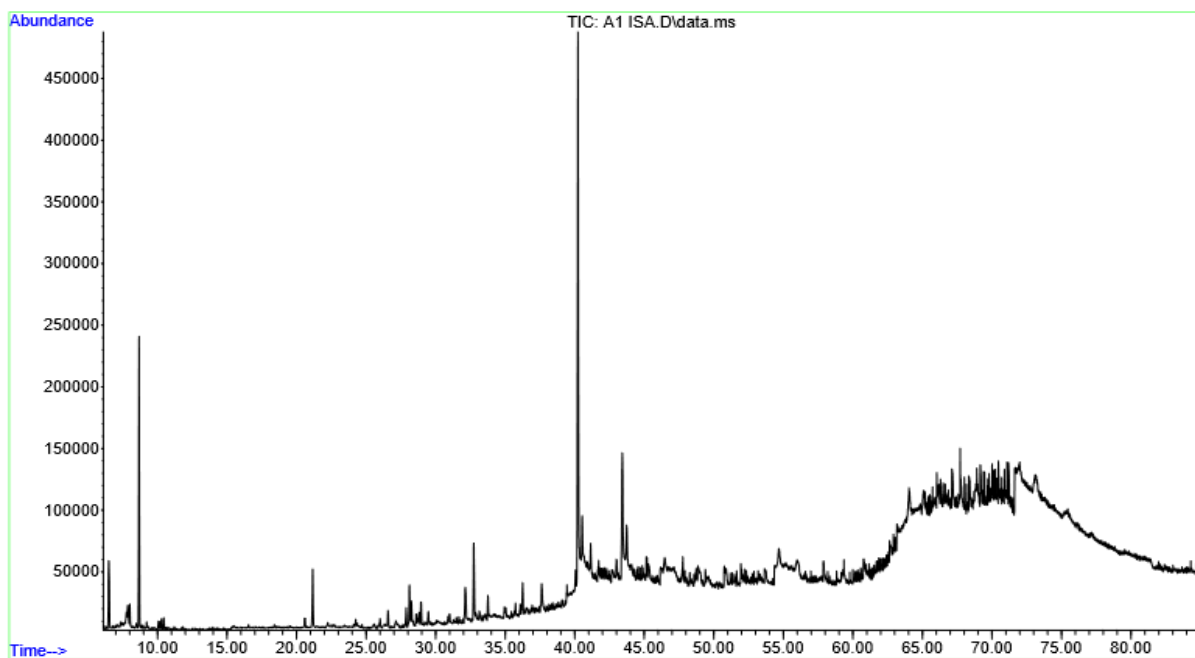


Figura 1. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A1)

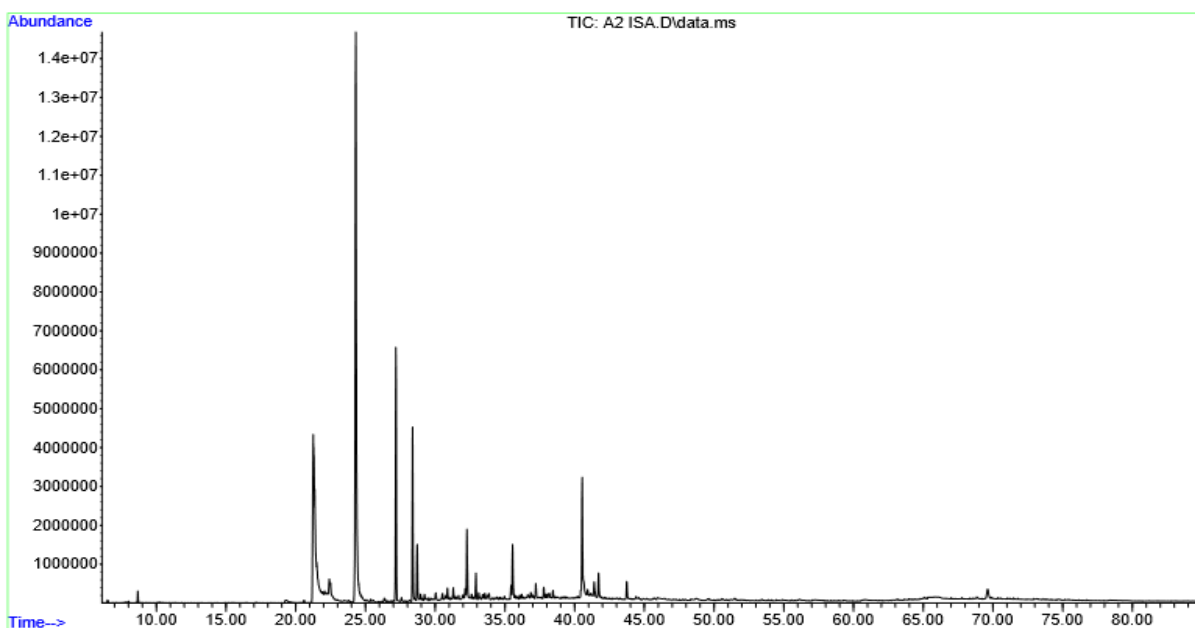


Figura 2. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2)

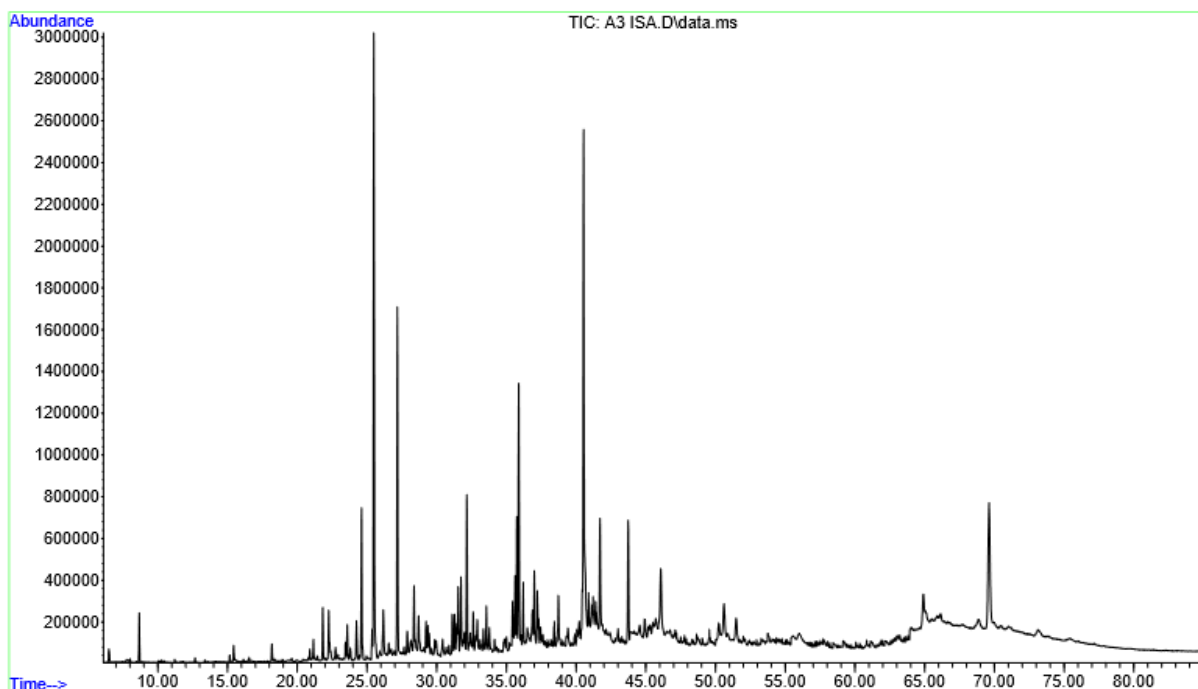


Figura 3. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3)

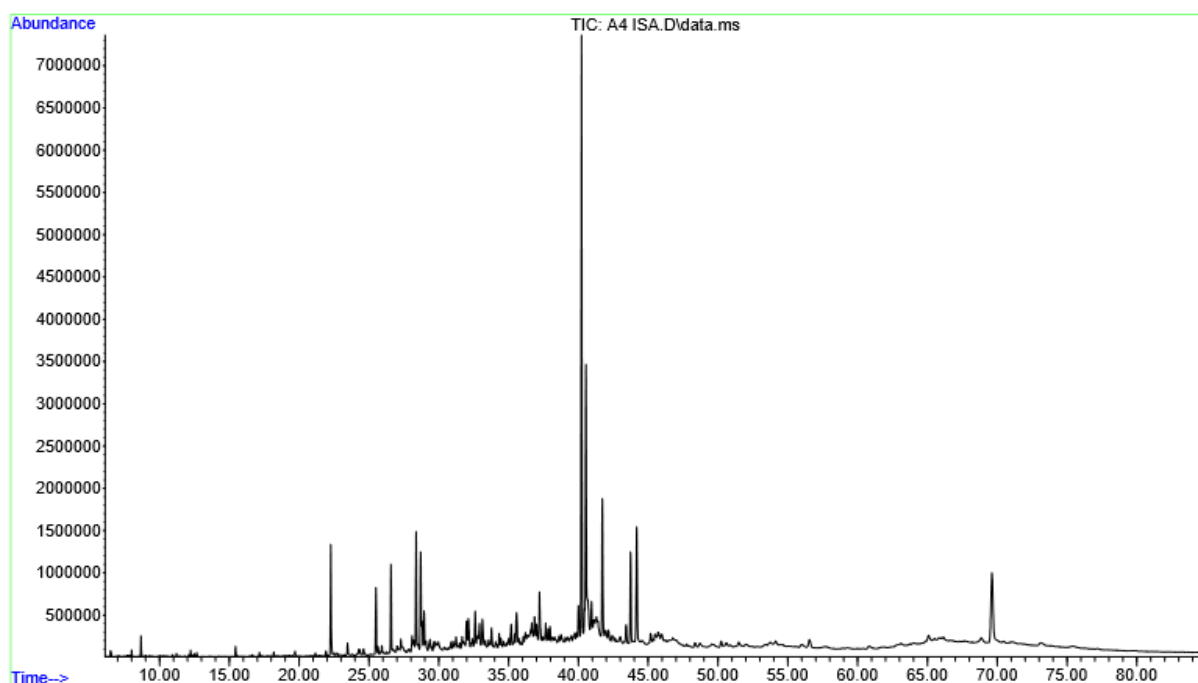


Figura 4. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A4)

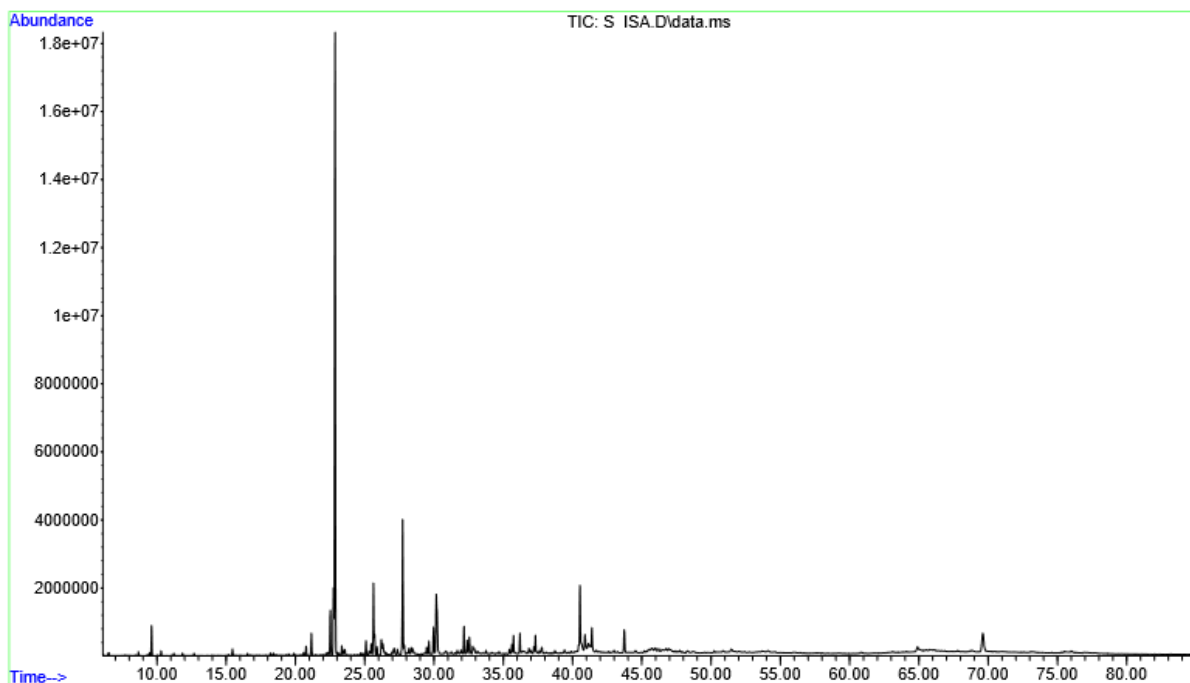


Figura 5. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS, a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S)

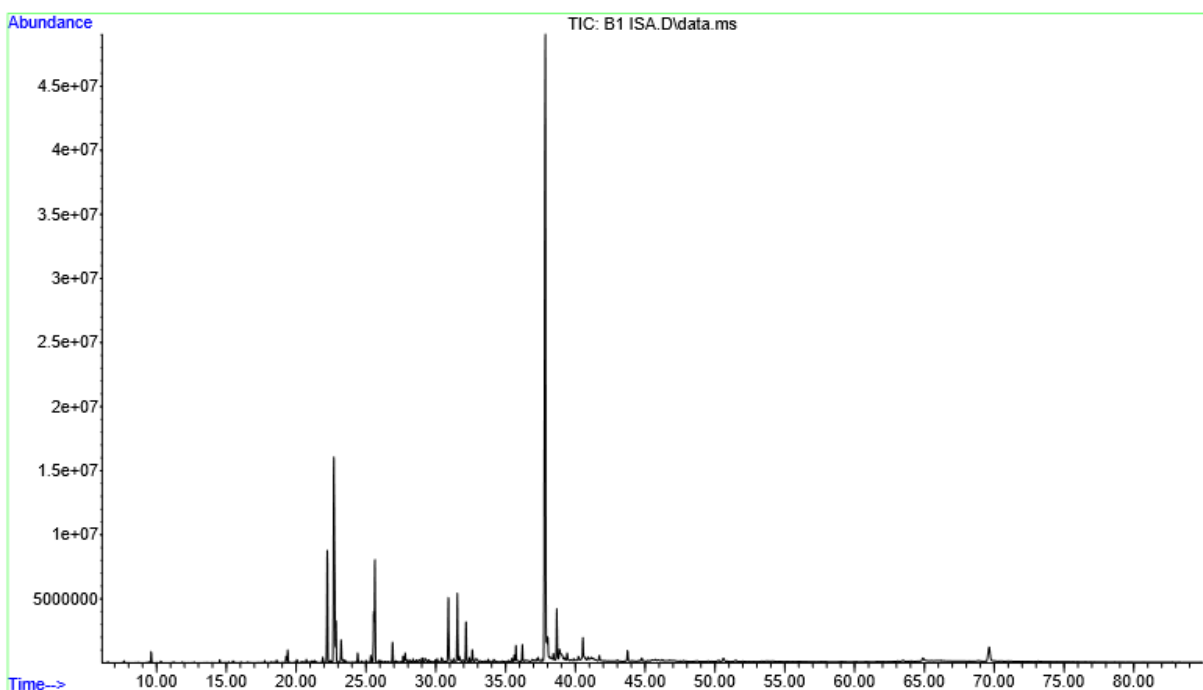


Figura 6. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS, a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates boulengeri* (muestra B1)

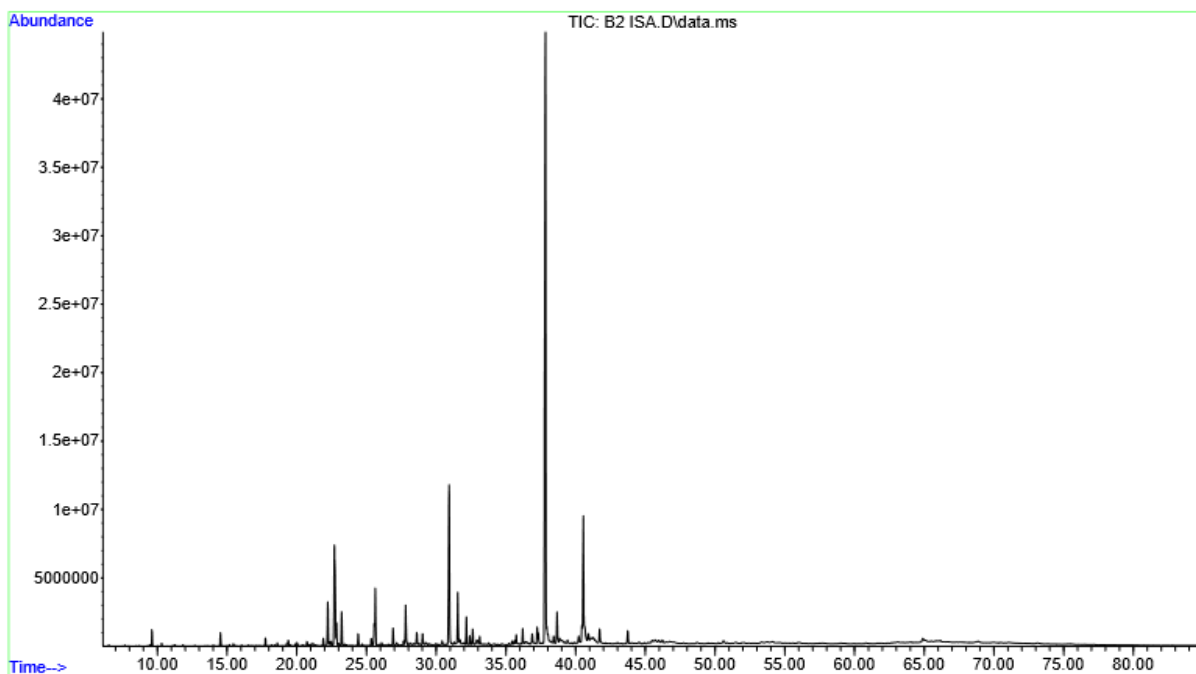


Figura 7. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS, a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates boulengeri* (muestra B2)

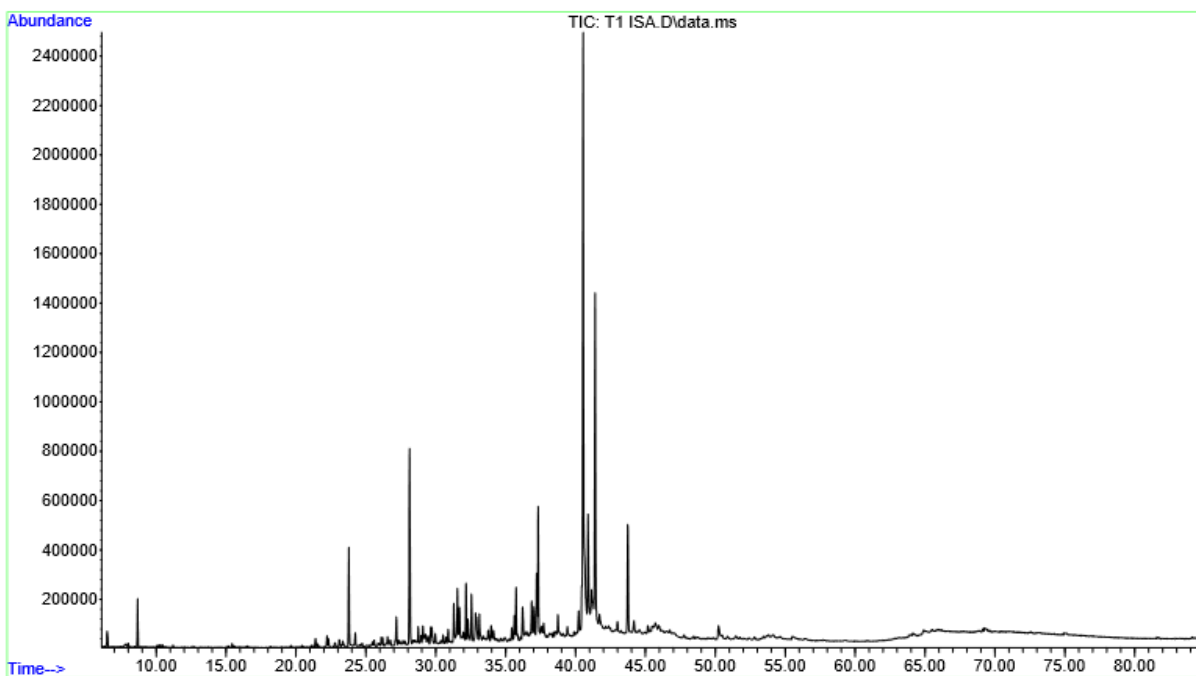


Figura 8. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS, a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates tricolor* (muestra T1)

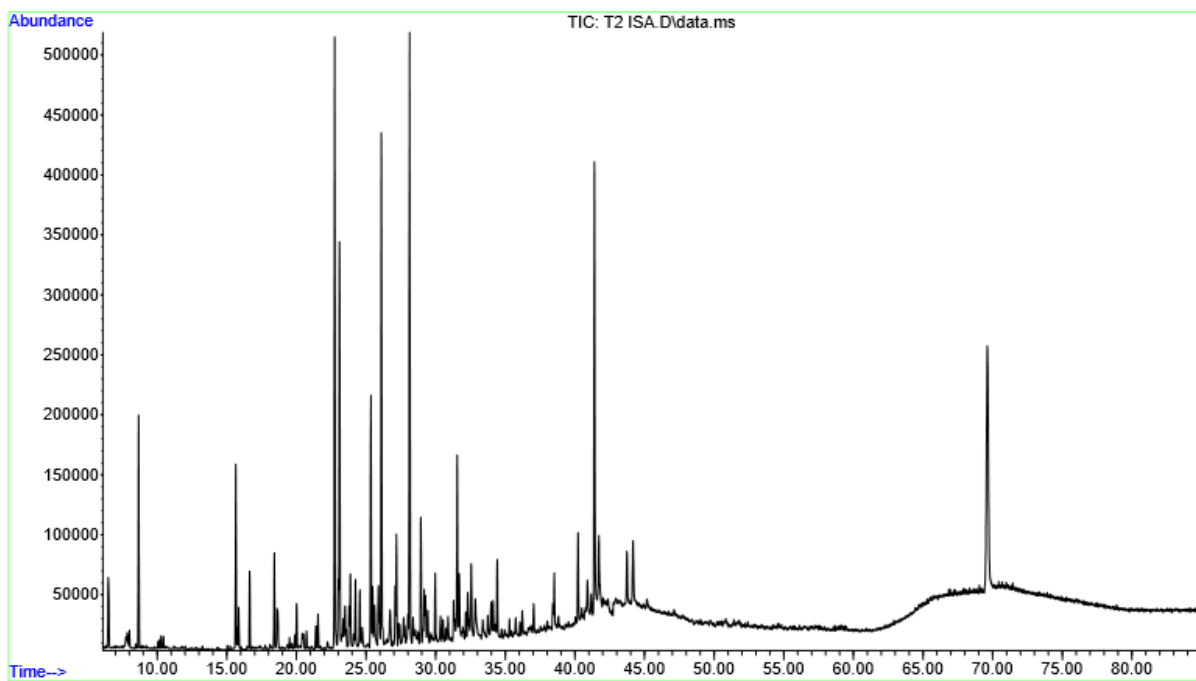


Figura 9. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido mediante GC-MS, a partir del extracto metanólico puro de la especie *Epipedobates tricolor* (muestra T2)

8. TABLAS

Tabla 1. Alcaloides lipofílicos más comunes en la piel de dendrobátidos

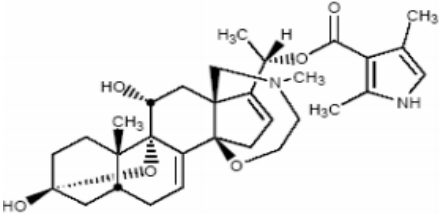
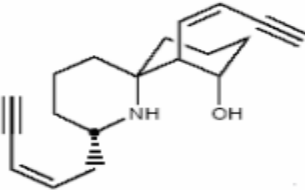
Nombre del Alcaloide	Aislado a partir de	Propiedades	Principales alcaloides (Homólogos)	Estructura Química según Daly et al., 2005.
Batracotoxina	<i>Phyllobates terribilis</i> en 1969	Tiene una estructura química basada en la magainina (péptido). Utilizada por los indígenas nativos de Ecuador y Colombia para envenenar flechas y herramientas de caza. Permite el estudio de los canales de sodio en la conducción nerviosa y de enfermedades relacionadas con el SNC (Daly et al., 2005).	Batracotoxina Homobatracotoxina Batracotoxinina A	
Histrionicotoxina	<i>Dendrobates histrionicus</i> en 1971	Detectadas únicamente en dendrobátidos del neo trópico. Son potentes bloqueadores no competitivos de los canales nicotínicos musculares, ganglionares y centrales (Celis, 2005).	Dihidroisohistrionicotoxina Decahidroisotrionicotoxina	

Tabla 1. Alcaloides lipofílicos más comunes en la piel de dendrobátidos (continuación...).

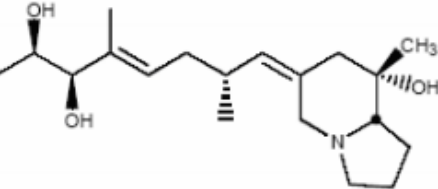
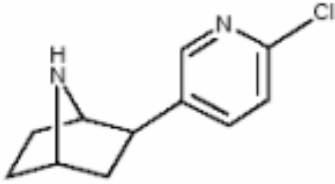
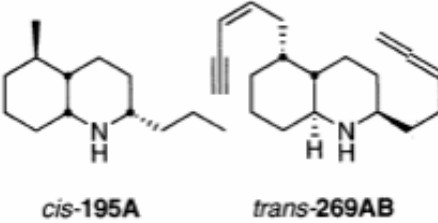
Nombre del Alcaloide	Aislado a partir de	Propiedades	Principales alcaloides (Homólogos)	Estructura Química según Daly et al., 2005.
Pumiliotoxinas	<i>Dendrobates pumilio</i> en 1967	Estos alcaloides tienen un efecto sobre el flujo de sodio y calcio a través de las membranas celulares, por tal, han sido considerados como posibles medicamentos utilizados para reforzar la contracción del corazón. Sin embargo su toxicidad es alta, lo que no ha permitido seguir con su investigación y posterior sintetización de derivados eficaces (Chivian y Bernstein, 2015).	Pumiliotoxinas Alopumiliotoxinas Homopumiliotoxinas	
Epibatidina	<i>Epipedobates tricolor</i> en 1976	Este compuesto tiene acción en los receptores nicotínicos (una de las dos clases de receptores del neurotransmisor acetilcolina, que se encuentra a lo largo de los sistemas nervioso central y periférico). La Epibatidina, representa una nueva clase de analgésicos siendo aproximadamente 200 veces más potente que la morfina, y que además, no propicia el desarrollo de tolerancia (Chivian y Bernstein, 2015).		
Decahidroquinolinas	<i>Dendrobates pumilio</i> en 1969	Esta clase de alcaloides, inicialmente fue asignada con el nombre de pumiliotoxina C, sin embargo, ya no es empleado por una posible confusión con las pumiliotoxinas verdaderas, teniendo en cuenta la baja toxicidad de las decahidroquinolinas (Daly et al., 2005).	Actualmente cerca de 50 alcaloides, incluyendo en algunos casos cuatro esteroisómeros, son considerados miembros de la clase 2,5-decahidroquinolina di sustituida	

Tabla 1. Alcaloides lipofílicos más comunes en la piel de Tabla 1. Alcaloides lipofílicos más comunes en la piel de dendrobátidos (continuación).

Nombre del Alcaloide	Aislado a partir de	Propiedades	Principales alcaloides (Homólogos)	Estructura Química según Daly et al., 2005.
5,8-Indolizidinas Disustituidas	<i>Dendrobates pumilio</i> en 1987	Las estructuras de las 5,8 – Indolizidinas disustituidas, fueron descritas gracias al análisis de espectroscopia RMN. En algunos clases pueden alcanzar niveles de 100 µg por rana, Varios de estos alcaloides han sido referidos como potentes bloqueadores no competitivos de los colino receptores ionotrópicos (Celis, 2005).	Actualmente esta clase es la más grande de alcaloides encontrados en la piel de anuros, con cerca de 80 muestras (incluyendo estereoisómeros).	
5,6,8-Indolizidinas Trisustituidas	<i>Dendrobates pumilio</i> en 1997	Se estima que los niveles presentes de este alcaloide pueden ser sobre los 50 µg por rana. La mayoría de los demás alcaloides de esta clase se encuentran como trazas de alcaloides. Hasta la actualidad no se ha informado sobre toxicidad o actividad biológica para estos alcaloides (Daly et al., 2005).	La mayoría de estructuras de esta clase son tentativas y son basadas en análisis espectrales de masas y en algunos casos por espectros FTIR.	
Pirrolizidinas Disustituidas	Sapo Bufónico (<i>Melanophryniscus</i>) en 1980	Se sabe que dichas pirrolizidinas se encuentran en hormigas mirmicinas. Actualmente cerca de 26 alcaloides, incluyendo estereoisómeros, son asignados a esta clase. Estos alcaloides se encuentran con frecuencia en la mayoría de los dendrobátidos, mantélicos y bufónicos productores de alcaloides, pero solo en menores cantidades. Su toxicidad aparente aún no ha sido investigada (Celis, 2005).	Los estereoisómeros cis y trans, son los que en este grupo tienen una relevancia más definida.	

Tabla 2. Localidad, fecha y codificación de las muestras colectadas (Cipriani, 2006).

Muestra	Especie	Nº Especímenes	Localidad	Fecha de colección	Serie de Campo
1	<i>Epipedobates tricolor</i>	5	Palo seco Moraspungo Cotopaxi	junio 4 del 2005	SC 15159
					SC 15160
					SC 15161
					SC 15162
					SC 15163
2	<i>Epipedobates tricolor</i>	5	Palo seco Moraspungo Cotopaxi	junio 4 del 2005	SC 15158
					SC 15173
					SC 15174
					SC 15175
					SC 15176
3	<i>Epipedobates tricolor</i>	5	Palo seco Moraspungo Cotopaxi	junio 4 del 2005	SC 15165
					SC 15166
					SC 15167
					SC 15168
					SC 15169
4	<i>Epipedobates tricolor</i>	3	Palo seco Moraspungo Cotopaxi	junio 4 del 2005	SC 15170
					SC 15171
					SC 15172
					SC 15177
5	<i>Epipedobates darwinwallacei</i>	5	Mindo	junio 18 del 2005	SC 15178
					SC 15179
					SC 15180
					SC 15181

Tabla 2. Localidad, fecha y codificación de las muestras colectadas (Cipriani, 2006) (continuación...).

Muestra	Especie	Nº Especímenes	Localidad	Fecha de colección	Serie de Campo
6	<i>Epipedobates boulengeri</i>	5	Borbón Esmeraldas	junio 9 del 2005	SC 15201
					SC 15202
					SC 15203
					SC 15204
					SC 15205
7	<i>Epipedobates boulengeri</i>	5	Borbón Esmeraldas	junio 9 del 2005	SC 15206
					SC 15207
					SC 15208
					SC 15209
					SC 15210
8	<i>Epipedobates boulengeri</i>	5	Borbón Esmeraldas	junio 9 del 2005	SC 15196
					SC 15197
					SC 15198
					SC 15199
					SC 15200
9	<i>Epipedobates anthonyi</i> Población 7	5	Santa Isabel Provincia Azuay	agosto 17 del 2005	SC 15980
					SC 15981
					SC 15982
					SC 15983
					SC 15984
10	<i>Epipedobates anthonyi</i> Población 7	5	Santa Isabel Provincia Azuay	agosto 17 del 2005	SC 15985
					SC 15986
					SC 15987
					SC 15988
					SC 15989

Tabla 2. Localidad, fecha y codificación de las muestras colectadas (Cipriani, 2006) (continuación).

Muestra	Especie	Nº Especímenes	Localidad	Fecha de colección	Serie de Campo
11	<i>Epipedobates anthonyi</i> Población 7	5	Santa Isabel Provincia Azuay	agosto 17 del 2005	SC 15990
					SC 15991
					SC 15992
					SC 15993
					SC 15994
12	<i>Epipedobates anthonyi</i> Población 7	5	Santa Isabel Provincia Azuay	agosto 17 del 2005	SC 15995
					SC 15996
					SC 15997
					SC 15998
					SC 15999
13	<i>Epipedobates anthonyi</i> Población 8	5	Santa Isabel Provincia Azuay	agosto 18 del 2005	SC 15256
					SC 15257
					SC 15258
					SC 15259
					SC 15260
14	<i>Epipedobates anthonyi</i> Población 8	5	Santa Isabel Provincia Azuay	agosto 19 del 2005	SC 15271
					SC 15272
					SC 15273
					SC 15274
					SC 15275
15	<i>Epipedobates anthonyi</i> Población 8	5	Santa Isabel Provincia Azuay	agosto 20 del 2005	SC 15286
					SC 15287
					SC 15288
					SC 15289
					SC 15290

Tabla 3. Instrumentación y condiciones cromatográficas utilizadas por Cipriani, en el 2006, para el análisis de alcaloides lipofílicos provenientes de la piel de dendrobátidos, mediante GC-MS.

Instrumentación	Condiciones Cromatográficas
Software no especificado	Gas portador Helio grado 4.5
Cromatógrafo de Gases, Hewlett Packard 5890, Series II	Programación de temperatura de columna 100 °C a 300 °C Tiempo isotérmico a temperatura final 10 min
Detector de Masas no especificado	Volumen de inyección de 1 µL
Columna cromatográfica, DB550 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano, 30m x 0.25 mm	Temperatura de la columna razón de programación 10°/ min Temperatura del detector e Inyector 250 °C

Tabla 4. Instrumentación y condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de alcaloides lipofílicos provenientes de la piel de dendrobátidos, mediante GC-MS.

Instrumentación	Condiciones Cromatográficas GC
Software ChemStation Data Analysis	Gas portador Helio grado 4.5
Cromatógrafo de Gases Agilent 7890	Flujo de 1.2524 mL/min
Detector de Masas Agilent 5977	Volumen de inyección de 1 µL
Columna cromatográfica Agilent DB-5ms, 30 m x 320 µm x 1 µm.	Temperatura horno y duración: inicial 50-70°C (1 min) 100-280°C: (1 min), 5°C/min 280-300°C: (20min), 5°C/min
Biblioteca de Espectros NIST MS Search	Temperatura del detector e Inyector 300 °C
Condiciones MS	
Modo de adquisición SCAN (35-500)	Energía de 70.007 eV.
MS Source: 280 °C máximo de 300 °C	MS Quad: 150 °C máximo de 200 °C

Tabla 5. Instrumentación y condiciones cromatográficas utilizadas para la separación de alcaloides lipofílicos provenientes de la piel de dendrobátidos, mediante HPLC.

Instrumentación	Condiciones Cromatográficas	Reactivos
Software Empower Pro	Acondicionamiento y limpieza de columna con metanol y acetonitrilo	metanol (grado cromatográfico)
HPLC de tipo modular, marca Waters:	Tiempo de corrida: 80 minutos	Acetonitrilo (grado cromatográfico)
Bomba Binaria Waters 1525	Flujo de 2 mL/min	ácido acético glacial (grado analítico)
Columna de fase reversa Waters X Bridge, Peptide BEH C18, 10 mm x 250mm	Volumen de inyección de 250 µL	
Detector UV-Vis Waters 2489	Longitud de onda del detector a 214 y 260 nm	
Automuestreador Waters 2707	Temperatura del Horno a 23 °C	
Colector de Fracciones Waters tercera generación.	Tiempo de recolección de fracciones cada 4 minutos Modo gradiente de elución.	

Tabla 6. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A1), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)

Estudio actual (muestra A1)		Estudio realizado por Cipriani en el 2006 (muestra A1)	
Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase	Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase
1,4 Quinolizidina	28,119 (207I)Cis	1,4 Quinolizidina	11.990 (231A)
5,6,8 Indolizidina	24,357 (NE)	5,6,8 Indolizidina	9.747 (223A)
5,6,8 Indolizidina	24,367 (NE)	5,6,8 Indolizidina	10.174
5,6,8 Indolizidina	28,616 (277E)	5,6,8 Indolizidina	(223A-Isómero)
5,8 Indolizidina	28,264 (209B)	5,6,8 Indolizidina	10.927 (NE)
Decahidroquinolina	20,595	5,6,8 Indolizidina	12.271 (NE)
Deoxypumiliotoxina	26,564	5,8 Indolizidina	8.471 (NE)
Deoxypumiliotoxina	28,824 (251H)	5,8 Indolizidina	11.895 (203A)
Deoxypumiliotoxina	28,958 (251H)	Decahidroquinolina	8.377 (NE)
Indolizidina	25,984 (NE)	Decahidroquinolina	8.683 (NE)
Indolizidina	27,880 (231C)	Decahidroquinolina	8.971 (NE)
Decahidroquinolina	21,155 (195A)	Tricíclico	9.3134 (NE)
5,8 Indolizidina	34,948 (NE)	Tricíclico	11.097 (NE)
Alopumiliotoxina	40,223 (341A)	Tricíclico	16.237 (NE)
		Indolizidina	12.132 (NE)
		Pumiliotoxina	19.711 (NE)
		Posible Alcaloide	14.088 (NE)
		Posible Alcaloide	16.713 (NE)

Tabla 7. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)

Estudio actual (muestra A2)		Estudio realizado por Cipriani en el 2006 (muestra A2)	
Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase	Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase
4,6 Quinolizidina	20,595 (NE)	1,4 Quinolizidina	14,515 (231A)
3,5 Pirrolizidina	29,238	5,8 Indolizidina	8,567
5,8 Indolizidina	27,186 (223J)	5,8 Indolizidina	11,567
5,8 Indolizidina	30,762	5,8 Indolizidina	14,160
5,8 Indolizidina	32,275 (NE)	8-Deoxypumiliotoxina	12,291
Octahydrohistrionicotoxina	35,549 (NE)	Alopumiliotoxina	18,789
Octahydrohistrionicotoxina	37,788 (291A)	Decahidroquinolina	10,687
Alopumiliotoxina	41,405 (323B)	Homopumiliotoxina	15,768
Benzocaína	24,305	Indolizidina	11,919
β -Lumicolchicina	69,623	Pumiliotoxina	12,152
Decahidroquinolina	35,435 (275B)Cis	Pumiliotoxina	18,948 (323F)
Deoxypumiliotoxina	28,710 (249)	Sin clasificación	9,179
Deoxypumiliotoxina	28,948 (251H)		
Piperidina	31,300 (NE)		
Pumiliotoxina A	37,995		
Pumiliotoxina B	41,715		
Pumiliotoxina	28,378 (251D)		
Pumilotoxina	36,057 (277B)		

Tabla 8. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)

Estudio actual (muestra A3)		Estudio realizado por Cipriani en el 2006 (muestra A3)	
Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase	Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase
3,5 Indolizidina	31,549 (275C)	Compuesto clase	
		Epibatidina	12,912
		Compuesto clase	
3,5 Pirrolizidina	24,243 (223H)Cis	Epibatidina	12,937
3,5 Pirrolizidina	29,238 (223H)Cis	Homopumiliotoxina	9,369
3,5 Pirrolizidina	31,135 (239K)Cis	Indolizidina	12,039
3.5 Pirrolizidina	29,373 (239K)Cis	Indolizidina	12,297
5,8 Indolizidina	20,906 (NE)	Pumiliotoxina	11,920
5,8 Indolizidina	25,373 (219F)	Pumiliotoxina	12,133 (251D)
5,8 Indolizidina	27,186 (223J)	Tricíclico	9,394
7 Cloro,4 metil Quinolina	24,616		
Deoxypumiliotoxina	22,264(221)		
Deoxypumiliotoxina	28,710 (249)		
Epibatidina	29,870 (208/210)		
Indolizidina	22,751(NE)		
Indolizidina	31,746 (NE)		
Piperidina	31,290		
Pumiliotoxina	28,378 (251D)		
Pumiliotoxina A	38,441		
Pumiliotoxina B	41,715		
Tricíclico	21,828 (205B)		
y-Lumicolchicina	69,623		

Tabla 9. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A4), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)

Estudio actual (muestra A4)		Estudio realizado por Cipriani en el 2006 (muestra A4)	
Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase	Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase
5,6,8 Indolizidina	25,932 (231B)	1,4 Quinolizidina	11,77
5,6,8 Indolizidina	31,663 (NE)	8-Deoxypumiliotoxina	12,365
Alopumiliotoxina	40,233 (341A)	Alopumiliotoxina	18,94
Benzocaína	24,264	Deoxypumiliotoxina	9,179
Deoxypumiliotoxina	24,357 (235V)	Deoxypumiliotoxina	9,393
Deoxypumiliotoxina	25,507 (251H)	Deoxypumiliotoxina	13,802
Deoxypumiliotoxina	27,290 (251H)	Homopumiliotoxina	13,479
Deoxypumiliotoxina	28,948 (251H)	Homopumiliotoxina	15,787
Deoxypumiliotoxina	26,585 (251H)	Pumiliotoxina	12,182 (251D)
Deoxypumiliotoxina	22,264 (221)	Pumiliotoxina	12,859 (251D)
Deoxypumiliotoxina	28,699 (249)	Pumiliotoxina	14,540
Homopumiliotoxina	31,021 (NE)		
Homopumiliotoxina	35,570 (NE)		
Pumiliotoxina B	41,715		
Tricíclico	22,523 (193C)		
γ -Lumicolchicina	69.613		

Tabla 10. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)

Estudio actual (Muestra S)		Estudio realizado por Cipriani en el 2006 (Muestra S)	
Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase	Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase
1 metil, 2 (5 hexenil),5 (8nonenil) Pirrolidina	27,736	Decahidroquinolina	8.473 (195A)
1,4 Quinolizidina	32,555 (NE)	8-Deoxypumiliotoxina	9.723 (NE)
2,(4 pentenil),6pentil, Piperidina	30,171	Alopumiliotoxina	12.180 (NE)
2,6 dibutil, 4 metil, Piperidina	29,632 (NE)	Decahidroquinolina	8.709 (Isómero 195A)
3,5 Indolizidina	23,570 (223AB)	Decahidroquinolina	9.346 (NE)
3,5 Indolizidina	18,419 (195B)	Decahidroquinolina	10.761 (NE)
3,5 Indolizidina	23,020 (NE)	Decahidroquinolina	10.956 (NE)
3,5 Indolizidina	23,145 (223AB)	Estér metílico de ácido graso	14.070
3,5 Indolizidina	27,850 (239Q)	Homopumiliotoxina	11.188 (NE)
3,5 Indolizidina	22,834 (223AB)	Homopumiliotoxina	11.326 (NE)
3,5 Indolizidina	22,855 (223AB)	Sin identificar	11.822
3,5 Indolizidina	32,389 (NE)	Tricíclico	9.679 (223 P)
3,5,8 Indolizidina	28,192 (239)		
3,5,8 Indolizidina	28,461 (239)		
4,6 Quinolizidina	19,891 (195C)		
4,6 Quinolizidina	20,595 (195C)		
4,6 Quinolizidina	24,875 (NE)		
4,6 Quinolizidina	25,093 (195C)		
4,6 Quinolizidina	29,964 (NE)		
5,8 Indolizidina	22,751 (203A)		
5,8 Indolizidina	25,632 (217B)		
5,8 Indolizidina	25,891 (217B)		
5,8 Indolizidina	20,015 (NE)		
Octahydrohistrionicotoxina	37,788 (291A)		
Octahidroquinolina	36,306		
Alopumiliotoxina	41,394 (323B)		
Carnegina	27,363		
Decahidroquinolina	21,155 (195A)		
Decahidroquinolina	20,772 (195A)		
Decahidroquinolina	25,466 (223F)Cis		
Decahidroquinolina	26,202		
Decahidroquinolina	26,969 (211A)		
Decahidroquinolina	27,124 (223F)		
D-Limoneno	9,610		
Tricíclico	22,513 (193C)		
Y-Lumicolchicina	69,582		
Pineno	8,450		
Pumiliotoxina B	41,716		
Terpineno	10,305		

Tabla 11. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie *Epipedobates boulengeri* (muestra B1), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)

Estudio actual (muestra B1)		Estudio realizado por Cipriani en el 2006 (muestra B1)	
Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase	Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase
1,4 Quinolizidina	28,119 (231A)Trans	1,4 Quinolizidina	14,351 (257C)
2,6 dibutil, 4metil Piperidina	25,010 (NE)	3,5 Indolizidina	13,737 (275D)
3,5 Indolizidina	18,419 (NE)	5,6,8 Indolizidina	7,153
3,5 Indolizidina	19,393 (195B)	5,8 Indolizidina	7,814
3,5 Indolizidina	22,855 (223AB)	5,8 Indolizidina	9,586
3,5 Indolizidina	31,549 (275C)	5,8 Indolizidina	10,759
3,5 Pirrolizidina	29,238 (223H)Cis	Deoxypumiliotoxina	10,264 (235V)
3 butil-Indolizidina	21,342	Histrionicotoxina	16,945 (291A)
5,6,8 Indolizidina	17,756 (NE)	Histrionicotoxina	16,970 (291A)
5,6,8 Indolizidina	20,056 (NE)	Pirrolizidina	13,428 (222)
5,6,8 Indolizidina	21,901 (277E)	Polyzonimina	5,618 (151B)
5,6,8 Indolizidina	22,233 (NE)	Pumiliotoxina	12,112 (251D)
5,8 Indolizidina	22,699 (205A)	Espiro-Pirrolizidina	11,942 (236A)
5,8 Indolizidina	23,217 (203A)		
5,8 Indolizidina	25,352 (217B)		
5,8 Indolizidina	25,642 (217B)		
5,8 Indolizidina	25,943 (219F)		
5,8 Indolizidina	26,347 (219L)		
5,8 Indolizidina	30,430 (241F)		
Octahydrohistrionicotoxina	37,850 (291A)		
β -Lumicolchicina	69,665		
Deoxyhomopumiliotoxina	18,606 (NE)		
Deoxyhomopumiliotoxina	20,419 (193F)		
Deoxypumiliotoxina	20,989 (193F)		
Indolizidina	20,730 (NE)		
Indolizidina	38,016 (287C)		
Indolizidina	39,415 (287C)		
Indolizidina	20,823 (NE)		
Histrionicotoxina	38,669 (285A)		
Homopumiliotoxina	28,844 (251R)		
Homopumiliotoxina	29,021 (265N)		
Isotetrahistrionicotoxina	38,866		
Licopodina	32,617		
Polizonimina	14,533 (151B)		
Pumiliotoxina	26,088 (237A)		

Tabla 11. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie *Epipedobates boulengeri* (muestra B1), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS) (continuación).

Estudio actual (muestra B1)		Estudio realizado por Cipriani en el 2006 (muestra B1)	
Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase	Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase
Pumiliotoxina	28,378 (251D)		
Pumiliotoxina A	38,41		
Pumiliotoxina A	38,43		
Pumiliotoxina B	41,726		
Espiro Pirrolizidina	27,808 (236)		
Espiroirizidina	30,907 (222)		

Tabla 12. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie *Epipedobates boulengeri* (muestra B2), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)

Estudio actual (muestra B2)		Estudio realizado por Cipriani en el 2006 (muestra B2)	
Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase	Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase
2 metil, 6 hexa, 3,5 dienil, Quinolizidina	19,891	1,4 Quinolizidina	14,329 (257C)
3 butil-Indolizidina	21,342	3,5 Indolizidina	13,759 (275D)
3,5 Indolizidina	18,409 (NE)	5,6,8 Indolizidina	7,104
3,5 Indolizidina	19,393 (195B)	5,8 Indolizidina	7,951
3,5 Indolizidina	22,855 (223AB)	5,8 Indolizidina	10,621
3,5 Indolizidina	31,539 (275C)	5,8 Indolizidina	10,785
3,5 Pirrolizidina	26,098 (NE)	Deoxypumiliotoxina	10,265 (235V)
4,6 Quinolizidina	20,025 (195C)	Histrionicotoxina	16,966 (291A)
5,6,8 Indolizidina	17,756 (235E)	Histrionicotoxina	17,203 (291A)
5,6,8 Indolizidina	21,901 (277E)	Pirrolizidina	13,381 (222)
5,6,8 Indolizidina	22,222 (NE)	Polyzonimina	5,575 (151B)
5,6,8 Indolizidina	28,606 (277E)	Espiro-Pirrolizidina	11,852 (236A)
5,8 Indolizidina	22,699 (205A)	Tricíclico	8,949 (235AA)
5,8 Indolizidina	23,217 (203A)		
5,8 Indolizidina	25,342 (217B)		

Tabla 12. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie *Epipedobates boulengeri* (muestra B2), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS) (continuación).

Estudio actual (muestra B2)		Estudio realizado por Cipriani en el 2006 (muestra B2)	
Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase	Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase
5,8 Indolizidina	25,632 (217B)		
5,8 Indolizidina	30,440 (241F)		
5.8 Indolizidina	17,974 (219L)		
Octahydrohistrionicotoxina	37,829 (291A)		
Alopumiliotoxina	40,223 (341A)		
Decahidroquinolina	19,279 (NE)		
Deoxyhomopumiliotoxina	18,606 (NE)		
Deoxyhomopumiliotoxina	20,430 (NE)		
Deoxyhomopumiliotoxina	20,989 (193F)		
D-Limoneno	9,610		
Indolizidina	20,730 (NE)		
Histrionicotoxina	38,669(285A)		
Homopumiliotoxina	29,021 (NE)		
Licopodina	32,6170		
Polizonimina	14,523 (151B)		
Pumiliotoxina	34,772 (NE)		
Pumiliotoxina A	38,420		
Pumiliotoxina B	41,716		
Espiro Pirrolizidina	27,808 (236)		
Espiro Pirrolizidina	30,927 (222)		

Tabla 13. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie *Epipedobates tricolor* (muestra T1), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)

Estudio actual (muestra T1)		Estudio realizado por Cipriani en el 2006 (muestra T1)	
Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase	Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase
1,4 Quinolizidina	18,605 (NE)	3,5 Indolizidina	10,193
1,4 Quinolizidina	28,938 (NE)	3,5 Indolizidina	10,193
3 butil-Indolizidina	16,636	5,8 Indolizidina	9,515
3,5 Indolizidina	18,419 (195B)	5,8 Indolizidina	9,863 (221A)
3,5 Pirrolizidina	24,243 (223H) Cis	6,7 dihydro,5, 8 Indolizidina	10,668

Tabla 13. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie *Epipedobates tricolor* (muestra T1), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS) (continuación).

Estudio actual (muestra T1)		Estudio realizado por Cipriani en el 2006 (muestra T1)	
Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase	Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase
3,5 Pirrolizidina	25,601 (NE)	Alopumiliotoxina	18,809
3,5 Pirrolizidina	31,694 (239K) Cis		
3 butil-Indolizidina	23,787		
5,8 Indolizidina	25,352 (217B)		
5,8 Indolizidina	25,891 (217B)		
5,8 Indolizidina	26,098 (NE)		
5,8 Indolizidina	27,186 (223J)		
5,8 Indolizidina	28,005 (NE)		
5,8 Indolizidina	28,129 (243C)		
5,8 Indolizidina	29,166 (NE)		
5,8 Indolizidina	29,269 (NE)		
5,8 Indolizidina	29,435 (243C)		
5,8 Indolizidina	38,513 (NE)		
6,7dihidro, 5,8 Indolizidina	24,740 (NE)		
Octahidroquinolina	21,549 (193D)		
Octahidroquinolina	23,093 (193D)		
Alopumiliotoxina	40,233 (341A)		
Alopumiliotoxina	41,404 (323B)		
Decahidroquinolina	25,476 (223F) Cis		
Decahidroquinolina	27,704 (NE)		
Decahidroquinolina	34,130 (NE)		
Deoxyhomopumiliotoxina	20,419 (193F)		
Eltoprazina	26,730		
Indolizidina	20,730 (NE)		
Lehmizidina	34,420 (275A)		
Piperidina	31,280 (197E) Cis		
Pumiliotoxina	28,378 (251D)		
Pumiliotoxina B	41,726		
Sparteína	33,736		
y-Lumicolchicina	69,623		
Decahidroquinolina	25,476 (223F) Cis		

Tabla 14. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie *Epipedobates tricolor* (muestra T2), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS)

Estudio actual (muestra T2)		Estudio realizado por Cipriani en el 2006 (muestra T2)	
Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase	Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase
1,4 Quinolizidina	28,938 (NE)	Sin clasificación	6,23 (183C)
3,5 Indolizidina	18,419 (195B)	5,8 Indolizidina	7,677
3,5 Pirrolizidina	18,616 (NE)	5,8 Indolizidina	9,437
3,5 Pirrolizidina	31,694 (239K)	5,8 Indolizidina	16,523
3,5 Pirrolizidina	24,243 (223H) Cis	6,7 dihydro, 5,8 Indolizidina	10,645
3,5 Pirrolizidina	25,601 (NE)	Alopumiliotoxina	18,809
3 butil-Indolizidina	16,647	Decahidroquinolina	8,516
3 butil-Indolizidina	31,549	Decahidroquinolina	13,755
4,6 Quinolizidina	19,891 (195C)	Decahidroquinolina	11,089
4,6 Quinolizidina	20,015 (195C)	Izidina	10,926 (223I)
5,6,8 Indolizidina	29,964 (NE)	Precoccinelina	9,768 (193C)
5,8 Indolizidina	17,756 (NE)	Pumiliotoxina	12,133 (21D)
5,8 Indolizidina	22,740 (NE)	Pumiliotoxina	17,252 (307B)
5,8 Indolizidina	23,497 (203A)	Sin clasificación	10,382 (267I)
5,8 Indolizidina	25,352 (217B)		
5,8 Indolizidina	25,901 (217B)		
5,8 Indolizidina	26,098 (NE)		
5,8 Indolizidina	27,186 (223J)		
5,8 Indolizidina	28,005 (NE)		
5,8 Indolizidina	28,129 (243C)		
5,8 Indolizidina	29,176 (NE)		
5,8 Indolizidina	29,280 (NE)		
5,8 Indolizidina	29,435 (243C)		
6,7 dihydro 5,8 Indolizidina	23,373 (NE)		
6,7 dihydro 5,8 Indolizidina	24,730 (179)		
8-hidroquinolina	21,549 (193D)		
8-hidroquinolina	23,103 (193D)		

Tabla 14. Comparación de alcaloides lipofílicos de la especie *Epipedobates tricolor* (muestra T2), identificados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS) (continuación).

Estudio actual (muestra T2)		Estudio realizado por Cipriani en el 2006 (muestra T2)	
Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase	Alcaloides identificados	Tiempo de Retención (min) Clase
Alopumiliotoxina	40,233 (341A)		
Alopumiliotoxina	41,394 (323B)		
β -Lumicolchicina	69,613		
Decahidroquinolina	34,130 (NE)		
Decahidroquinolina	25,466 (223F) Cis		
Decahidroquinolina	27,704 (NE)		
Deoxyhomopumiliotoxina	20,409 (193F)		
Eltoprazina	26,720		
Indolizidina	13,258 (NE)		
Indolizidina	20,730 (207A)		
Lehmizidina	34,420 (275A)		
Lehmizidina	35,301 (275A)		
Piperidina	31,290 (NE)		
Pumiliotoxina	28,378 (251D)		
Pumiliotoxina A	38,41		
Pumiliotoxina B	41,736		
Senkyunolida N	30,730		
Sparteína	33,736		

Tabla 15. Propiedades físicas de alcaloides lipofílicos de configuración absoluta muestras *Epipedobates anthonyi* y *darwinwallacei* (NIH, 2018).

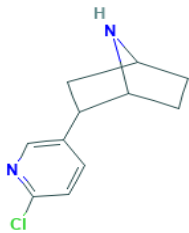
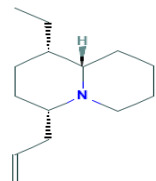
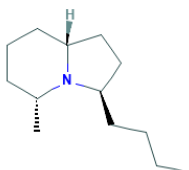
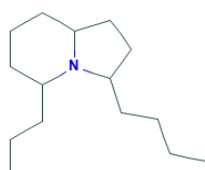
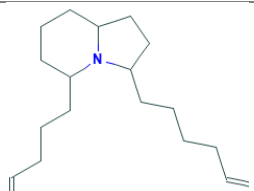
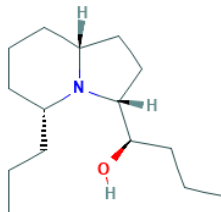
Nombre del Alcaloide	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)	GC-MS	Estructura Química (NIH, 2018)
Epibatidina	C ₁₁ H ₁₃ ClN ₂	208.689	Picos Totales: 95 Pico Superior (1); 69 Pico Superior (2); 68 Pico Superior (3); 140	
1,4-Quinolizidina (207I)	C ₁₄ H ₂₅ N	207.361	Picos Totales: 65 Pico Superior (1); 166 Pico Superior (2); 167 Pico Superior (3); 110	
3,5-Indolizidina (195B)	C ₁₃ H ₂₅ N	195.35	Picos Totales: 45 Pico Superior (1); 138 Pico Superior (2); 139 Pico Superior (3); 180	
3,5-Indolizidina (223AB)	C ₁₅ H ₂₉ N	223.404	Picos Totales: 34 Pico Superior (1); 166 Pico Superior (2); 180 Pico Superior (3); 167	
3,5-Indolizidina (275C)	C ₁₉ H ₃₃ N	275.48	Picos Totales: 97 Pico Superior (1); 192 Pico Superior (2); 206 Pico Superior (3); 193	
3,5-Indolizidina (239Q)	C ₁₅ H ₂₉ NO	239.403	Picos Totales: 85 Pico Superior (1); 166 Pico Superior (2); 167 Pico Superior (3); 196	

Tabla 15. Propiedades físicas de alcaloides lipofílicos de configuración absoluta muestras *Epipedobates anthonyi* y *darwinwallacei* (NIH, 2018) (continuación...).

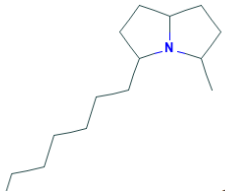
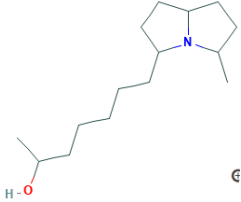
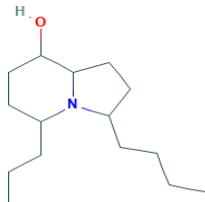
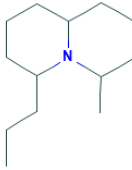
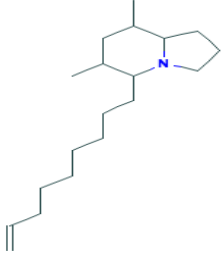
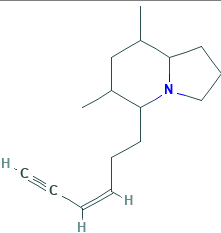
Nombre del Alcaloide	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)	GC-MS	Estructura Química (NIH, 2018)
3,5-Pirrolizidina (223H) Cis	C ₁₅ H ₂₉ N	223.404	Picos Totales: 65 Pico Superior (1); 124 Pico Superior (2); 125 Pico Superior (3); 81	
3,5-Pirrolizidina (239K) Cis	C ₁₅ H ₂₉ NO	239.403	Picos Totales: 38 Pico Superior (1); 124 Pico Superior (2); 125 Pico Superior (3); 224	
3,5,8 Indolizidina (239)	C ₁₅ H ₂₉ NO	239.403	Picos Totales: 55 Pico Superior (1); 182 Pico Superior (2); 196 Pico Superior (3); 183	
4,6-Quinolizidina (195C)	C ₁₆ H ₂₅ N	231.383	Picos Totales: 87 Pico Superior (1); 152 Pico Superior (2); 110 Pico Superior (3); 153	
5,6,8 Indolizidina (277E)	C ₁₉ H ₃₅ N	277.496	Picos Totales: 67 Pico Superior (1); 152 Pico Superior (2); 153 Pico Superior (3); 110	
5,6,8 Indolizidina (231B)	C ₁₉ H ₃₅ N	277.496	Picos Totales: 67 Pico Superior (1); 152 Pico Superior (2); 153 Pico Superior (3); 110	

Tabla 15. Propiedades físicas de alcaloides lipofílicos de configuración absoluta muestras *Epipedobates anthonyi* y *darwinwallacei* (NIH, 2018) (continuación...).

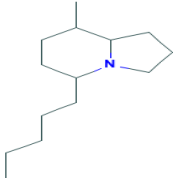
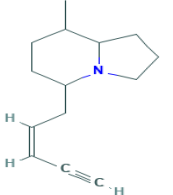
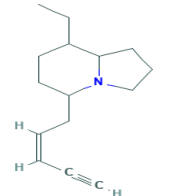
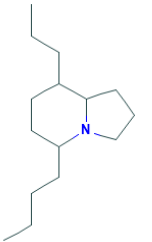
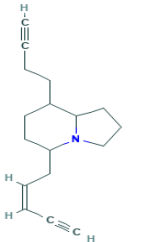
Nombre del Alcaloide	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)	GC-MS	Estructura Química (NIH, 2018)
5,8 Indolizidina (209B)	C ₁₄ H ₂₇ N	209.377	Picos Totales: 41 Pico Superior (1); 138 Pico Superior (2); 139 Pico Superior (3); 96	
5,8 Indolizidina (203A)	C ₁₄ H ₂₁ N	203.329	Picos Totales: 75 Pico Superior (1); 138 Pico Superior (2); 96 Pico Superior (3); 139	
5,8 Indolizidina (217B)	C ₁₅ H ₂₃ N	217.356	Picos Totales: 84 Pico Superior (1); 152 Pico Superior (2); 96 Pico Superior (3); 153	
5,8 Indolizidina (223J)	C ₁₅ H ₂₃ N	223.404	Picos Totales: 34 Pico Superior (1); 166 Pico Superior (2); 167 Pico Superior (3); 96	
5,8 Indolizidina (241F)	C ₁₇ H ₂₃ N	241.378	Picos Totales: 94 Pico Superior (1); 176 Pico Superior (2); 96 Pico Superior (3); 177	

Tabla 15. Propiedades físicas de alcaloides lipofílicos de configuración absoluta muestras *Epipedobates anthonyi* y *darwinwallacei* (NIH, 2018) (continuación...).

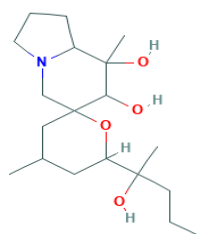
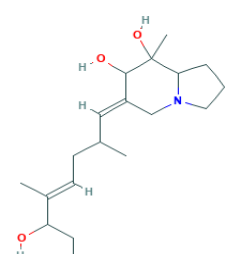
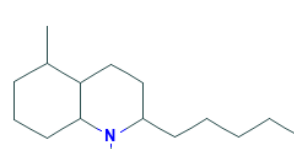
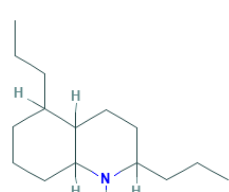
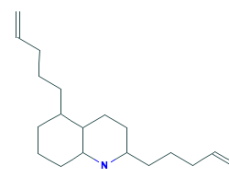
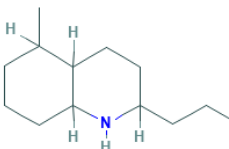
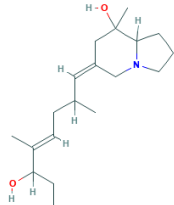
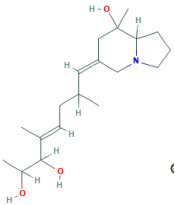
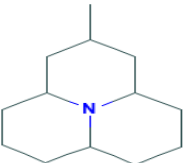
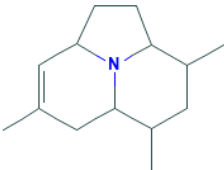
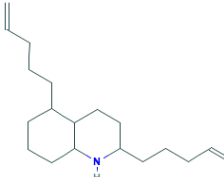
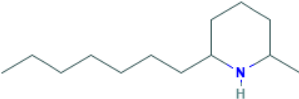
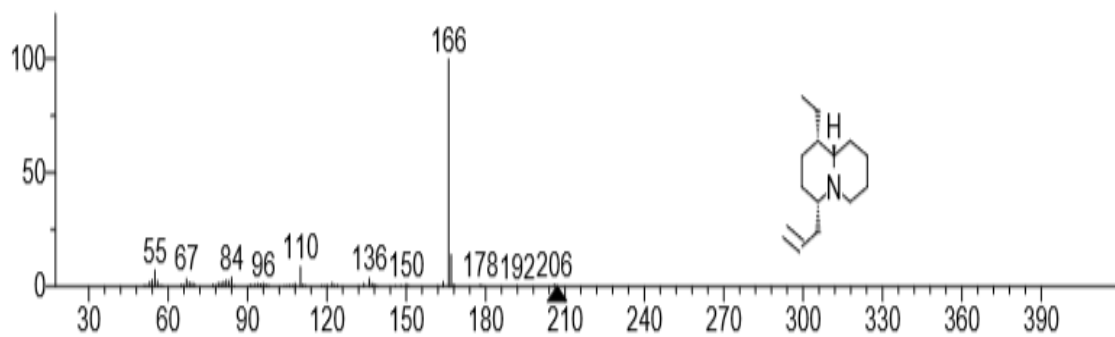
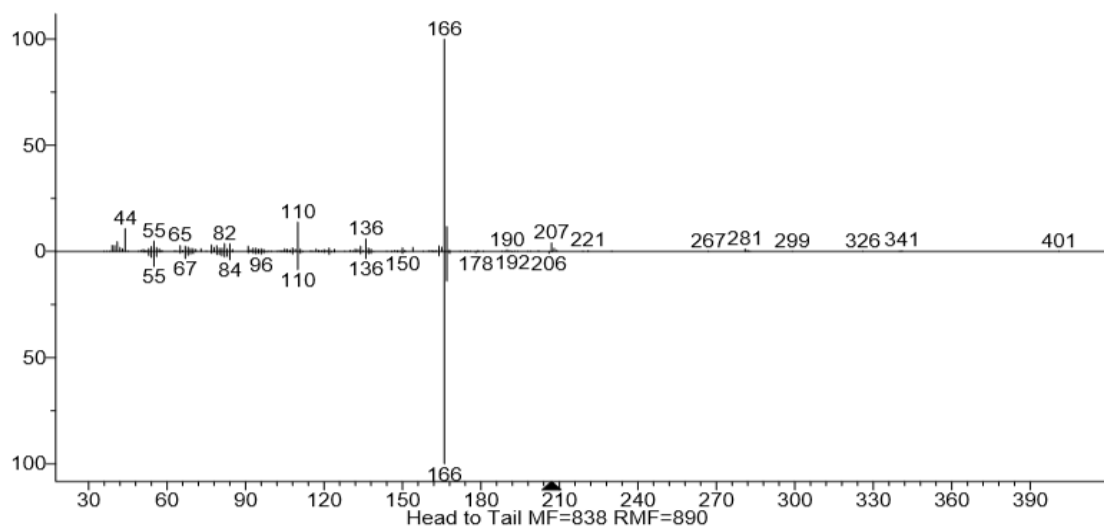
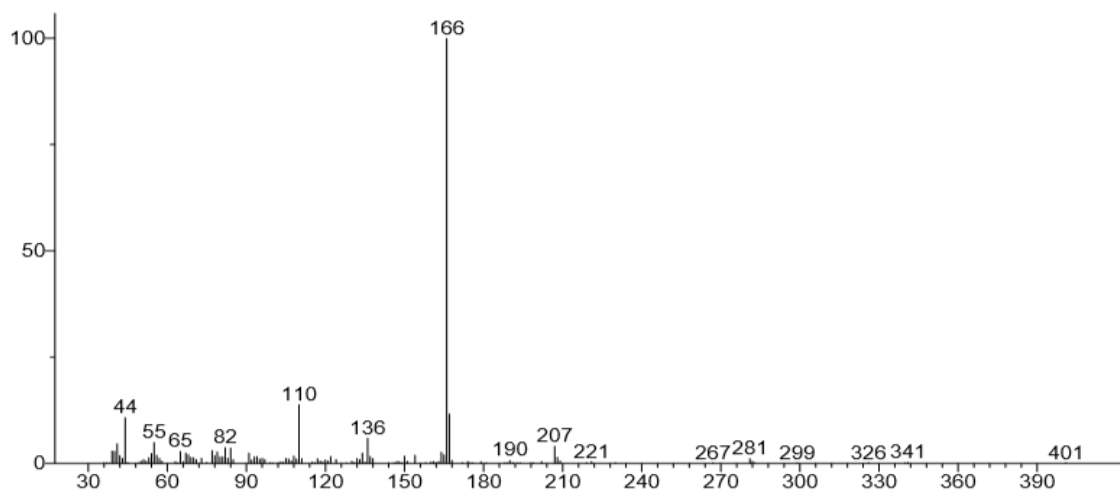
Nombre del Alcaloide	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)	GC-MS	Estructura Química (NIH, 2018)
Alopumiliotoxina (341A)	C ₁₉ H ₃₅ NO ₄	341.492	Picos Totales: 73 Pico Superior (1); 70 Pico Superior (2); 112 Pico Superior (3); 84	
Alopumiliotoxina (323B)	C ₁₉ H ₃₃ NO ₃	323.477	Picos Totales: 152 Pico Superior (1); 182 Pico Superior (2); 70 Pico Superior (3); 114	
Decahidroquinolina (223Q) Cis	C ₁₅ H ₂₉ N	223.404	Picos Totales: 88 Pico Superior (1); 152 Pico Superior (2); 180 Pico Superior (3); 153	
Decahidroquinolina (223F) Cis	C ₁₅ H ₂₉ N	223.404	Picos Totales: 62 Pico Superior (1); 180 Pico Superior (2); 181 Pico Superior (3); 81	
Decahidroquinolina (275B) Cis.	C ₁₉ H ₃₃ N	275.48	Picos Totales: 77 Pico Superior (1); 206 Pico Superior (2); 207 Pico Superior (3); 67	
Decahidroquinolina (195A) Cis.	C ₁₃ H ₂₅ N	195.35	Picos Totales: 49 Pico Superior (1); 152 Pico Superior (2); 153 Pico Superior (3); 55	

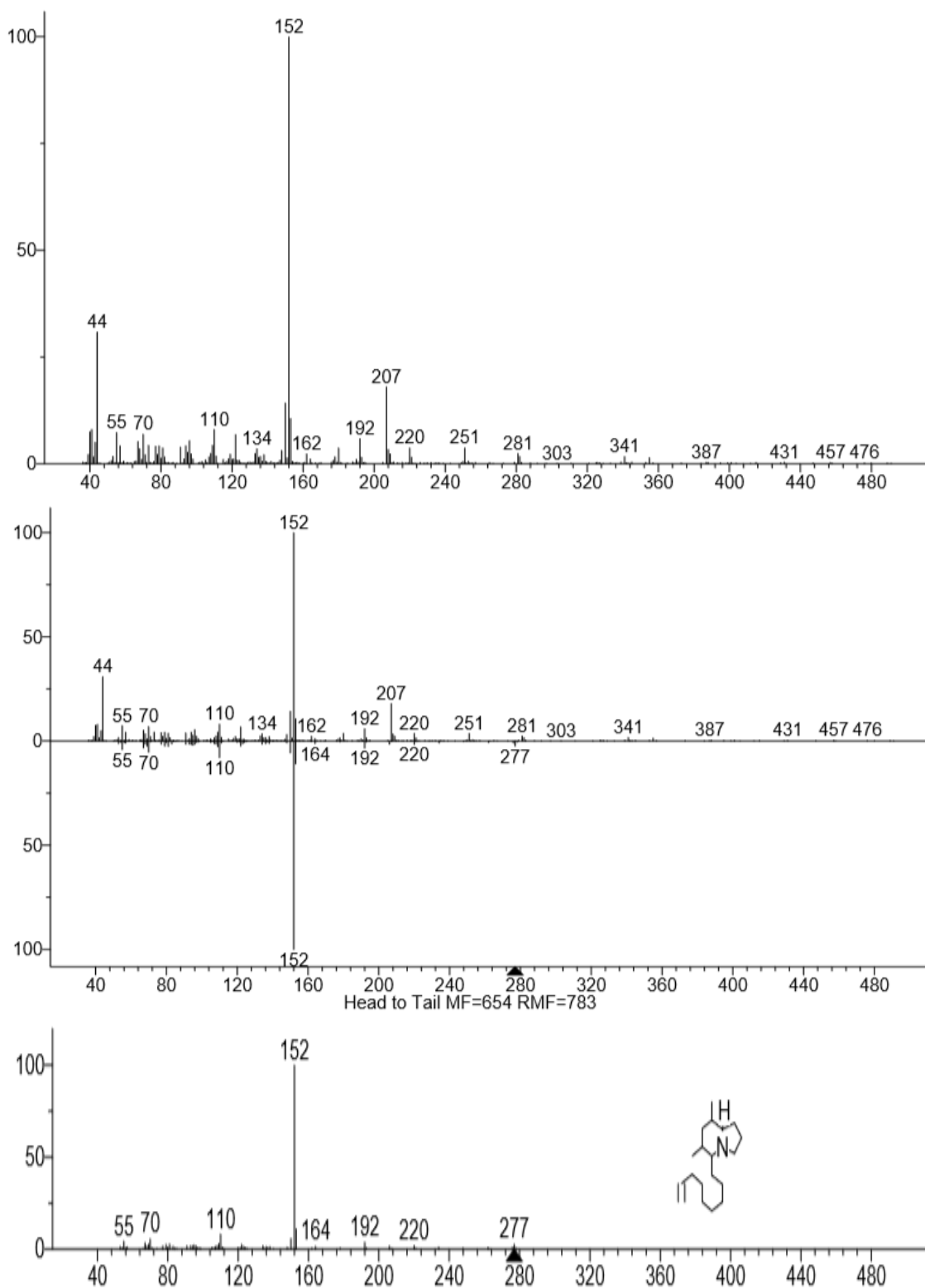
Tabla 15. Propiedades físicas de alcaloides lipofílicos de configuración absoluta muestras *Epipedobates anthonyi* y *darwinwallacei* (NIH, 2018) (continuación).

Nombre del Alcaloide	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)	GC-MS	Estructura Química (NIH, 2018)
Pumiliotoxina A	C ₁₉ H ₃₃ NO ₂	307.478	Picos Totales: 231 Pico Superior (1); 166 Pico Superior (2); 70 Pico Superior (3); 194	
Pumiliotoxina B	C ₁₉ H ₃₃ NO ₂	323.477	Picos Totales: 94 Pico Superior (1); 166 Pico Superior (2); 70 Pico Superior (3); 194	
Tricíclico (193C)	C ₁₃ H ₂₃ N	193.334	Picos Totales: 68 Pico Superior (1); 192 Pico Superior (2); 151 Pico Superior (3); 150	
Tricíclico (205B)	C ₁₄ H ₂₃ N	205.345	Picos Totales: 93 Pico Superior (1); 190 Pico Superior (2); 204 Pico Superior (3); 205	
Octahidroquinolina (193D)	C ₁₃ H ₂₃ N	193.334	Picos Totales: 60 Pico Superior (1); 150 Pico Superior (2); 151 Pico Superior (3); 193	
Piperidina (197E) Cis.	C ₁₃ H ₂₇ N	197.366	Picos Totales: 45 Pico Superior (1); 98 Pico Superior (2); 99 Pico Superior (3); 55	

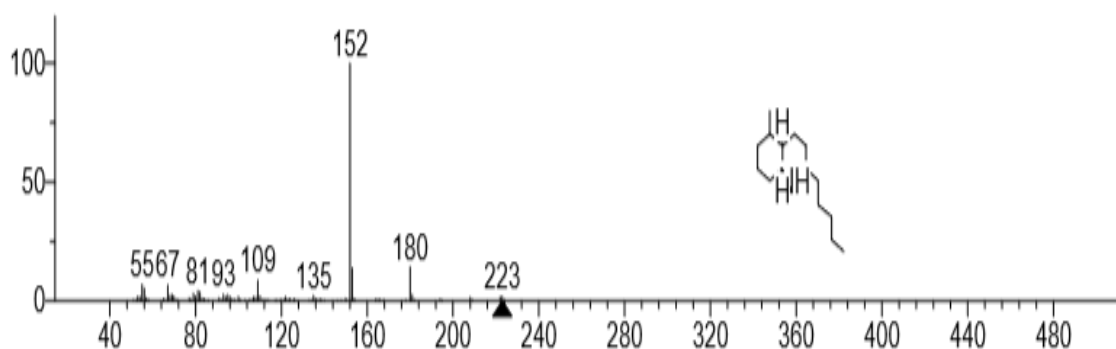
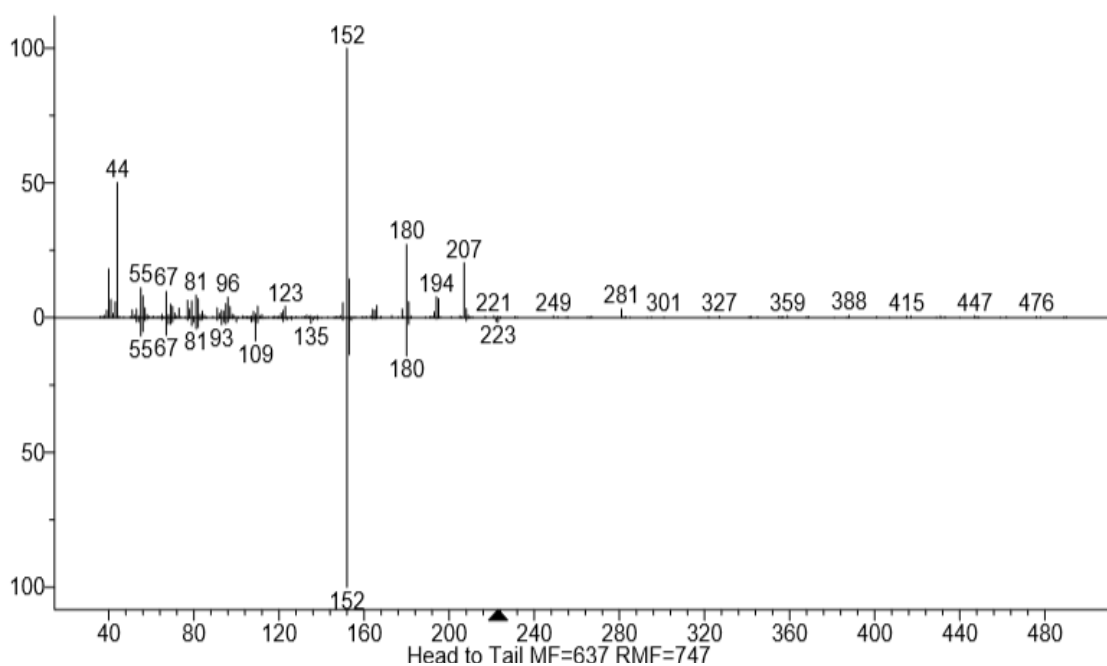
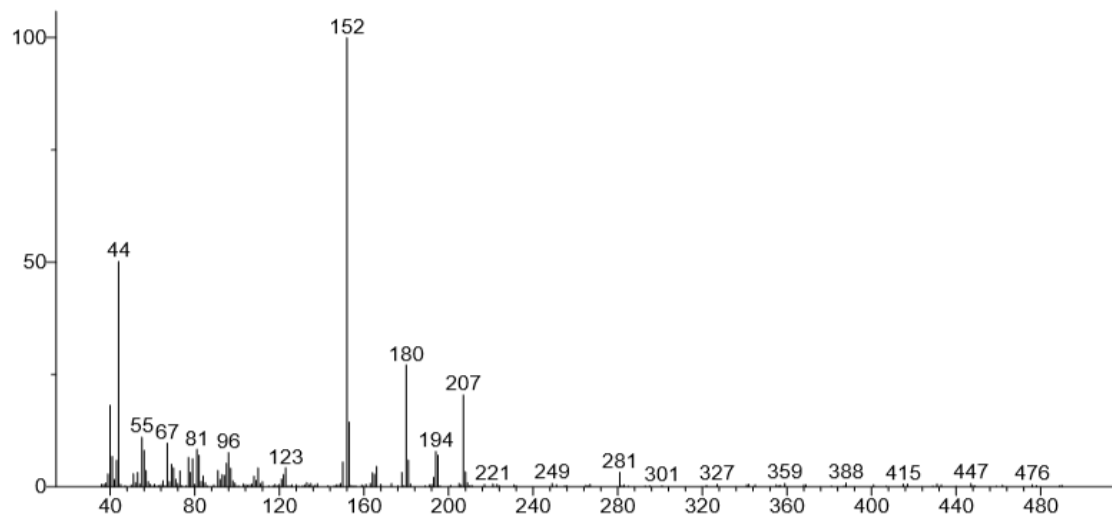
9. ANEXOS



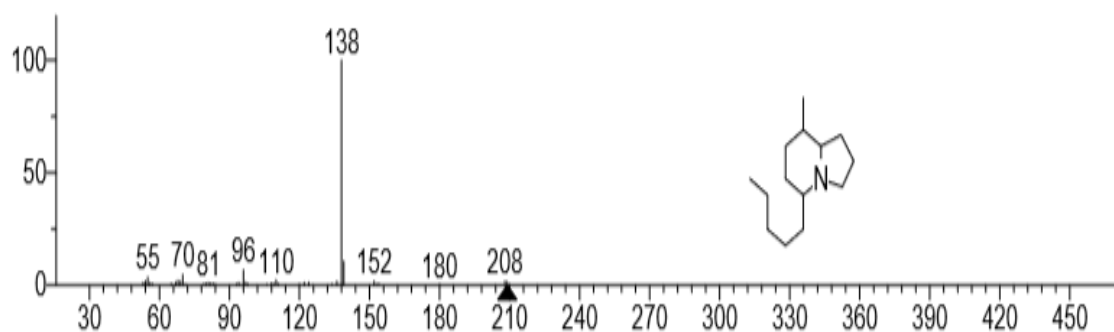
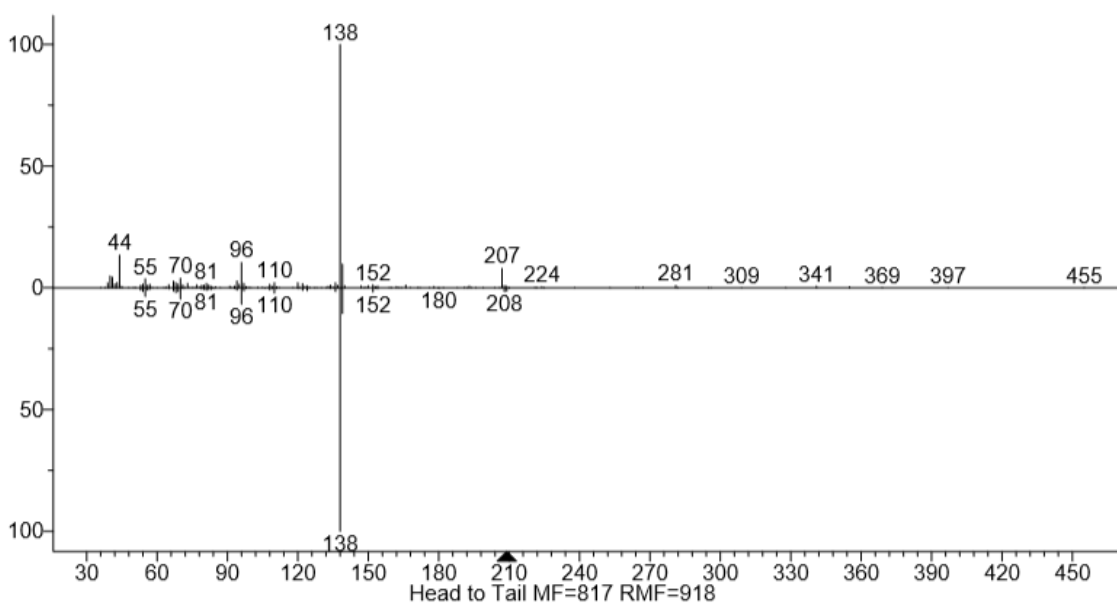
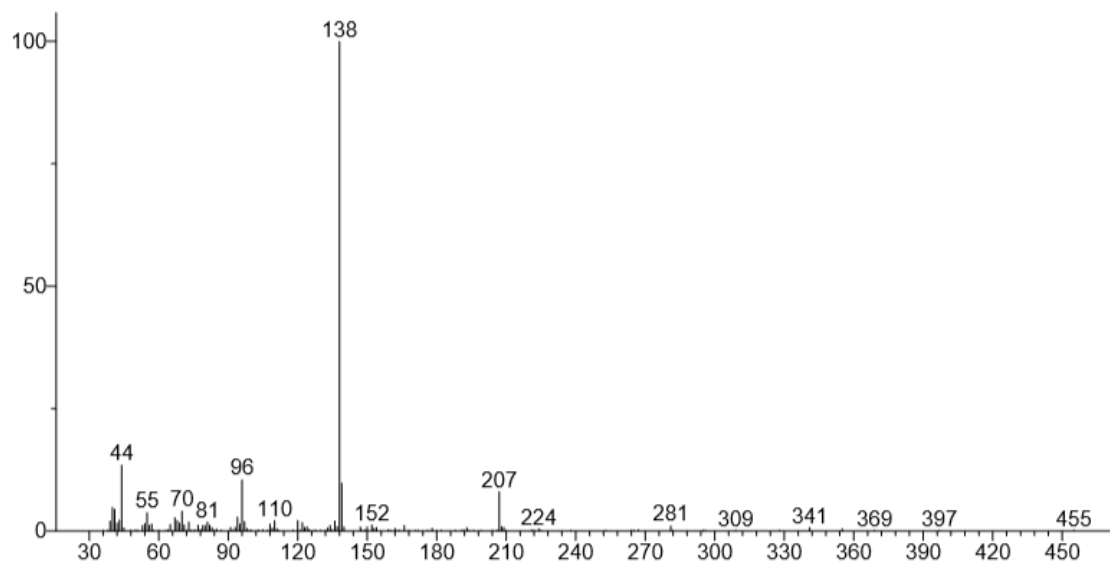
Anexo 1. Espectro de masas de 1,4-Quinolizidina con un tiempo de retención de 28.119 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A1).



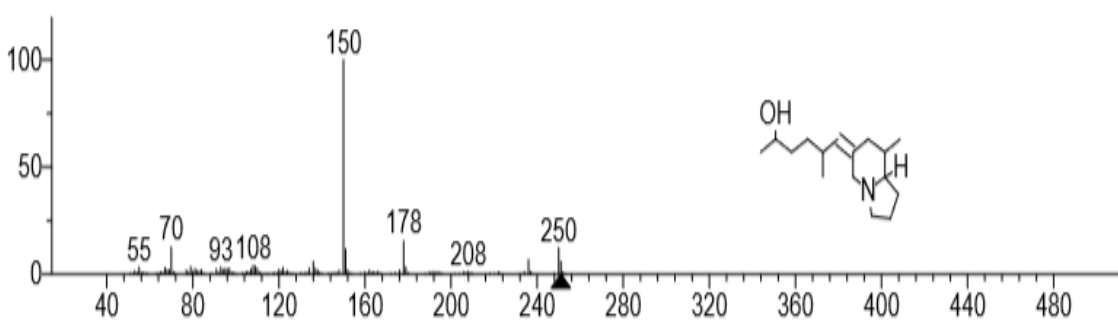
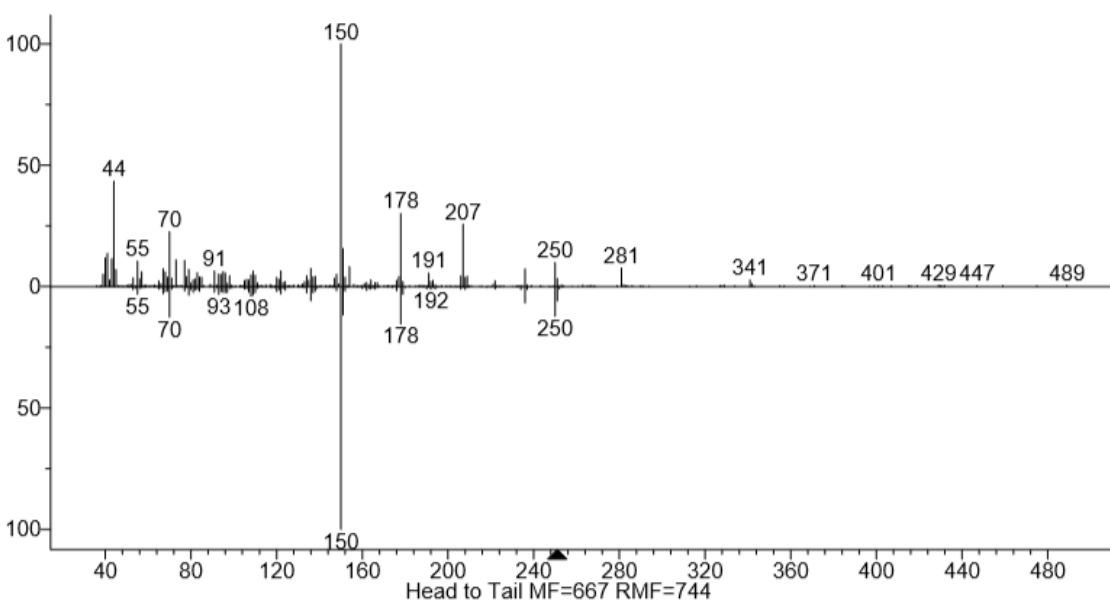
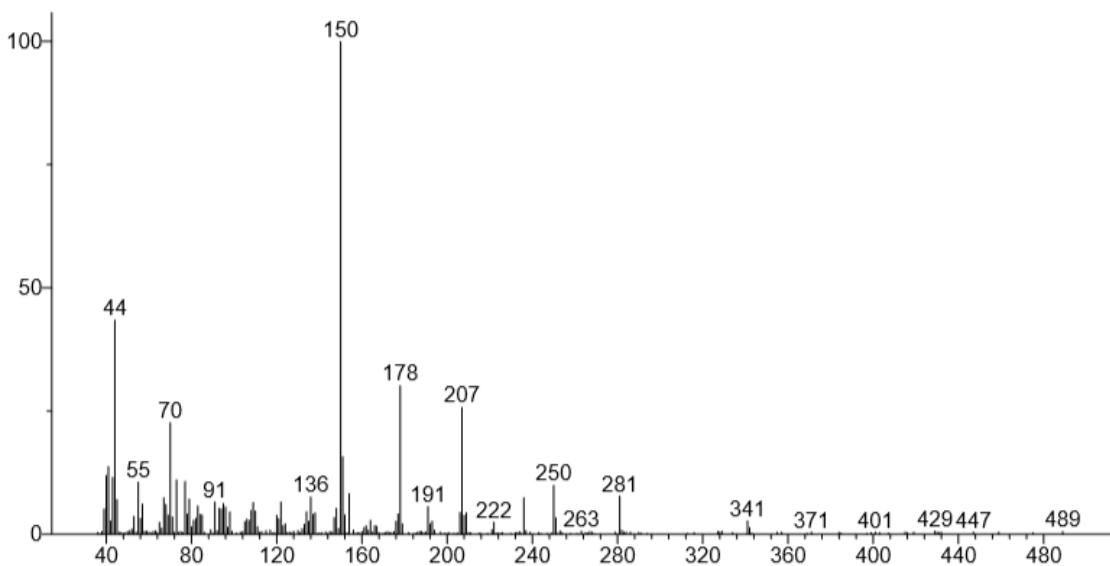
Anexo 2. Espectro de masas de 5,6,8-Indolizidina (277E), con un tiempo de retención de 28.616 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A1).



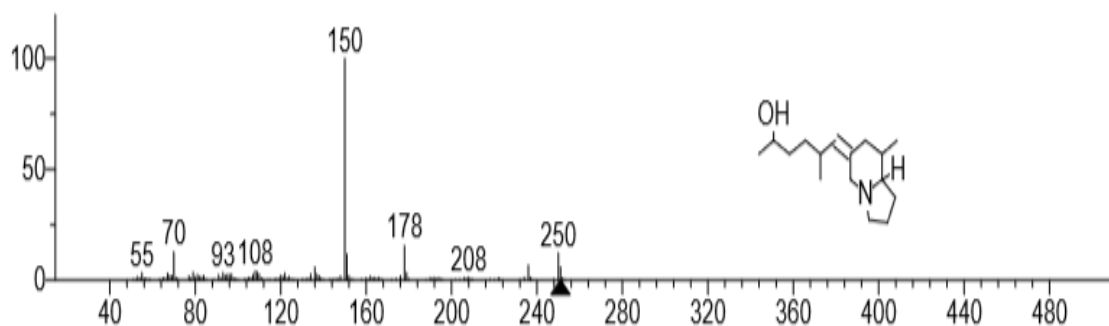
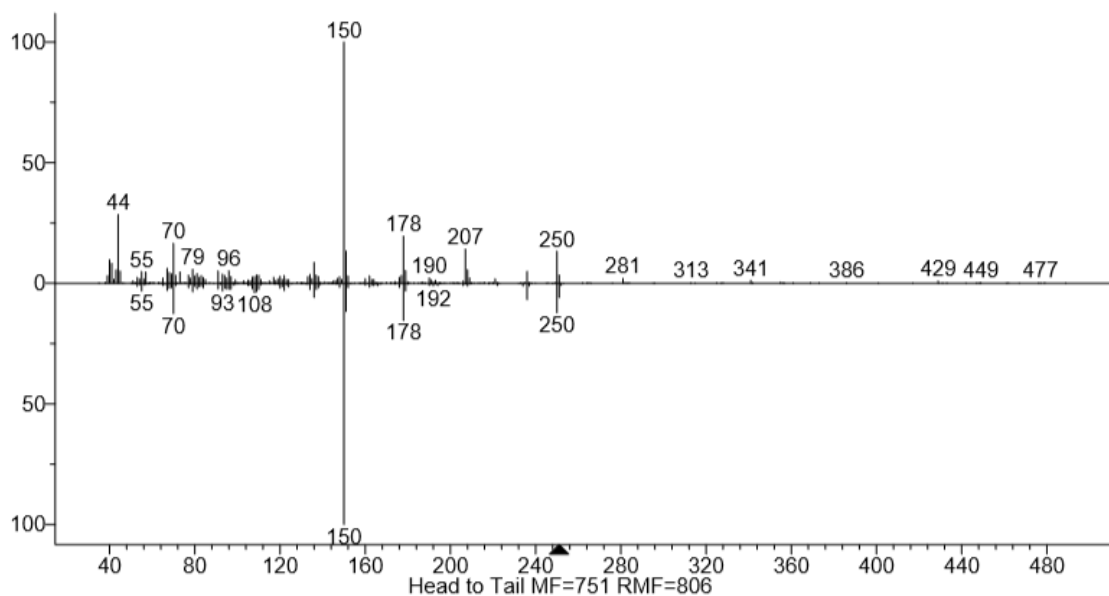
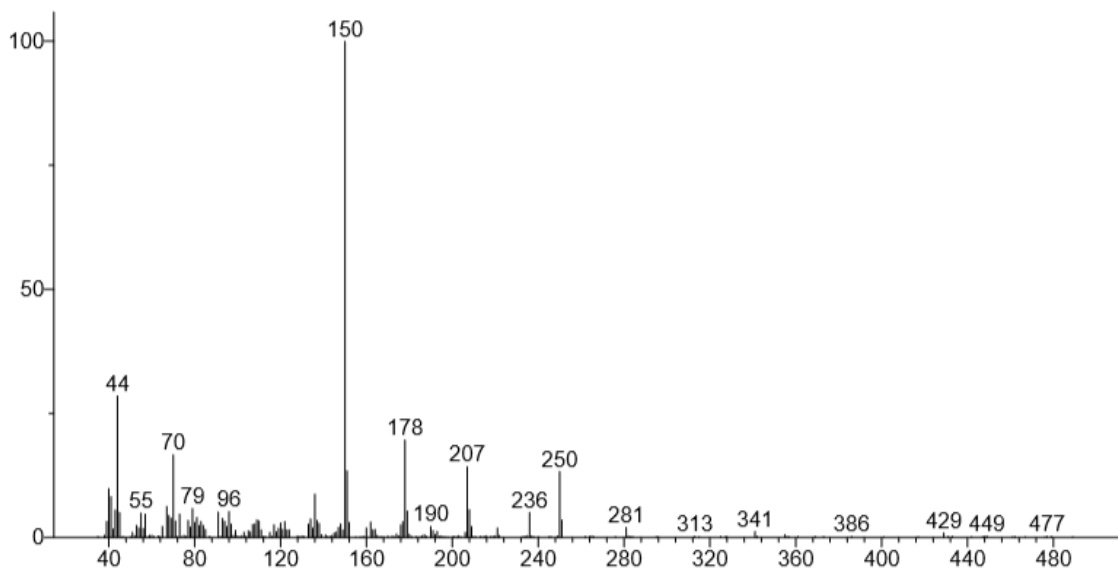
Anexo 5. Espectro de masas de 5,6,8-Decahidroquinolina (223Q) Cis, con un tiempo de retención de 20.595 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A1).



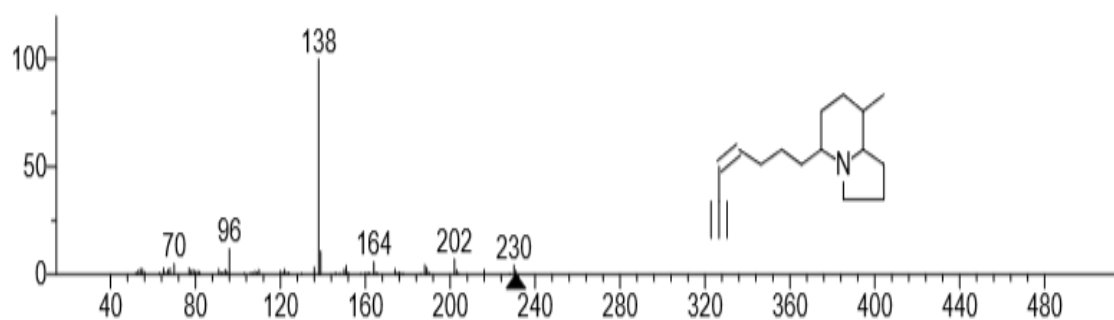
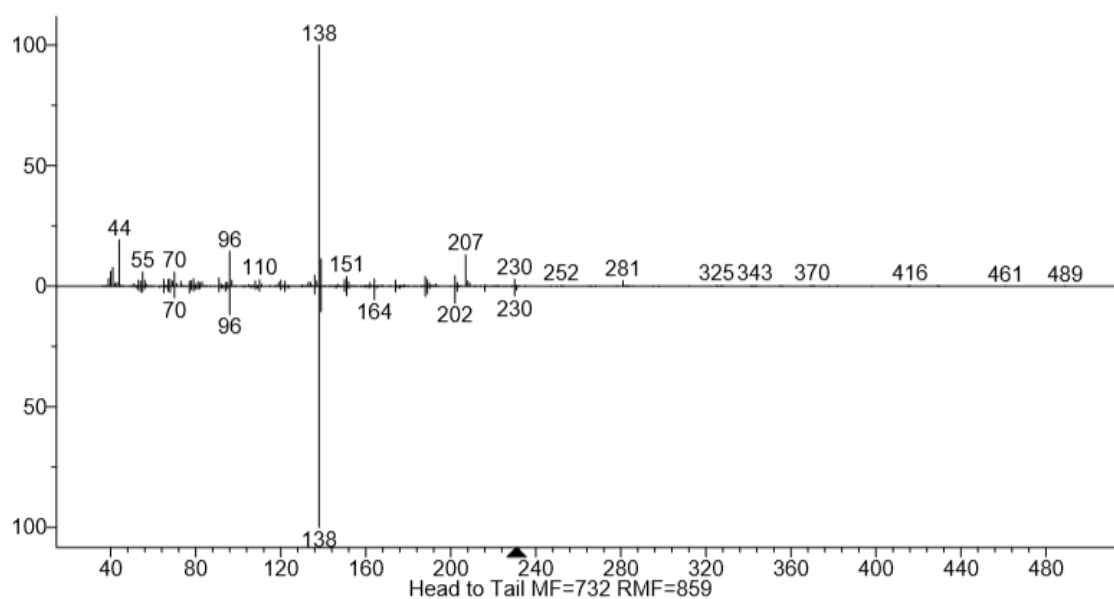
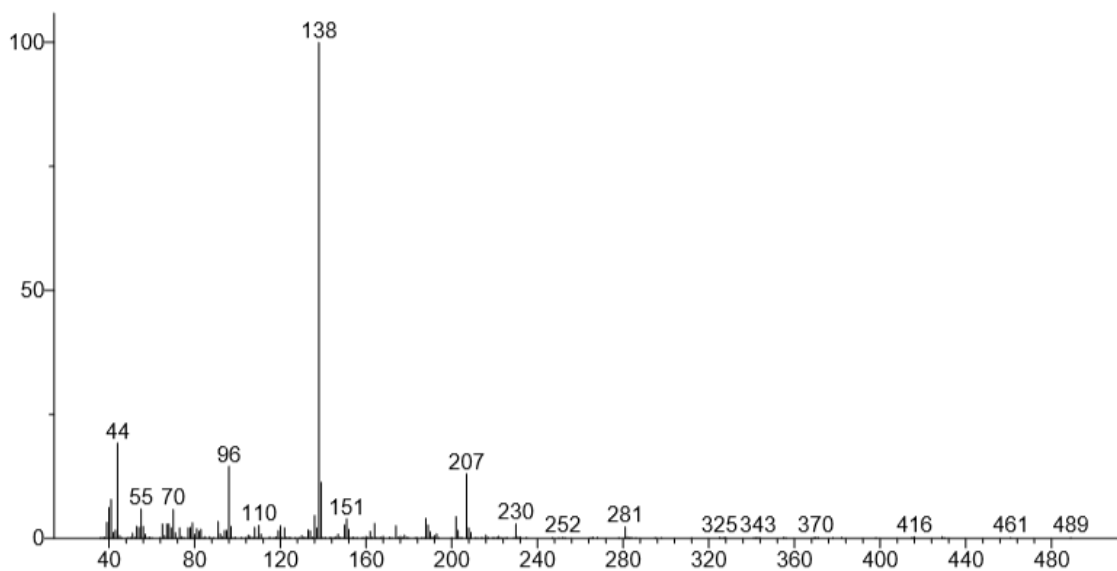
Anexo 6. Espectro de masas de 5,8-Indolizidina (209B), con un tiempo de retención de 28.264 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A1).



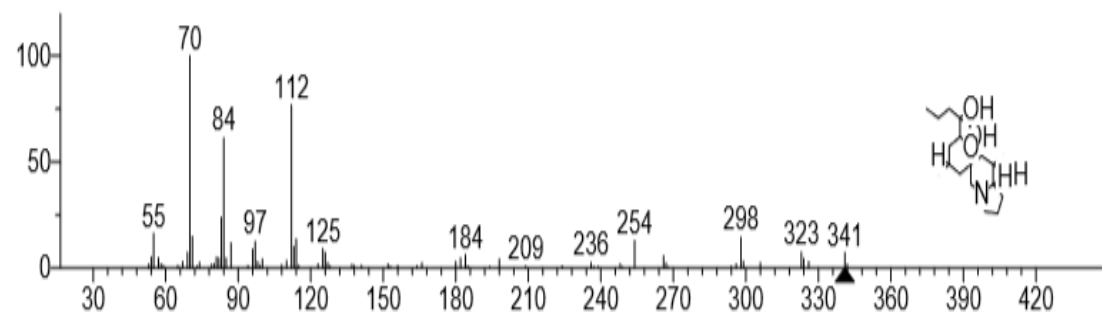
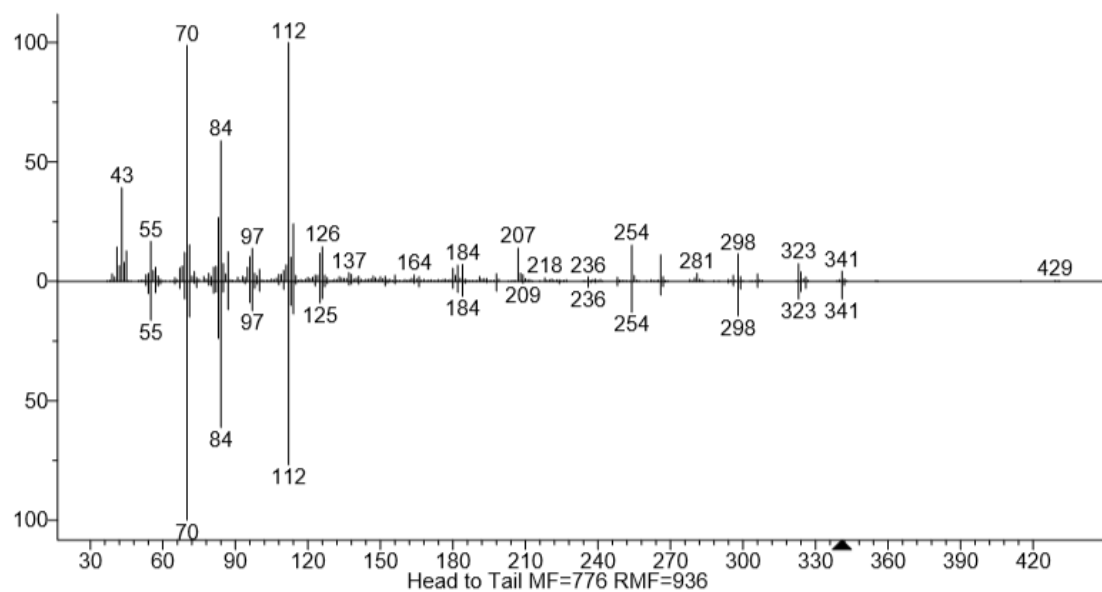
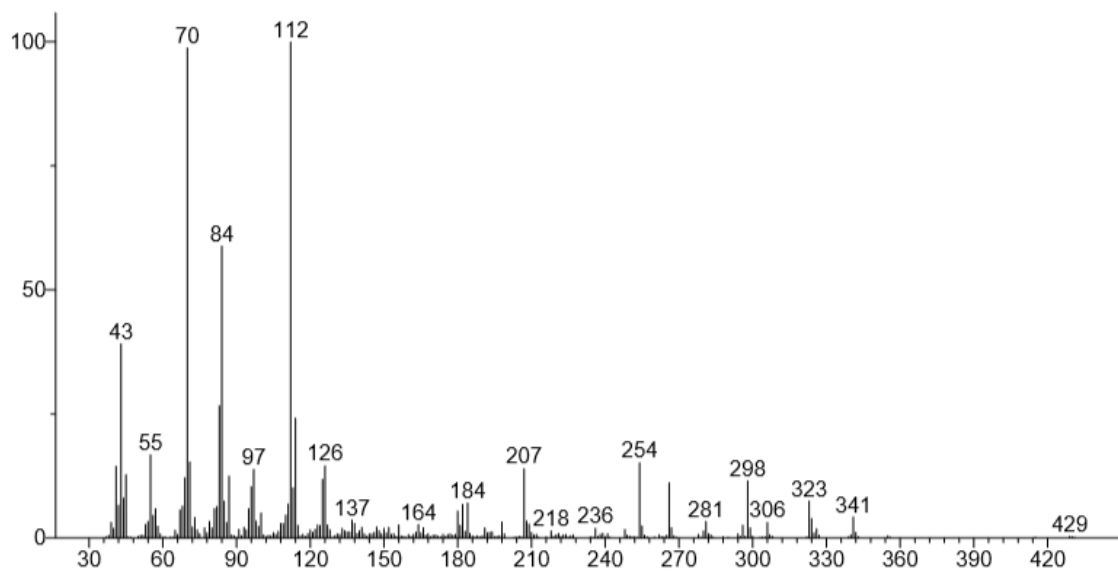
Anexo 7. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 28.824 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A1).



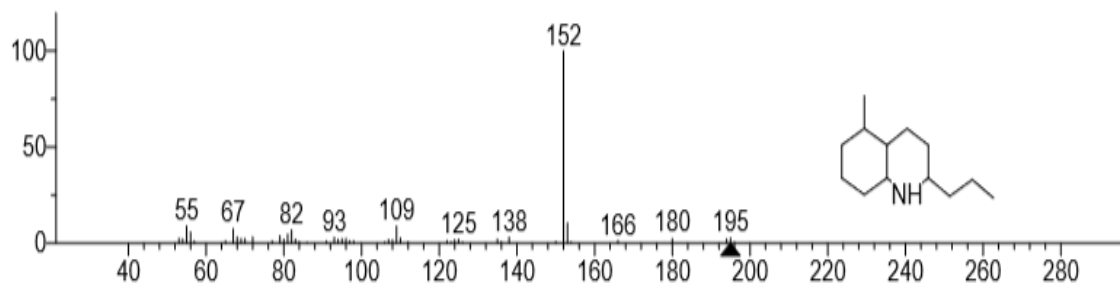
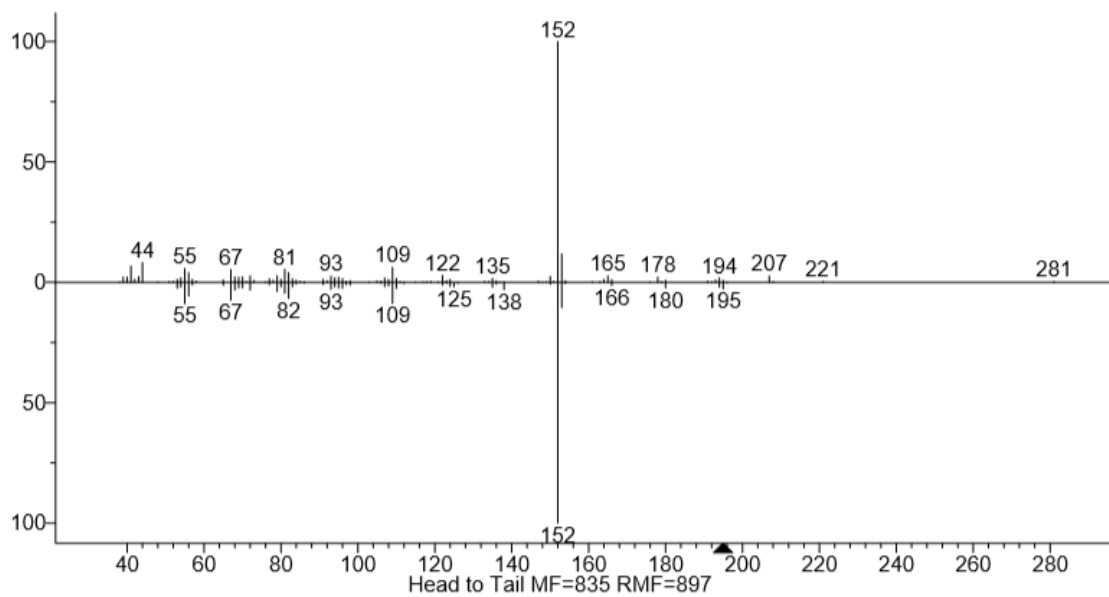
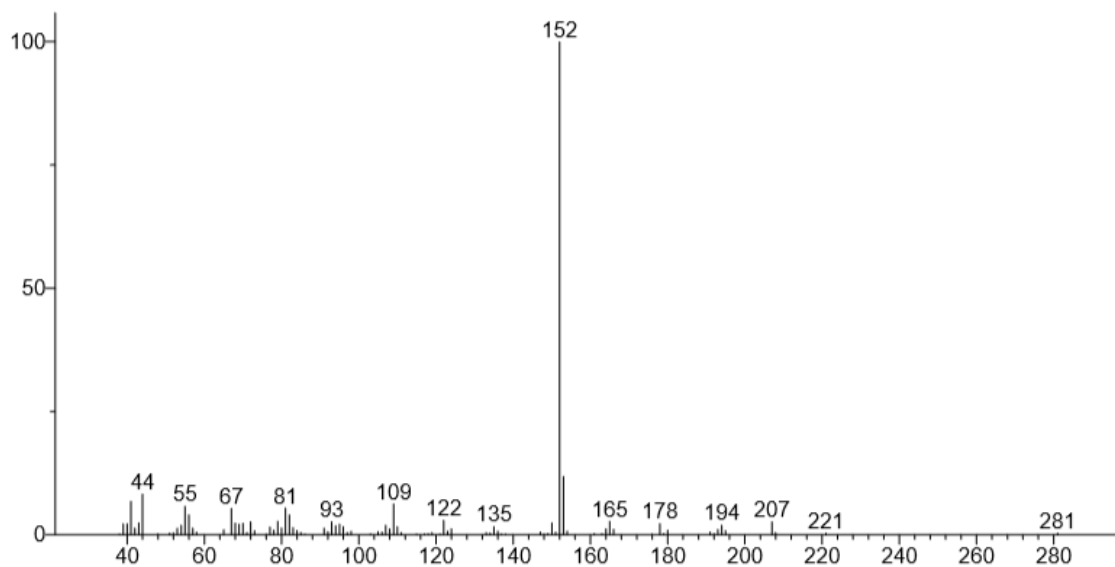
Anexo 8. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 28.958 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A1).



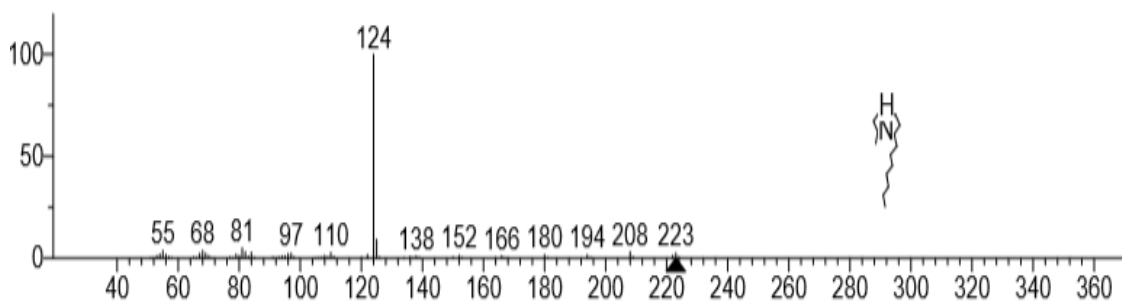
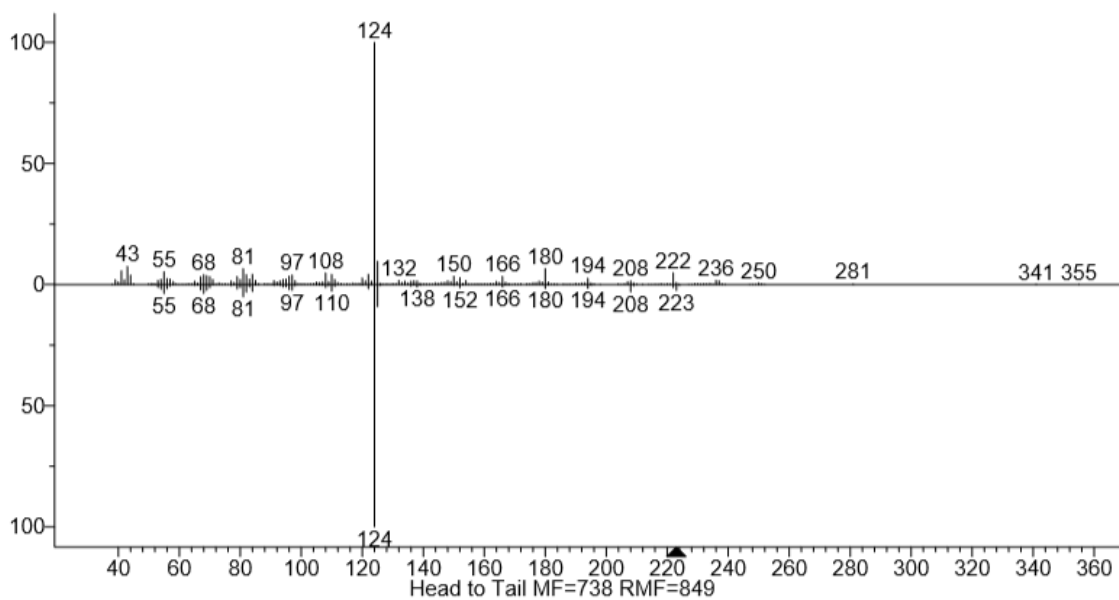
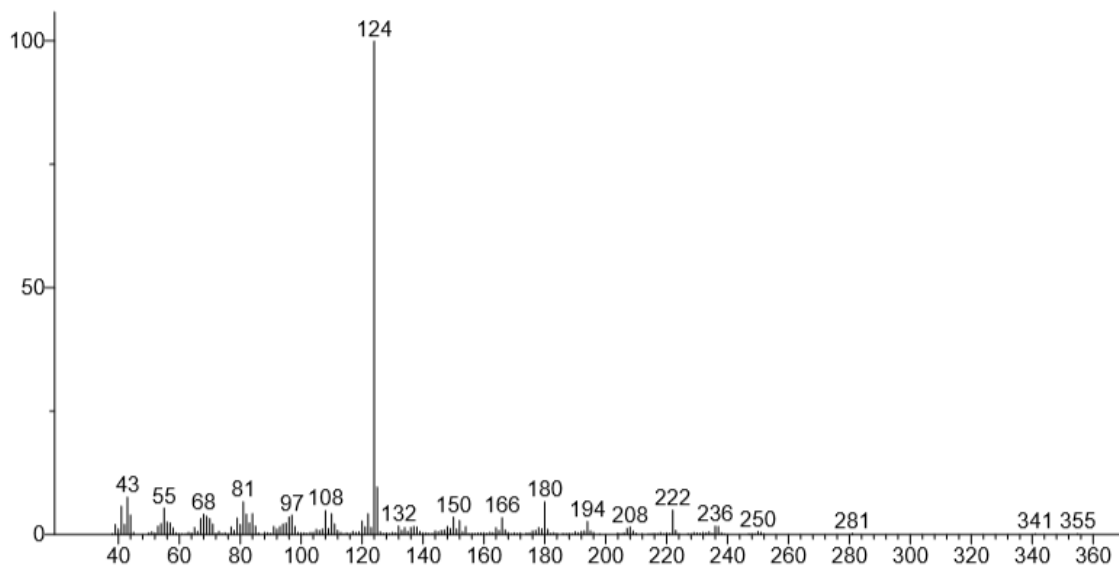
Anexo 9. Espectro de masas de Indolizidina (231C), con un tiempo de retención de 27.880 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A1).



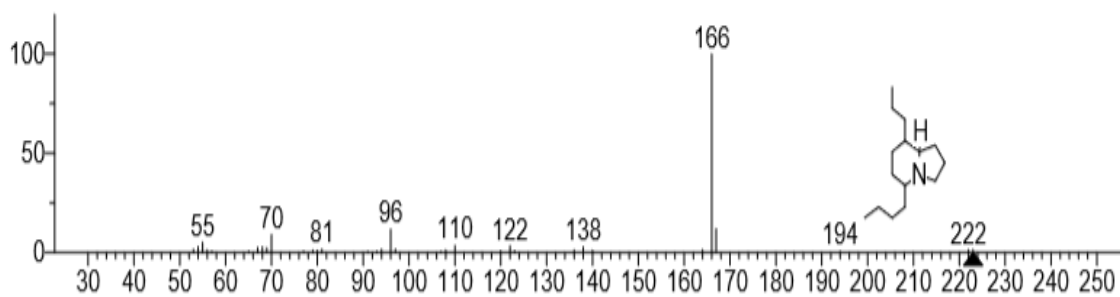
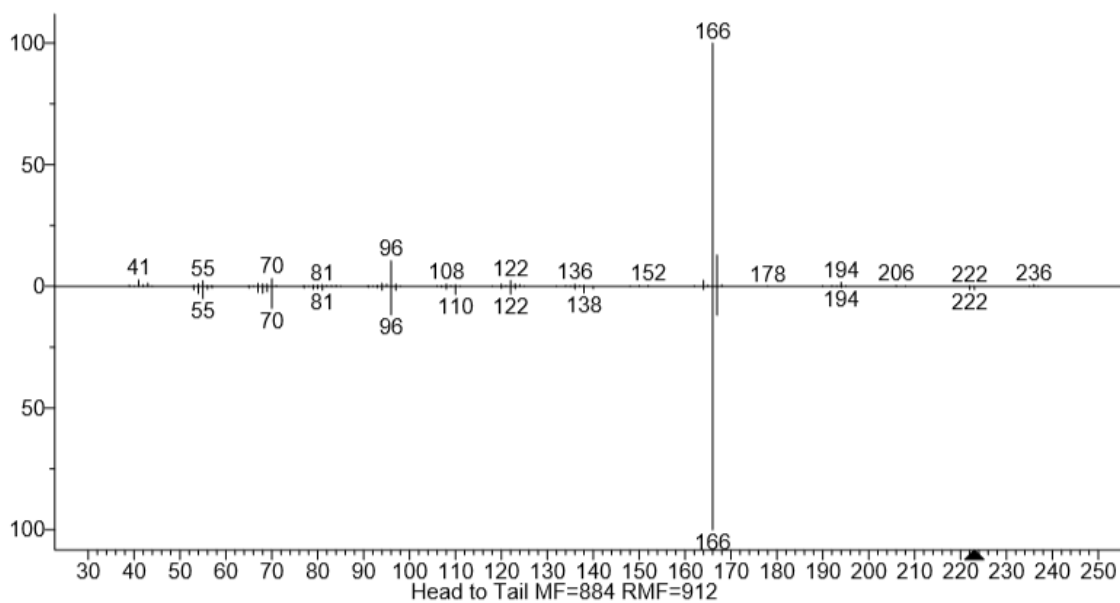
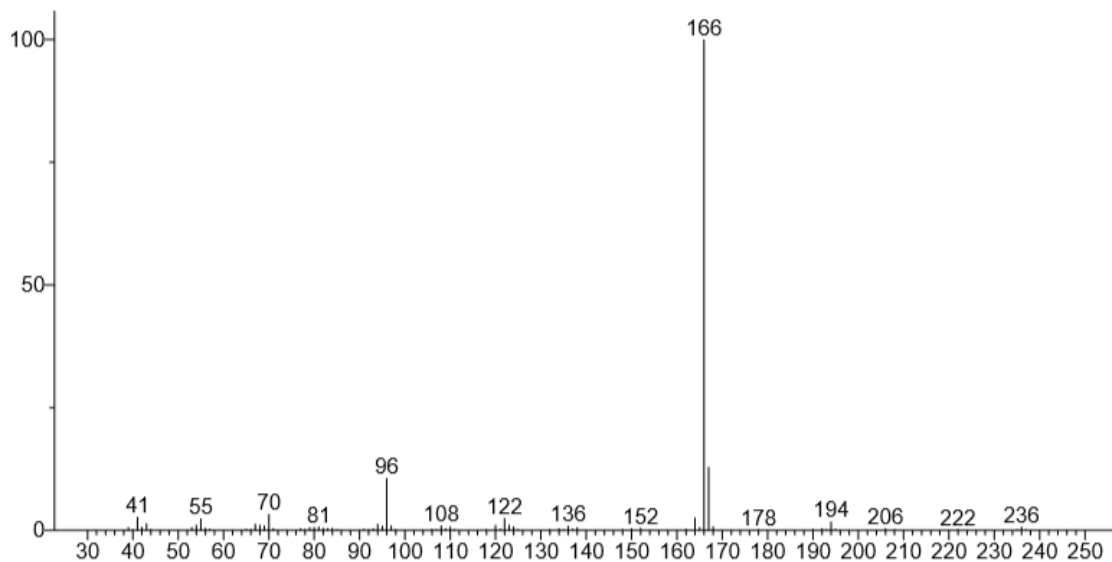
Anexo 10. Espectro de masas de Alopumiliotoxina (341A), con un tiempo de retención de 40.233 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A1).



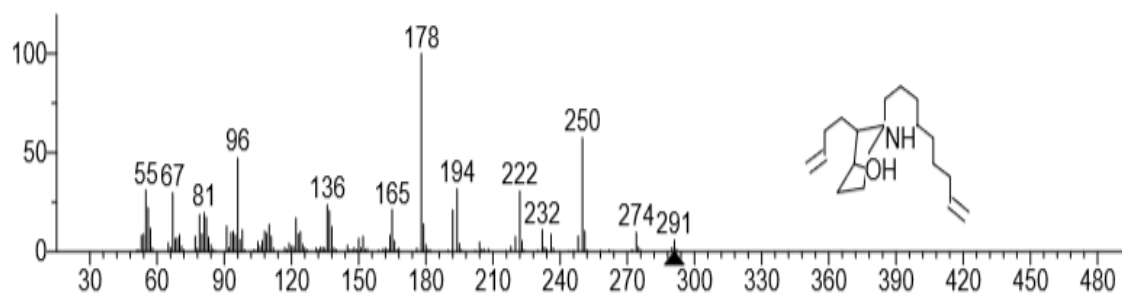
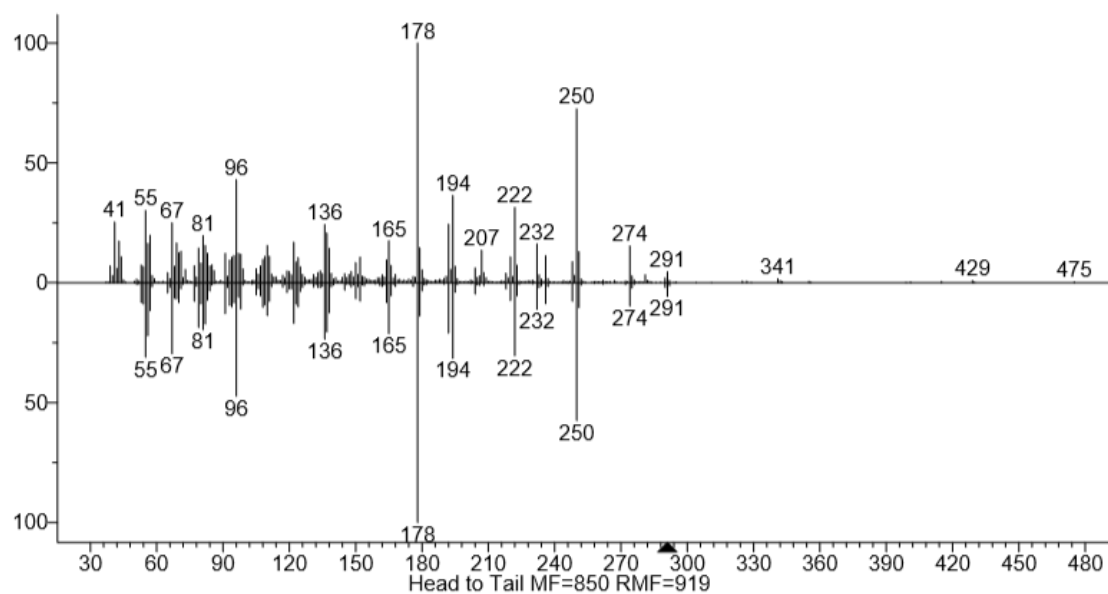
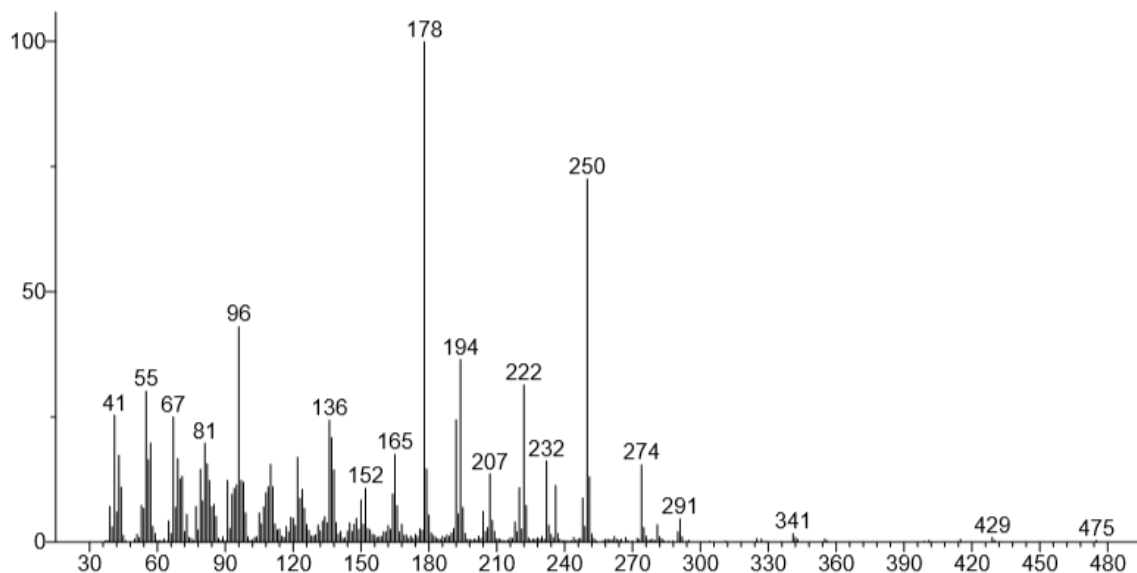
Anexo 11. Espectro de masas de Decahidroquinolina (195A), con un tiempo de retención de 21.155 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A1).



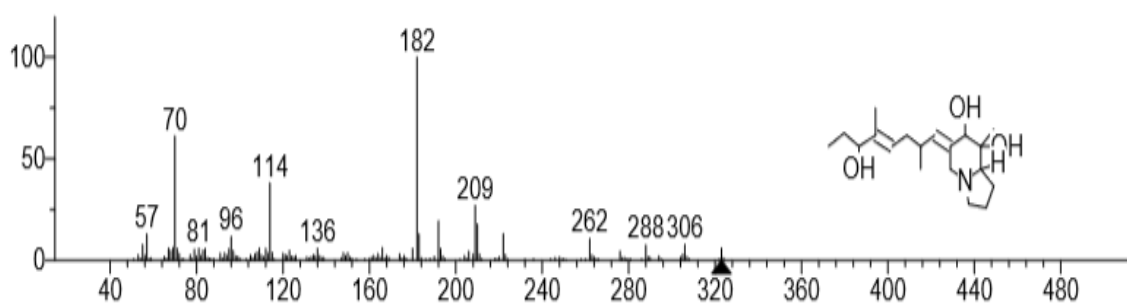
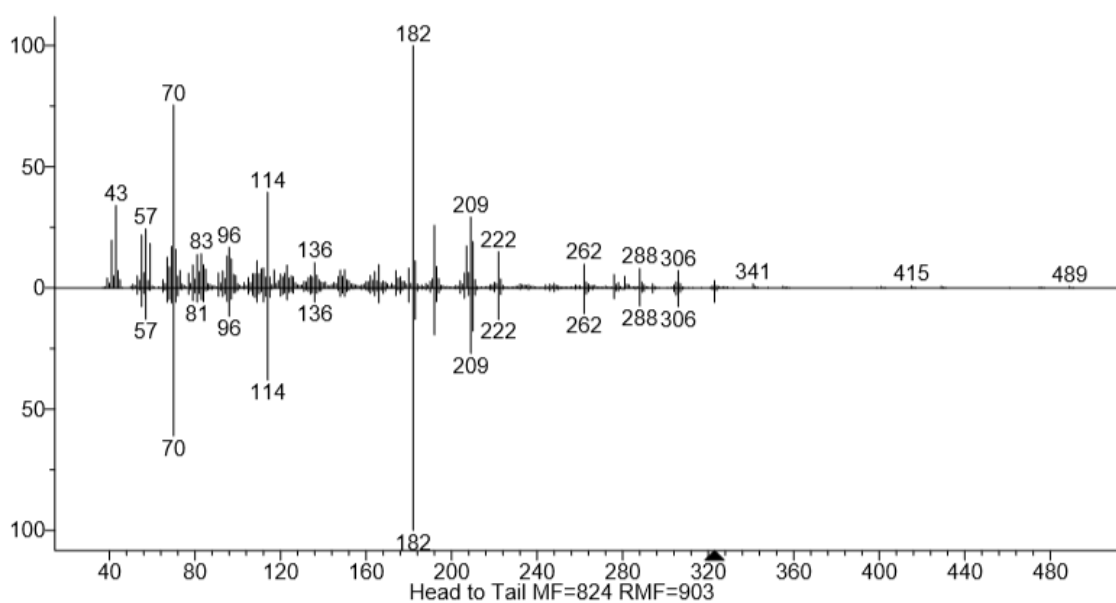
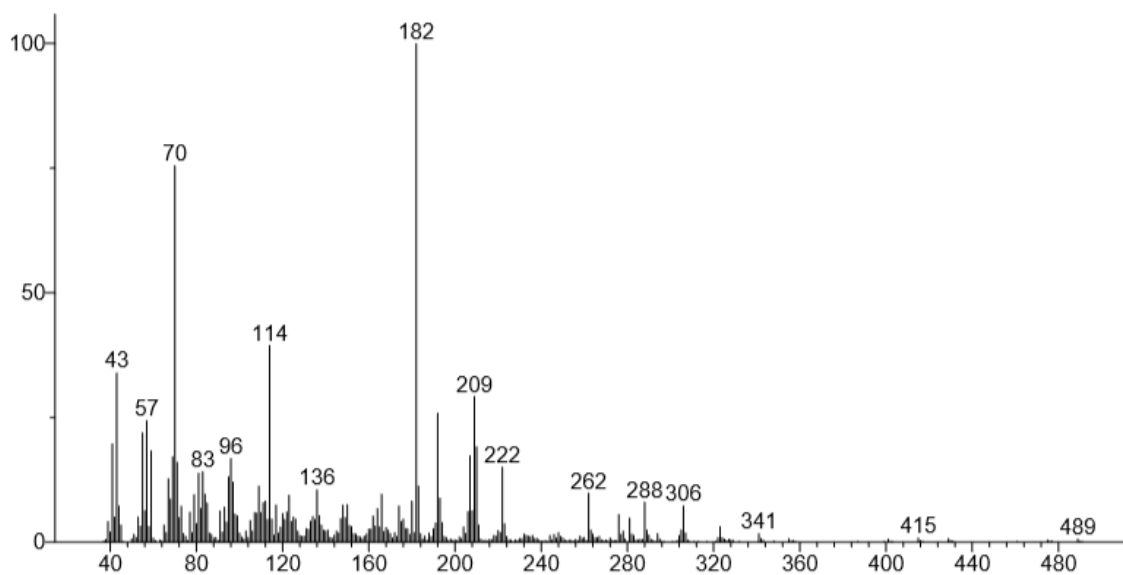
Anexo 12. Espectro de masas de 3,5 Pirrolizidina (223H), con un tiempo de retención de 29.238 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2).



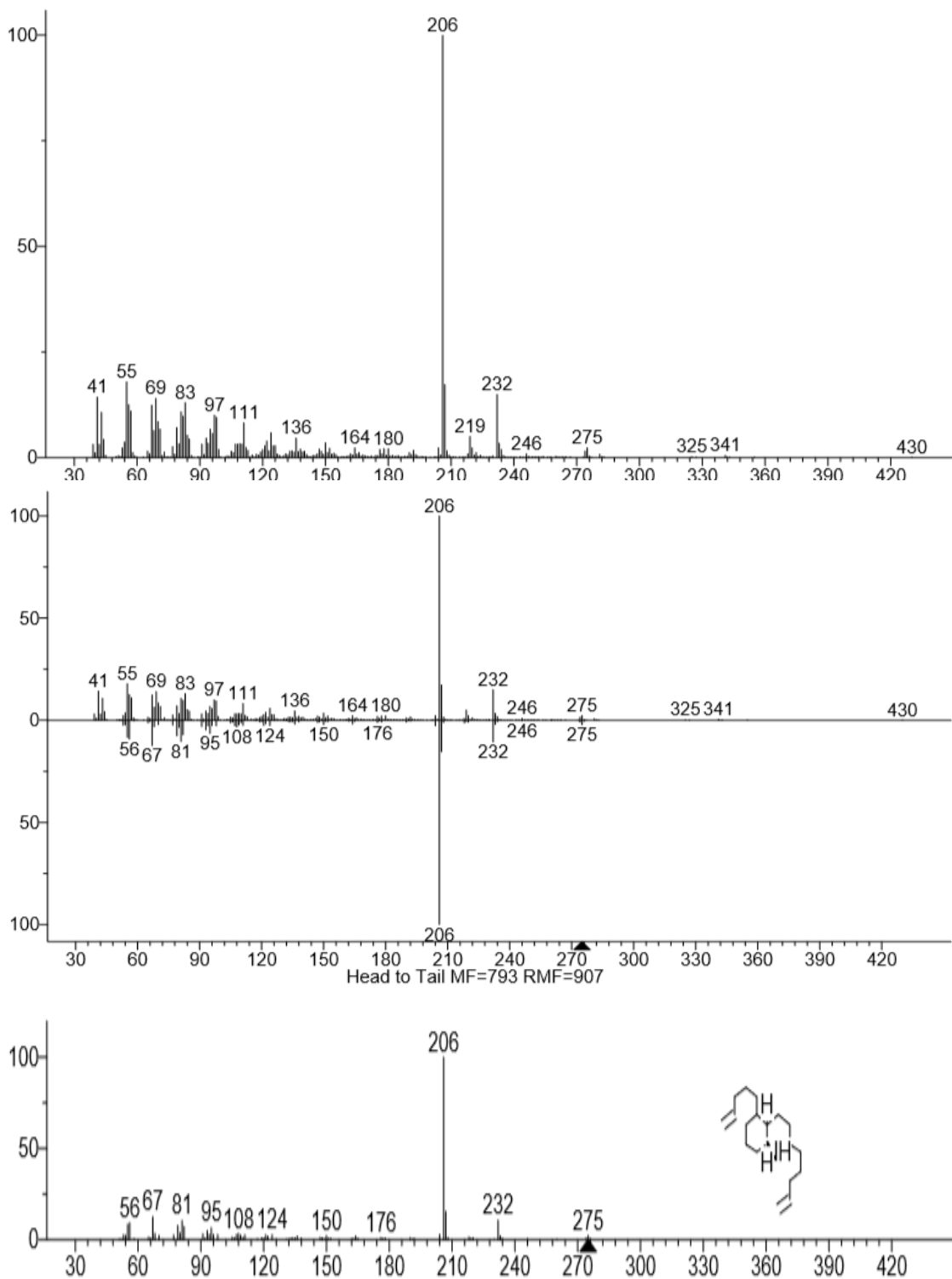
Anexo 13. Espectro de masas de 3,5 Indolizidina (223J), con un tiempo de retención de 27.186 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2).



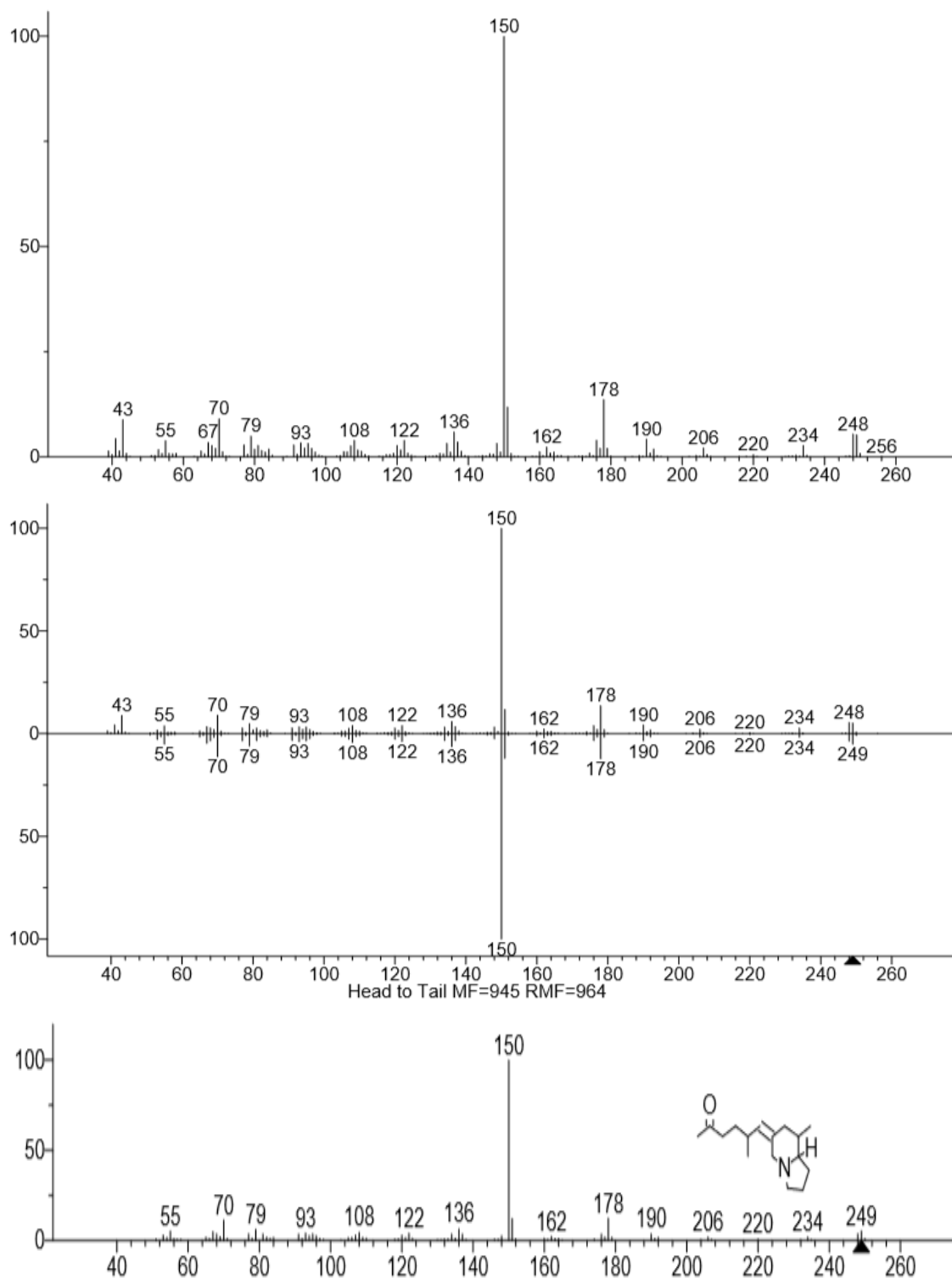
Anexo 14. Espectro de masas de 3,5 Octahydrohistrionicotoxina (291A), con un tiempo de retención de 37.788 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2).



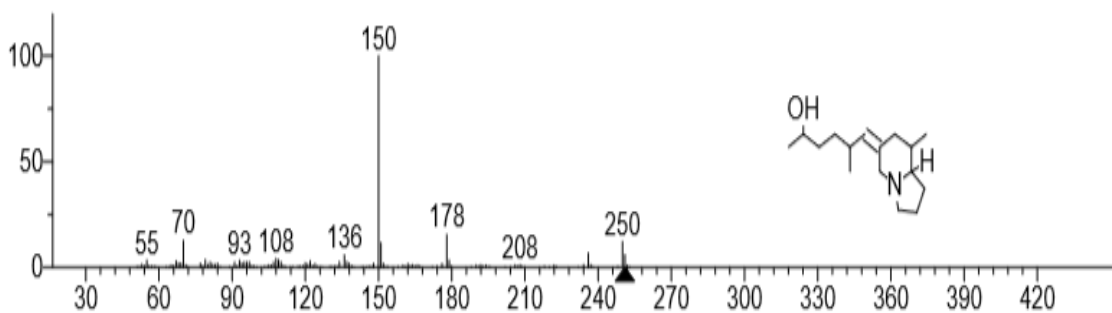
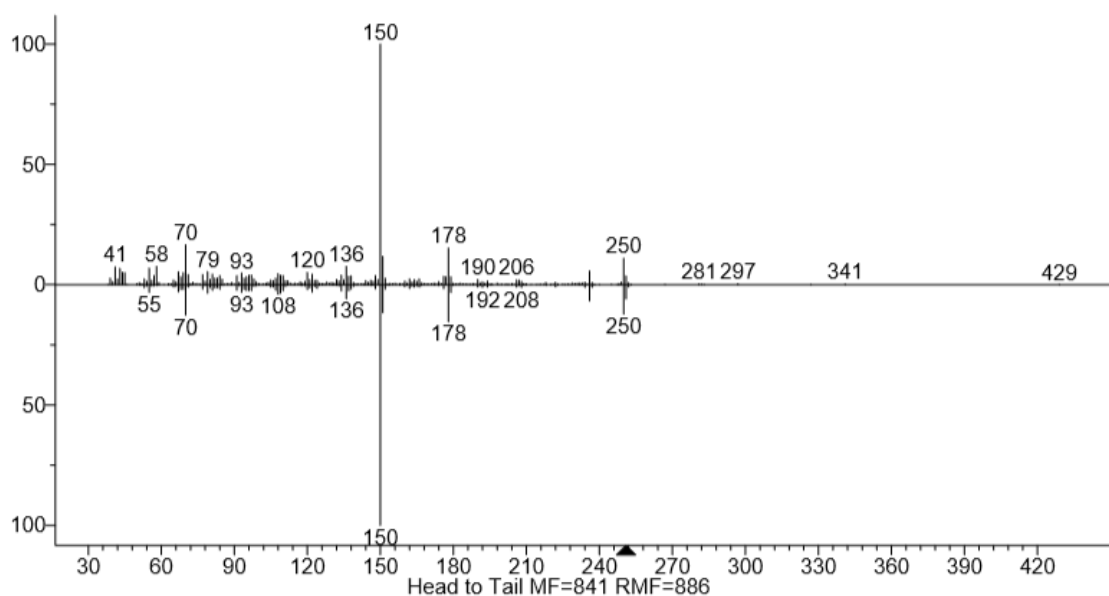
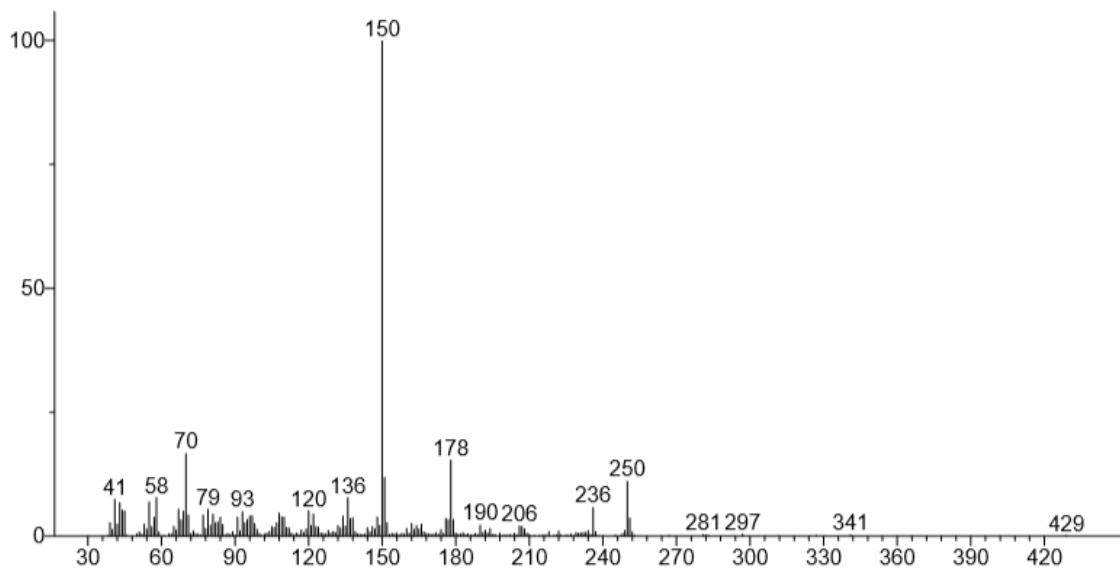
Anexo 15. Espectro de masas de Alopumiliotoxina (323B), con un tiempo de retención de 41.405 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2).



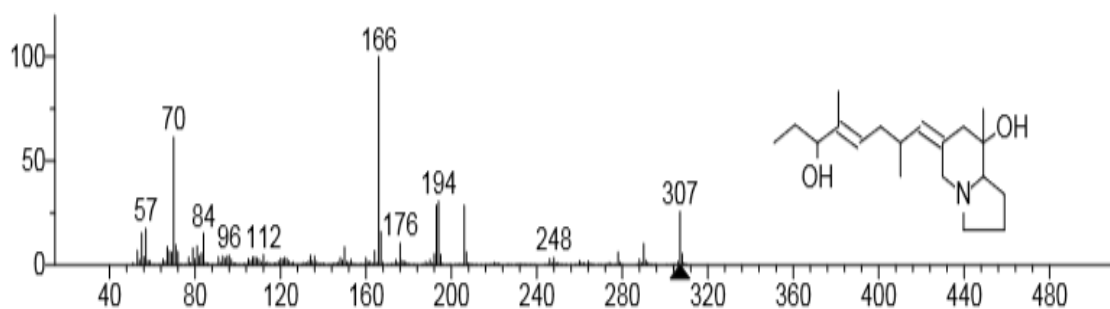
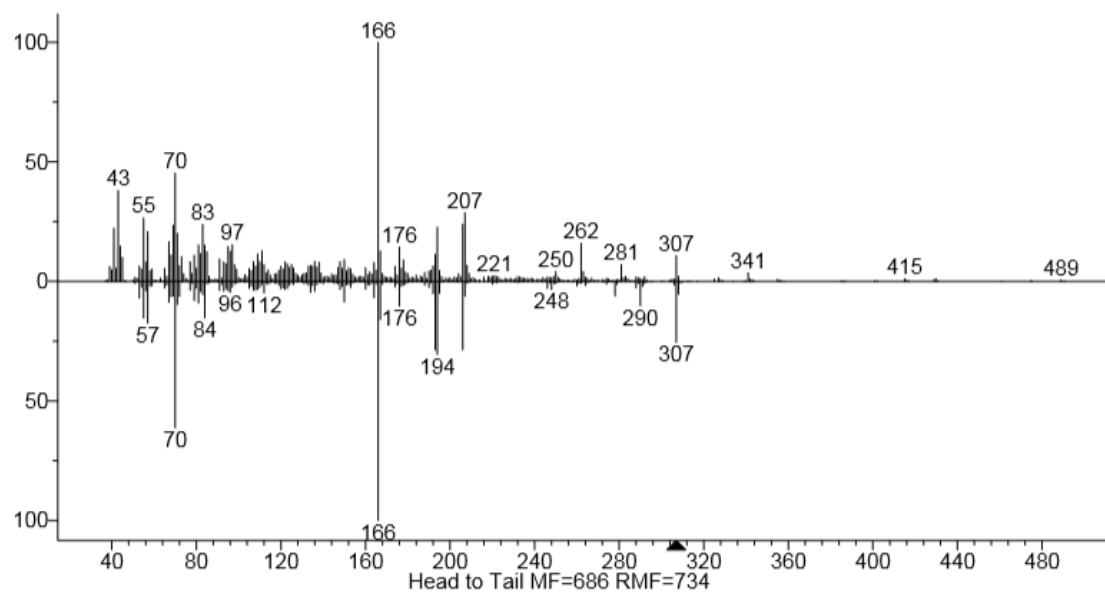
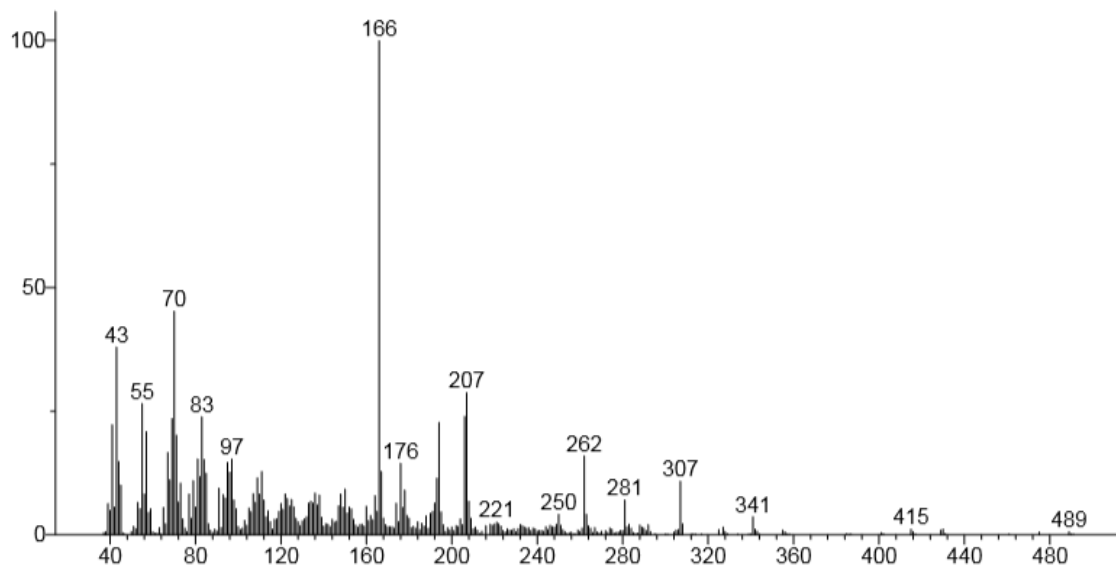
Anexo 16. Espectro de masas de Decahidroquinolina (275B), con un tiempo de retención de 35.435 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2).



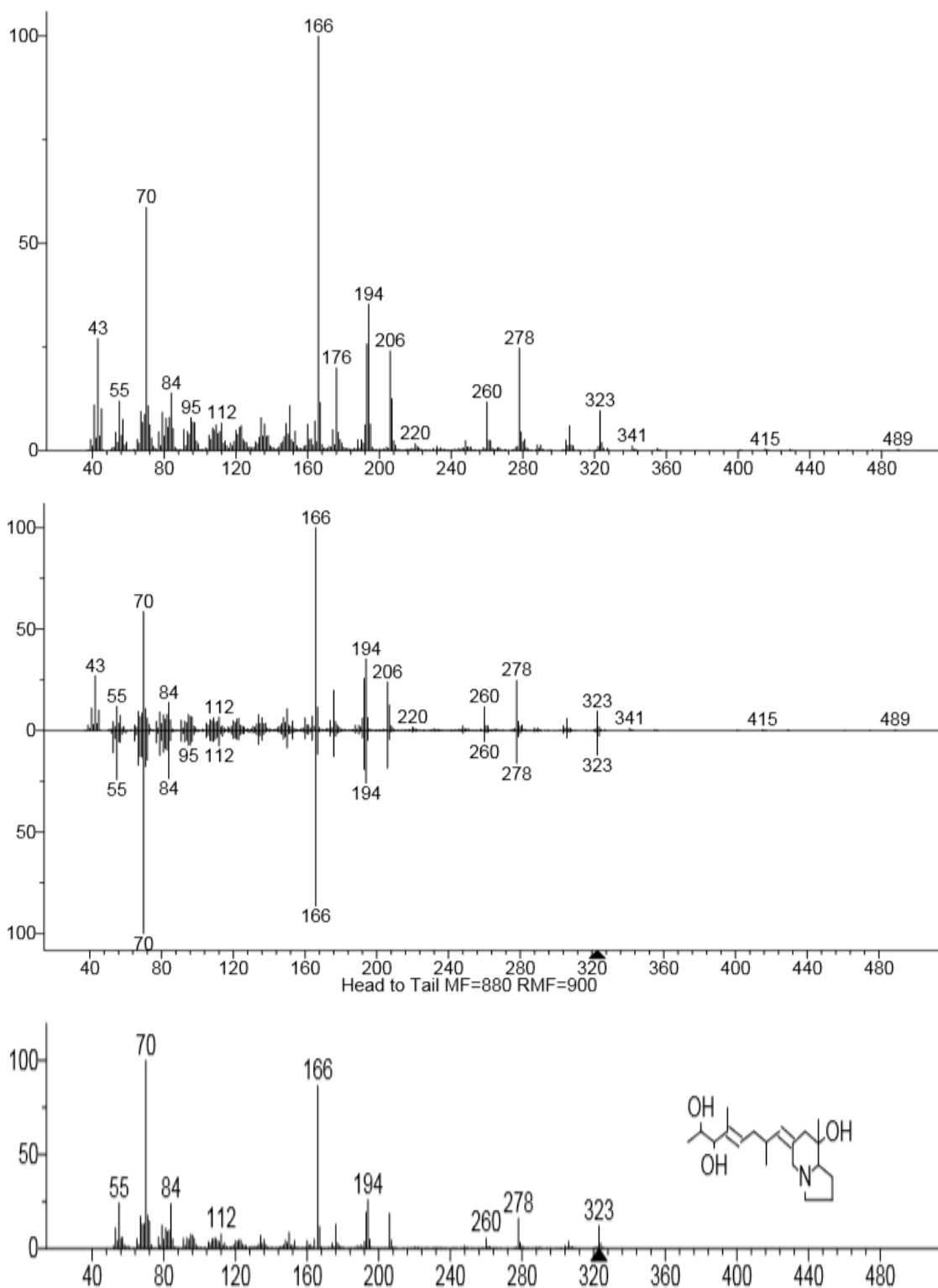
Anexo 17. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (249), con un tiempo de retención de 28.710min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2).



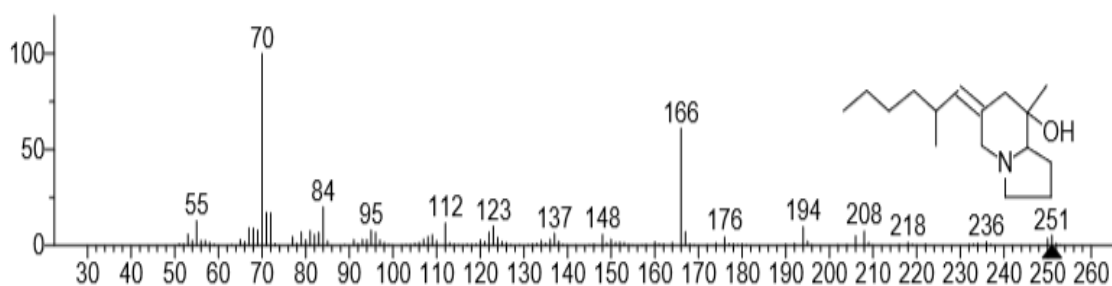
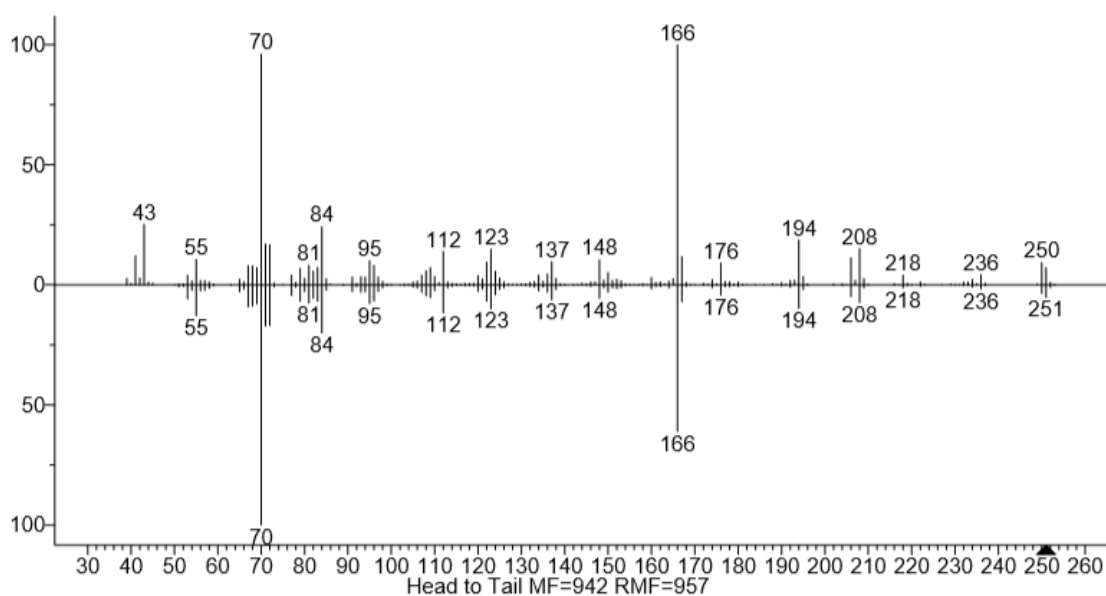
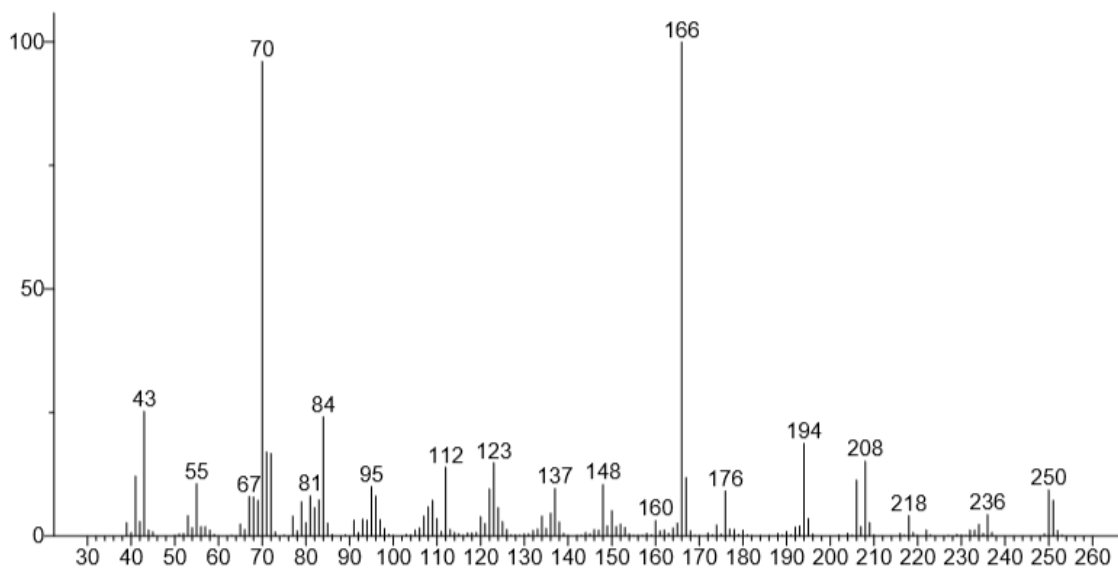
Anexo 18. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 28.948min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2).



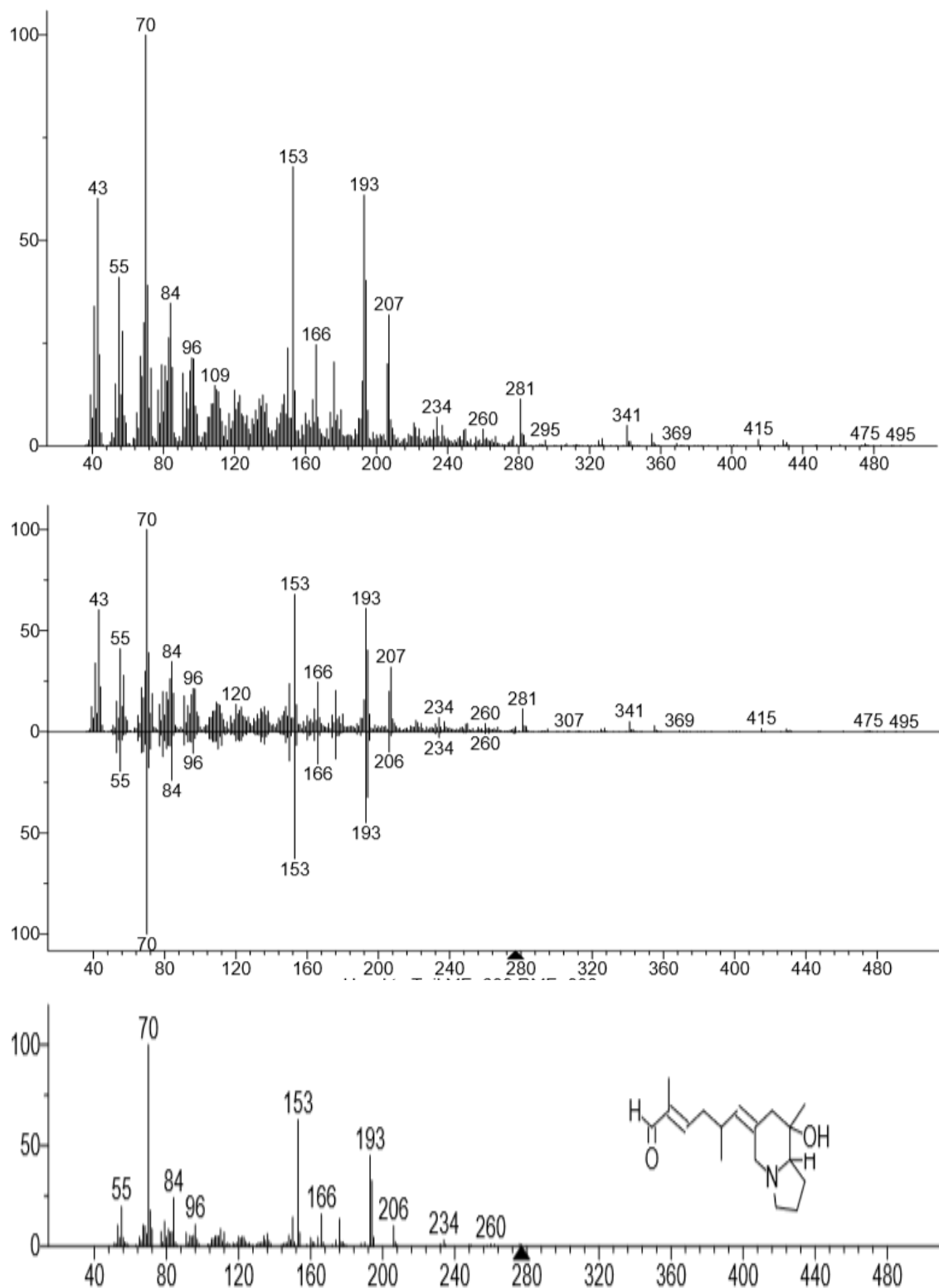
Anexo 19. Espectro de masas de Pumiliotoxina A, con un tiempo de retención de 37.995min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2).



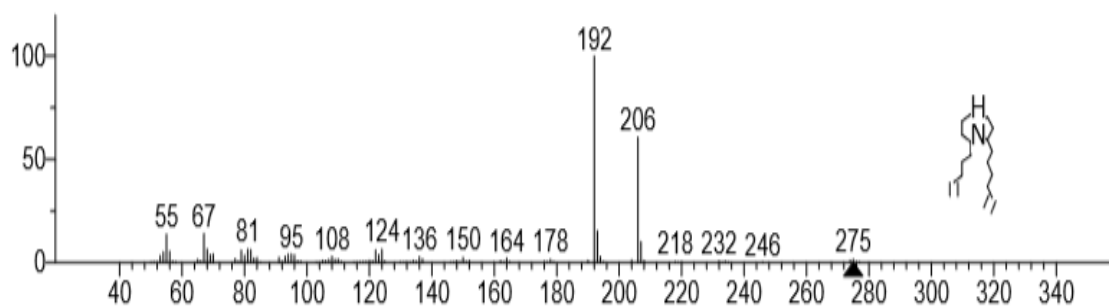
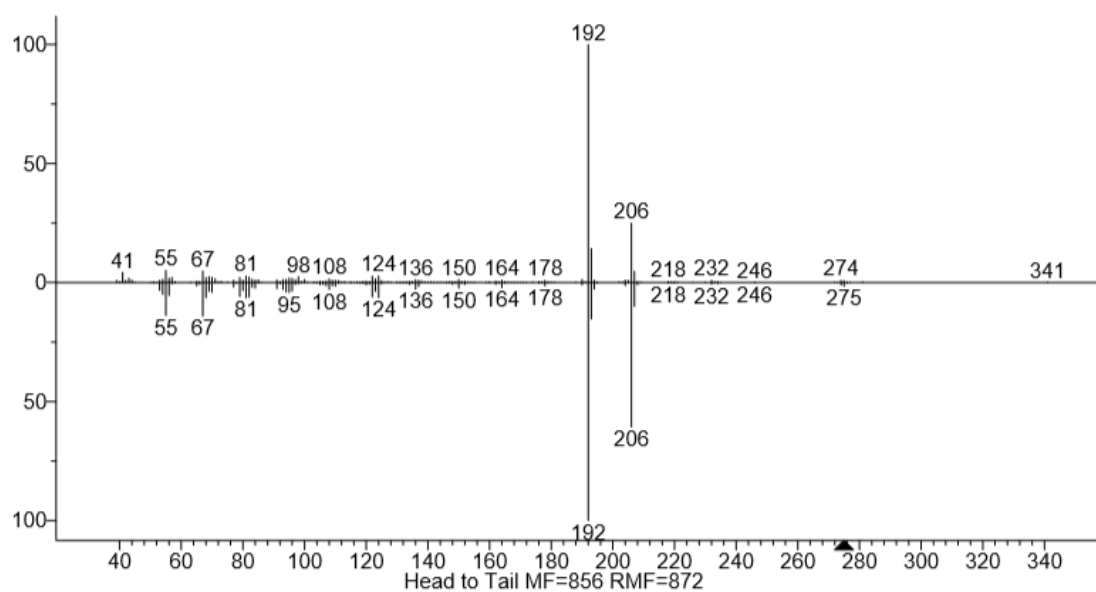
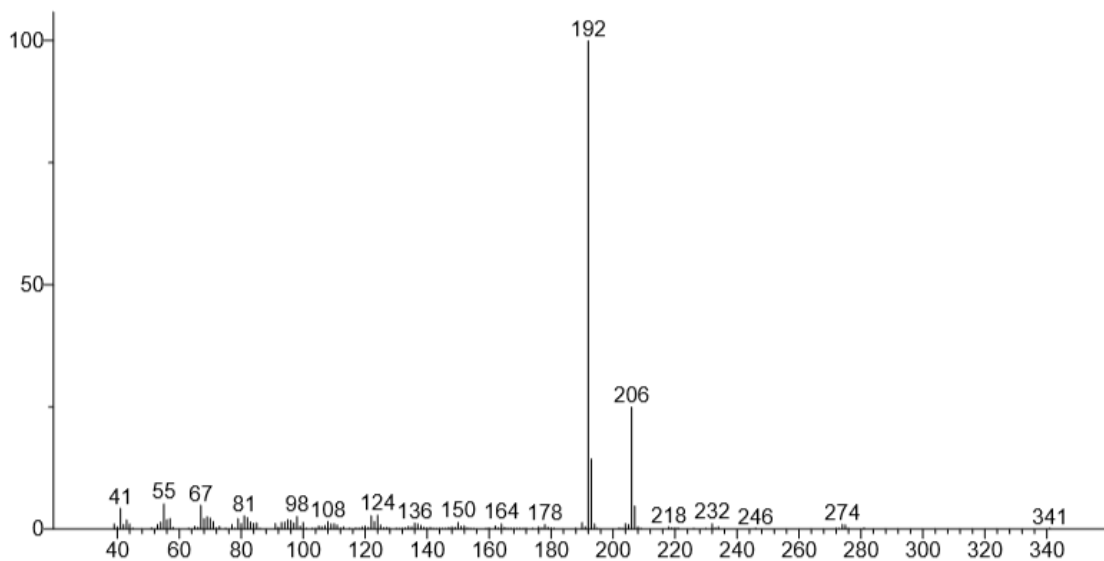
Anexo 20. Espectro de masas de Pumiliotoxina B, con un tiempo de retención de 41.715min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2).



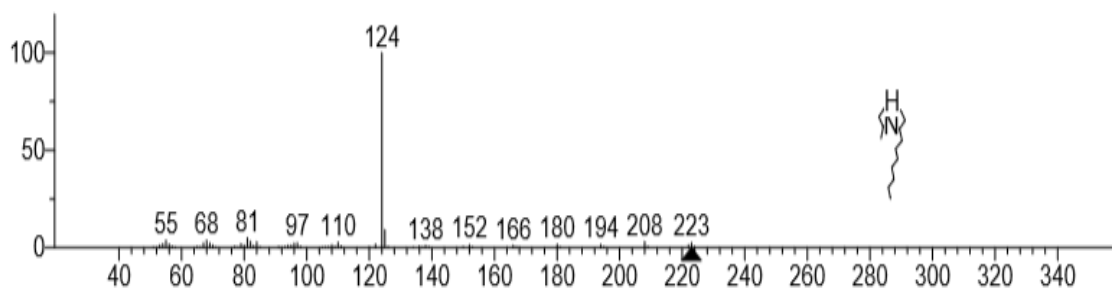
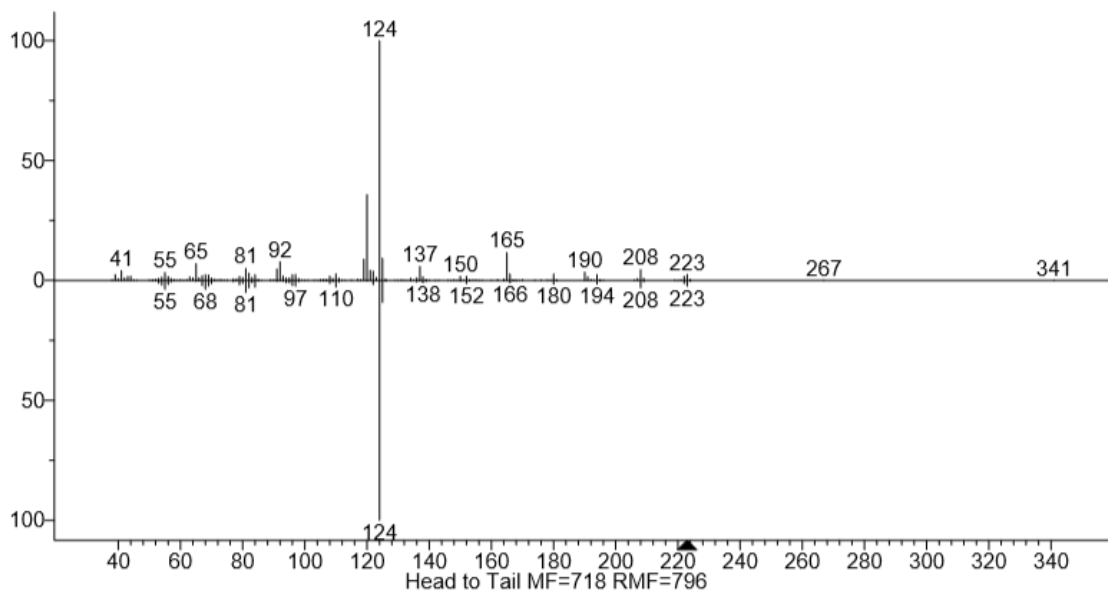
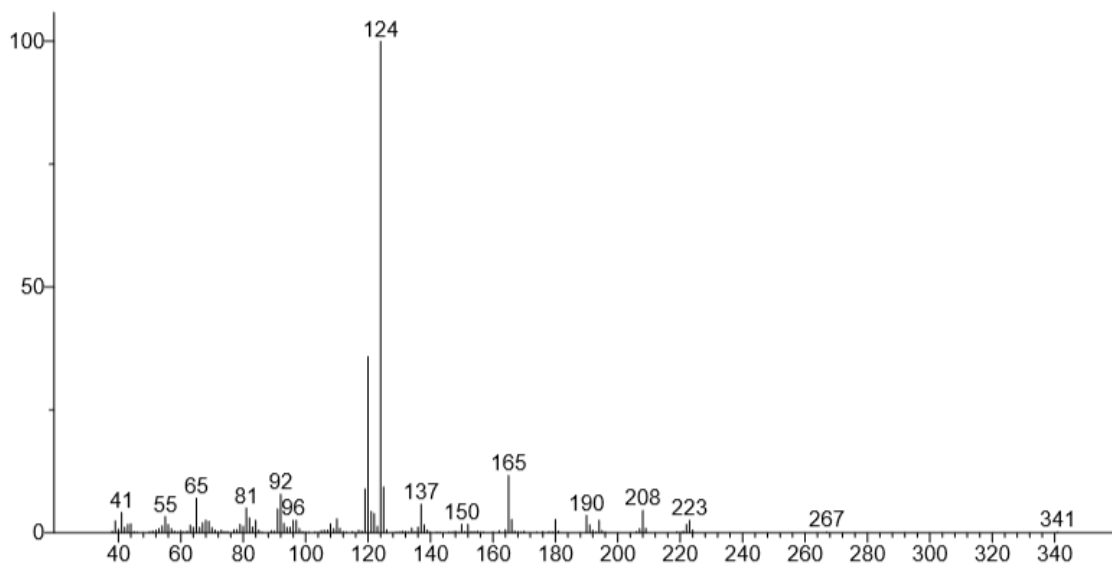
Anexo 21. Espectro de masas de Pumiliotoxina (251D), con un tiempo de retención de 28,378min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2).



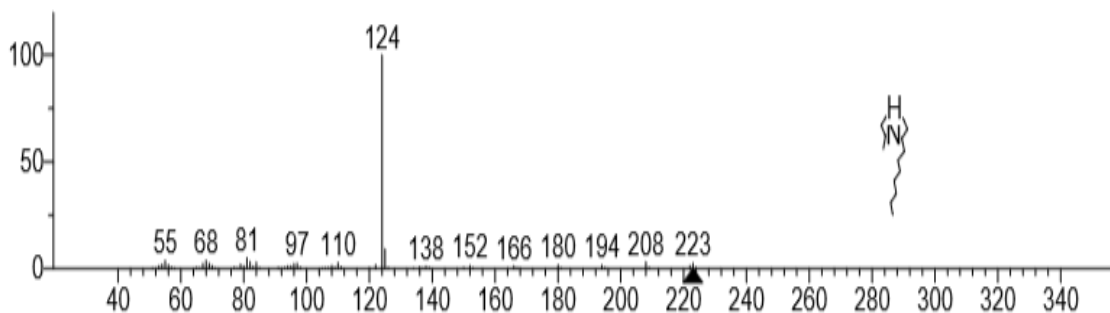
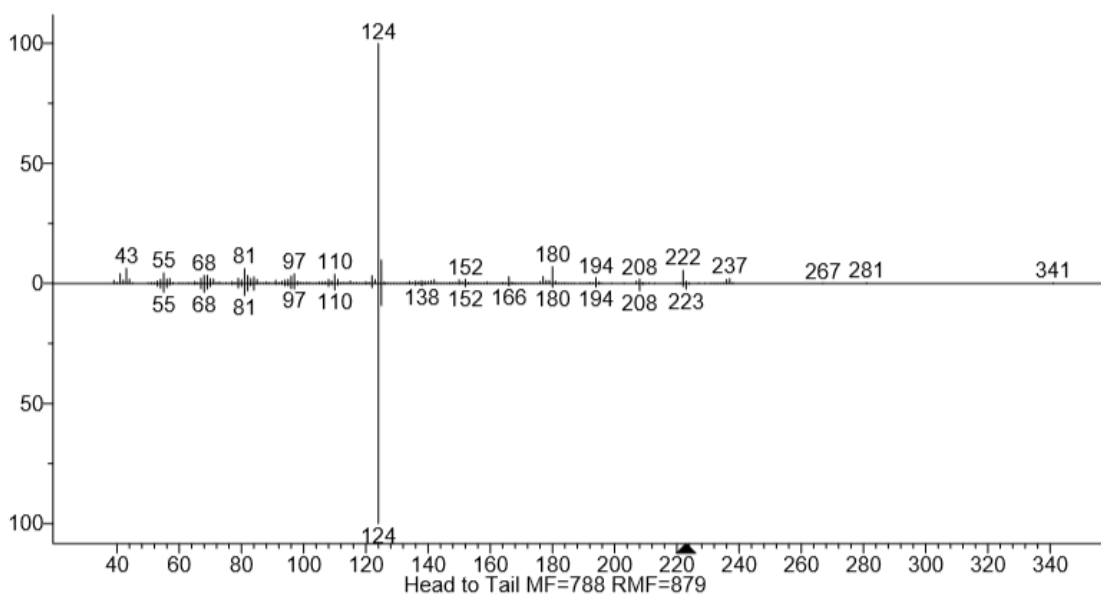
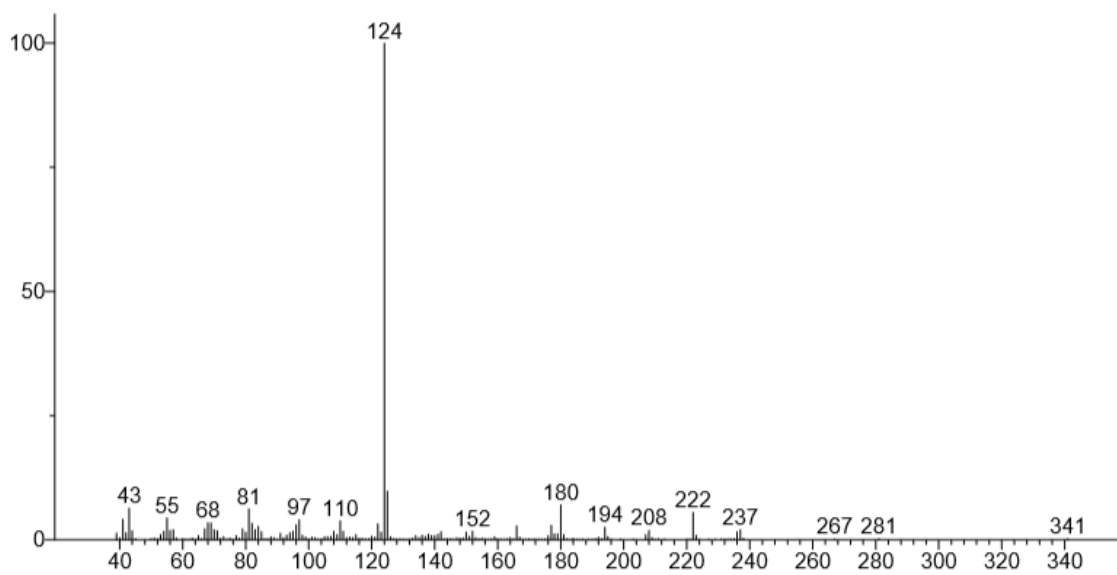
Anexo 22. Espectro de masas de Pumiliotoxina (277B), con un tiempo de retención de 36.057 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A2).



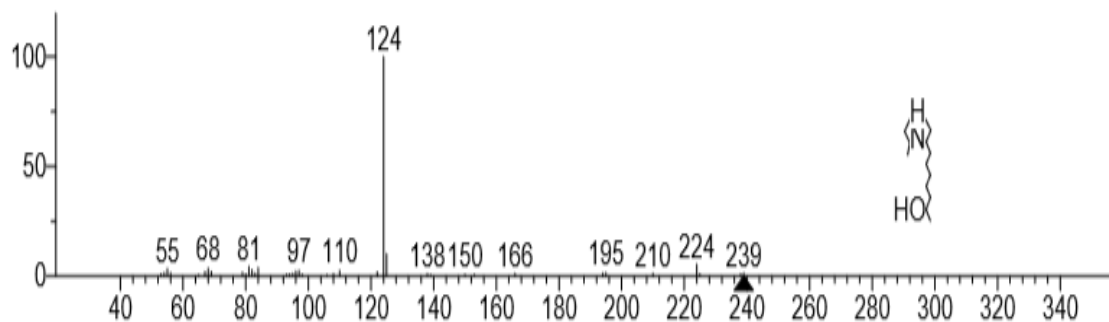
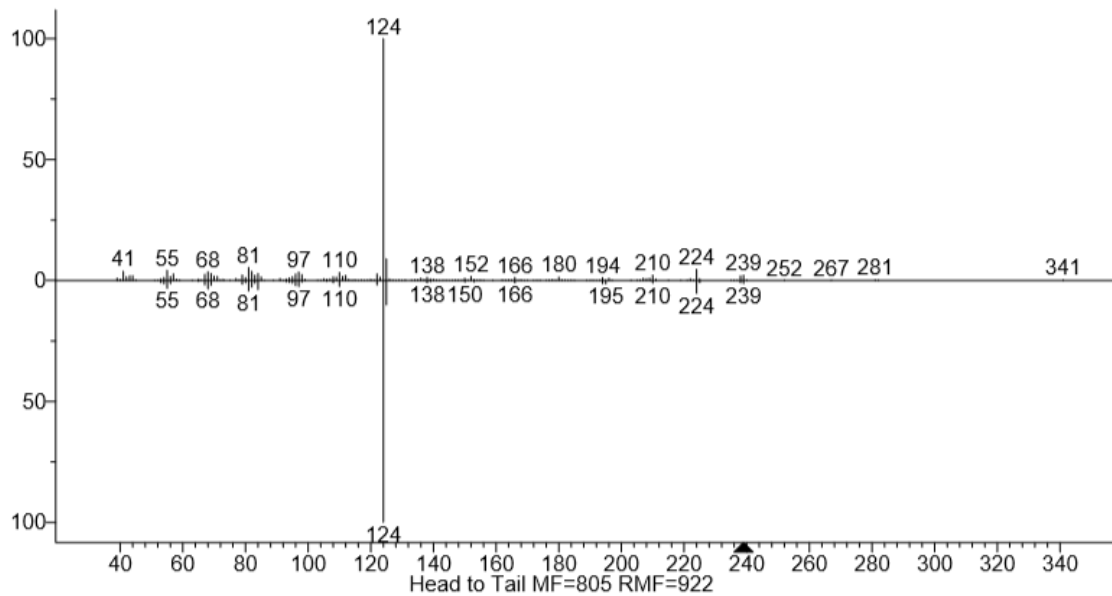
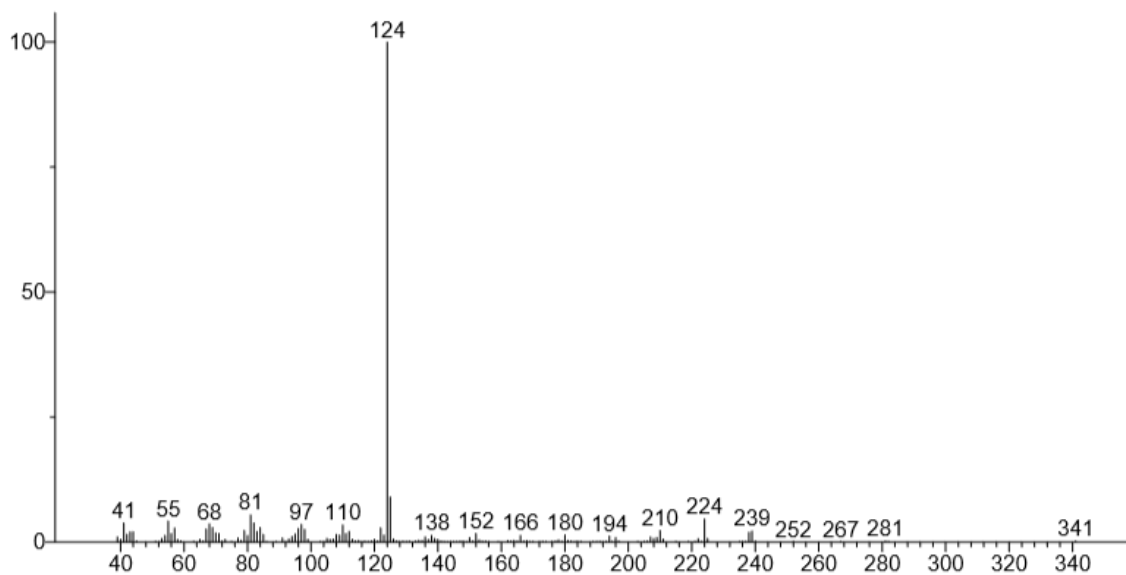
Anexo 23. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (275C), con un tiempo de retención de 31.549 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



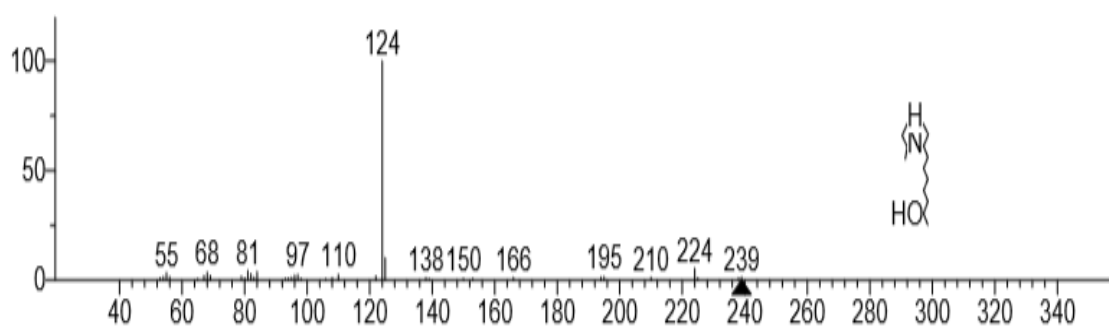
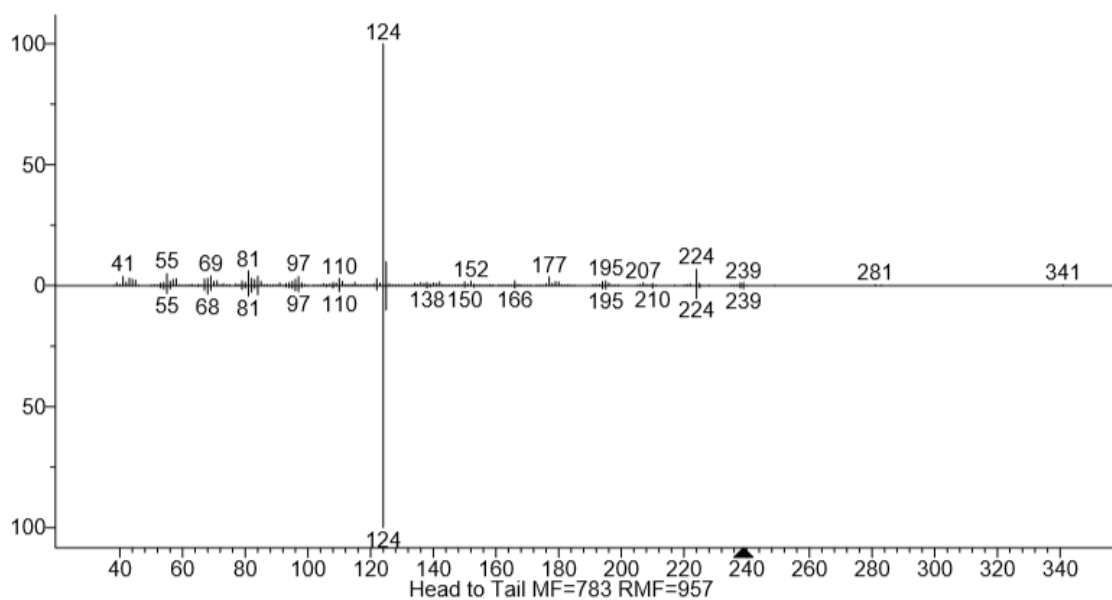
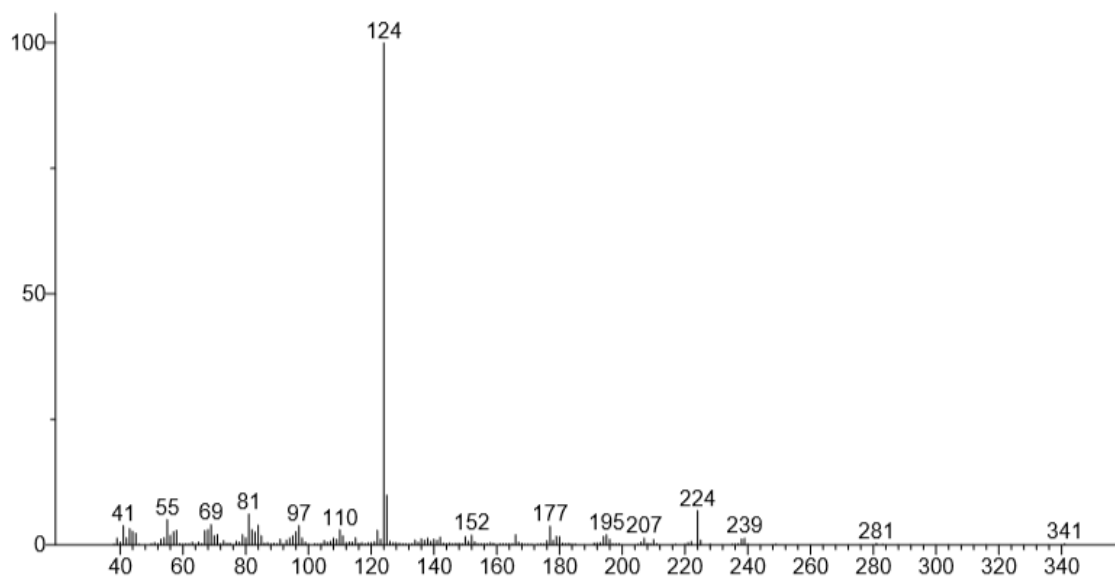
Anexo 24. Espectro de masas de 3,5-Pirrolizidina (223H) Cis, con un tiempo de retención de 24.243 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



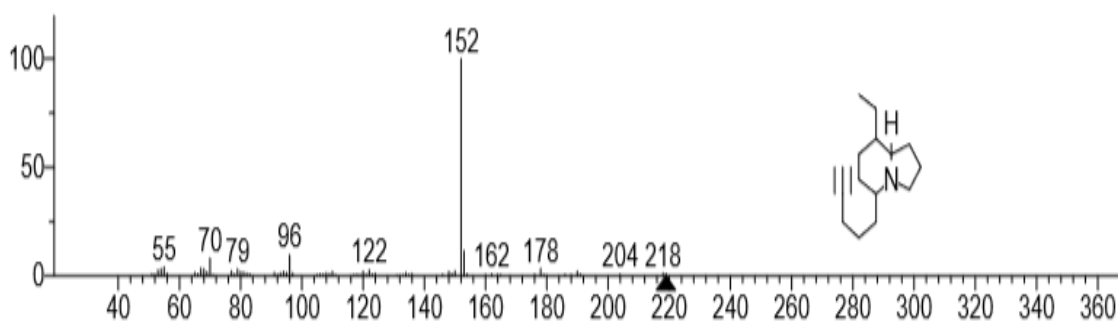
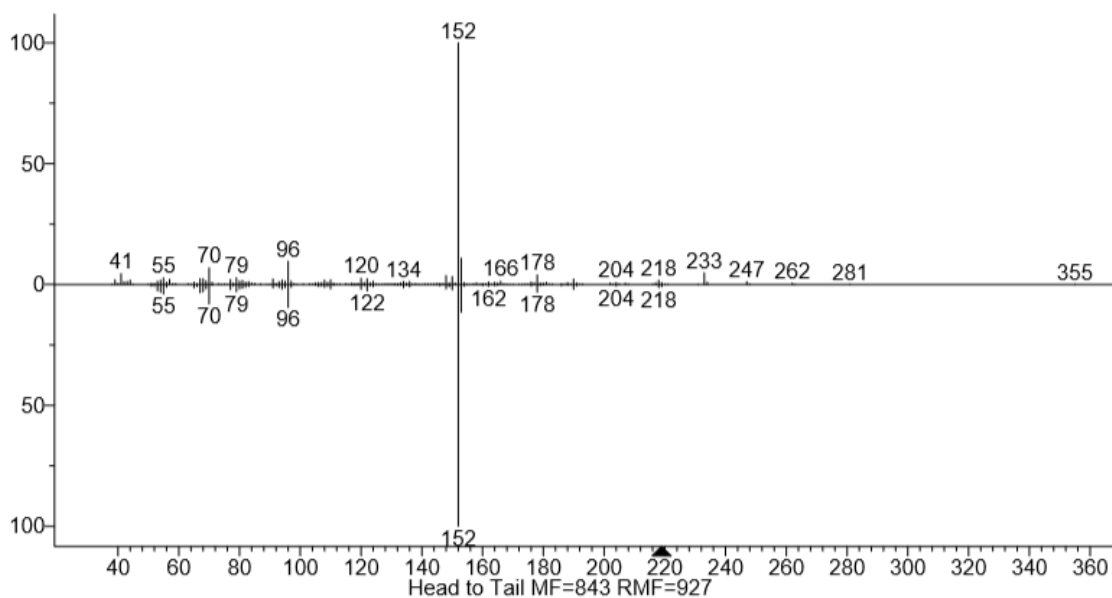
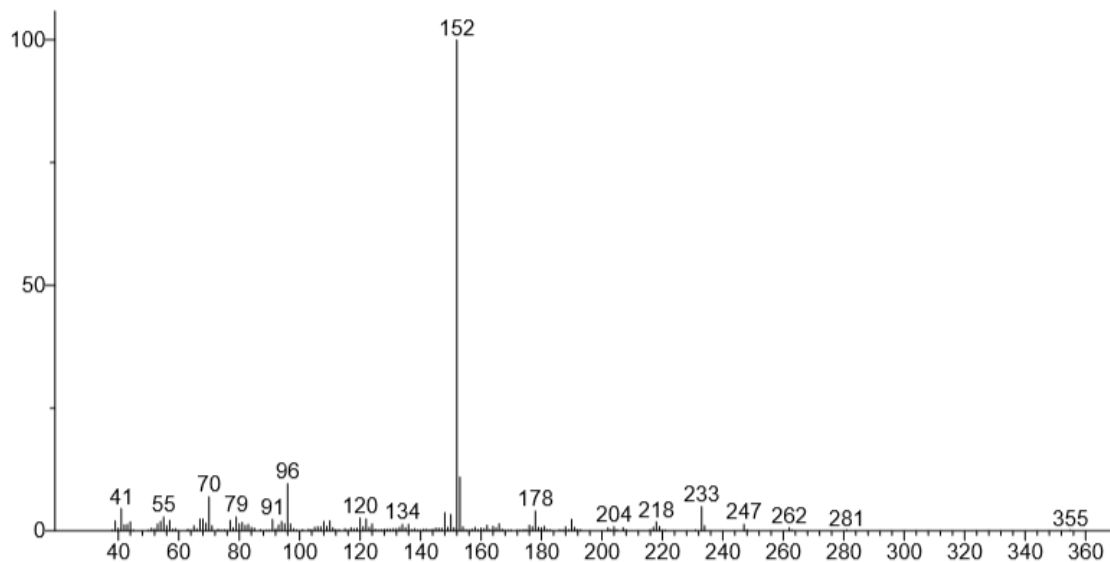
Anexo 25. Espectro de masas de 3,5-Pirrolizidina (223H) Cis, con un tiempo de retención de 29.238 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



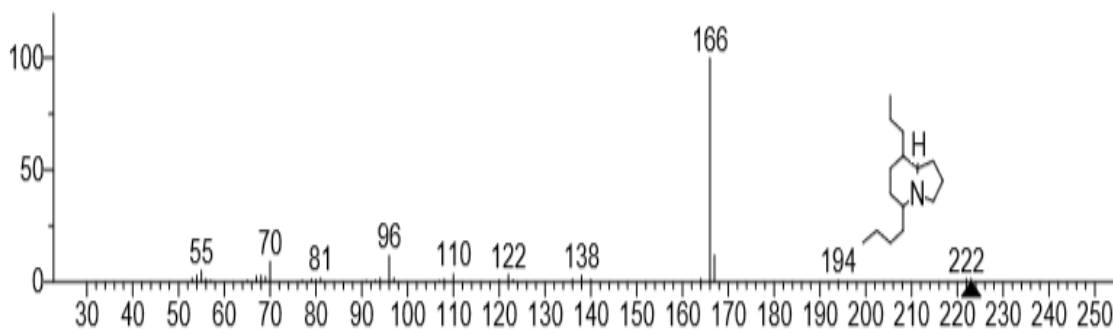
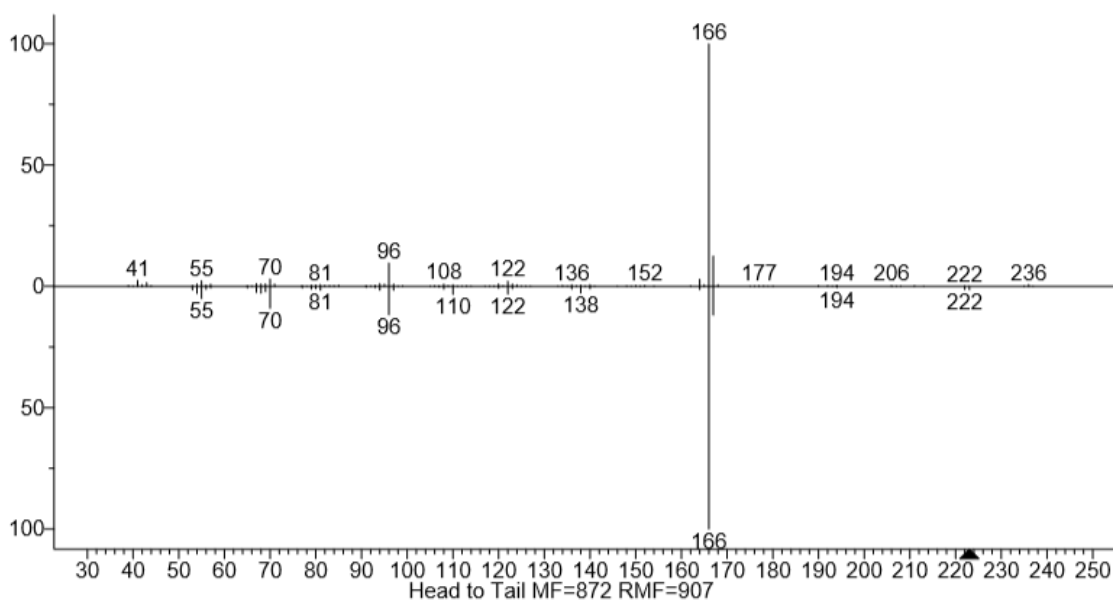
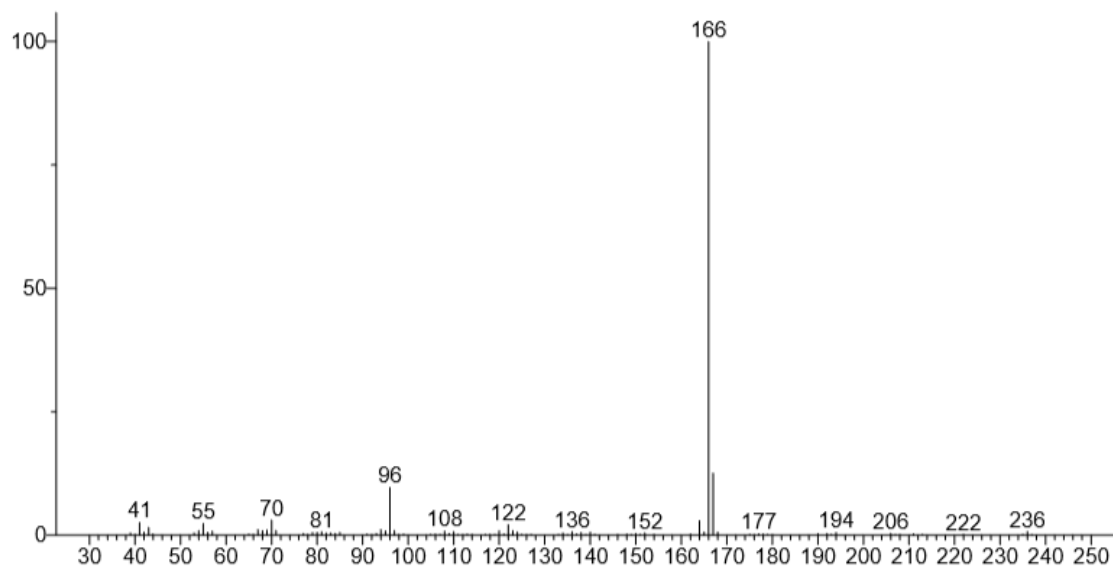
Anexo 26. Espectro de masas de 3,5-Pirrolizidina (239K) Cis, con un tiempo de retención de 31.135 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



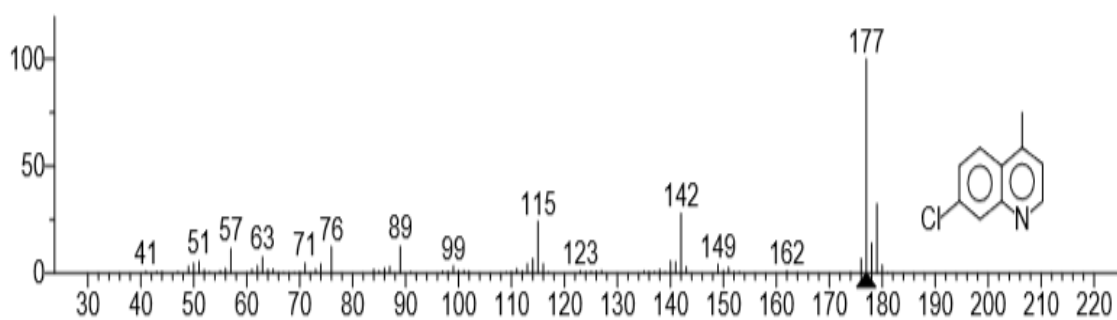
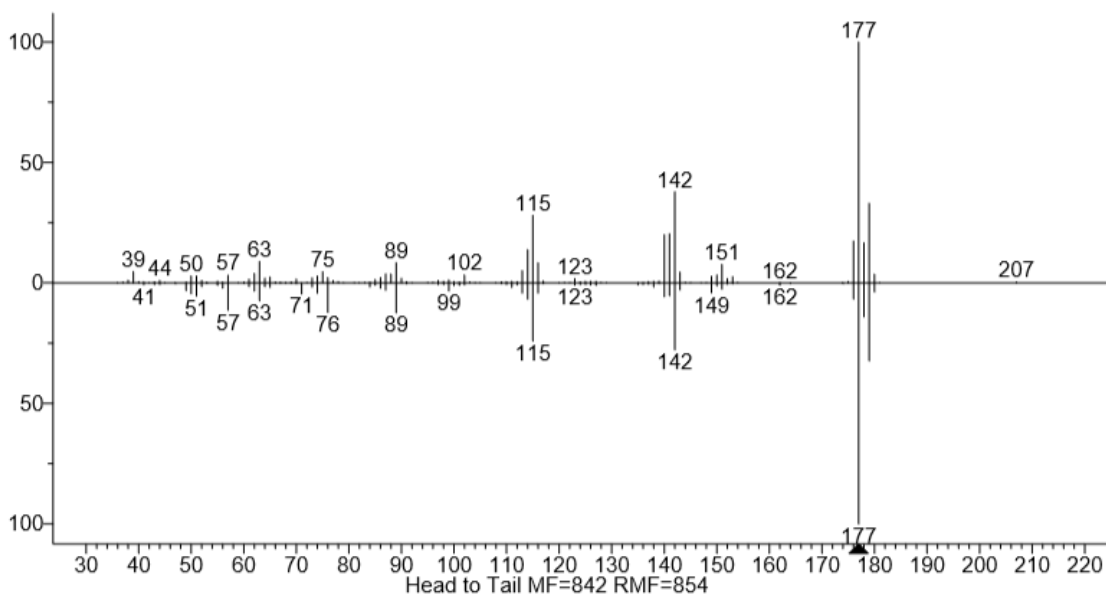
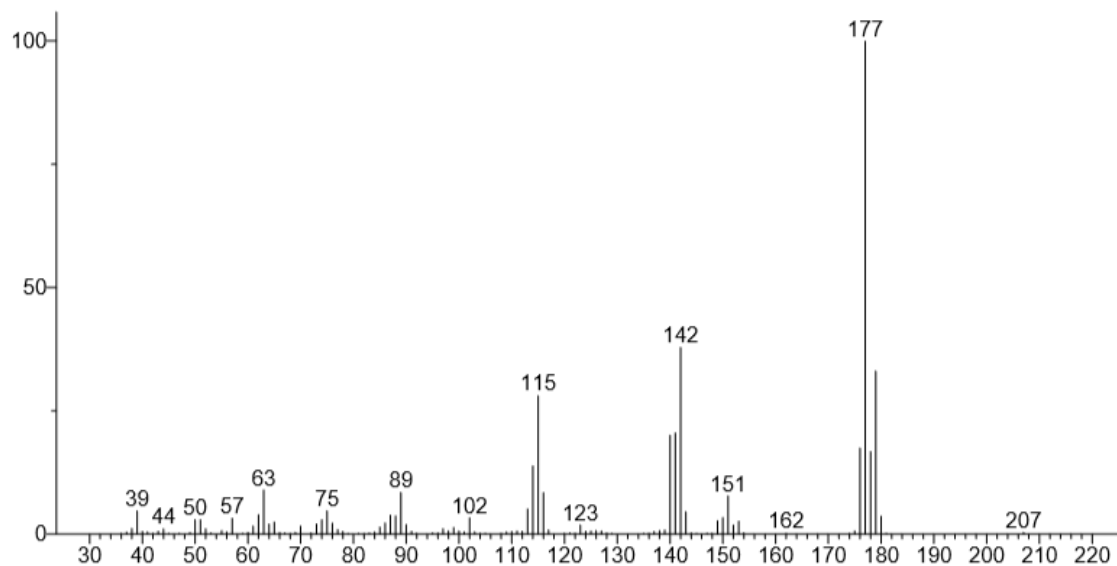
Anexo 27. Espectro de masas de 3,5-Pirrolizidina (239K) Cis, con un tiempo de retención de 29.373 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



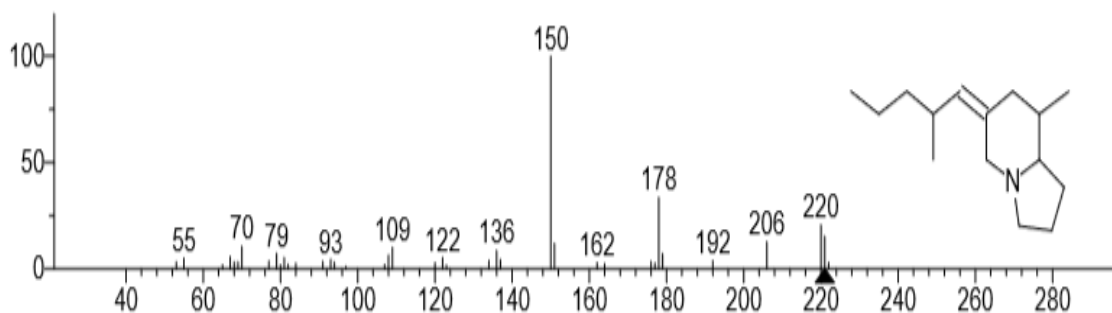
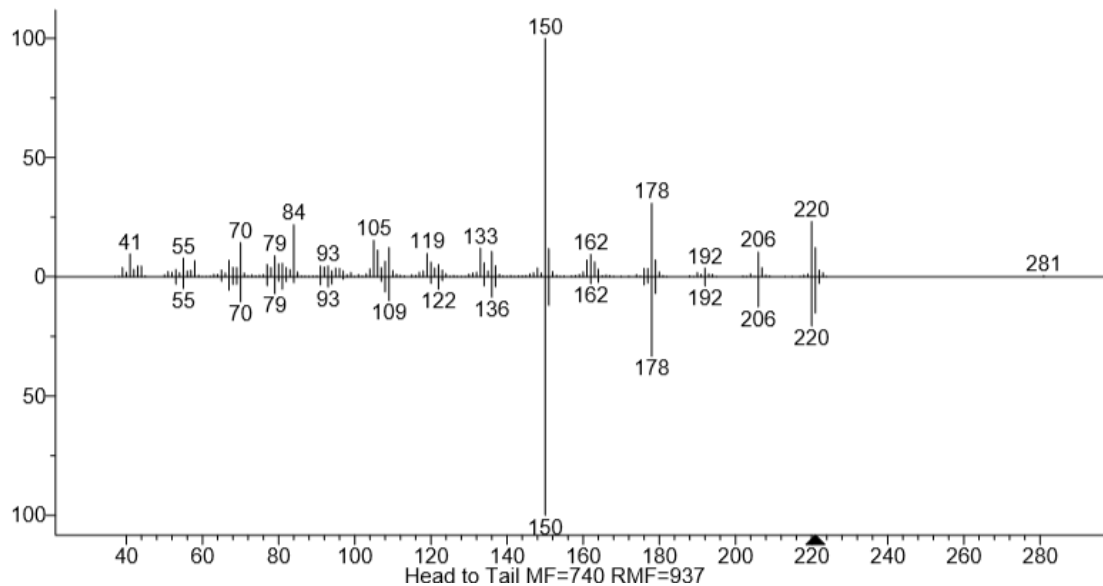
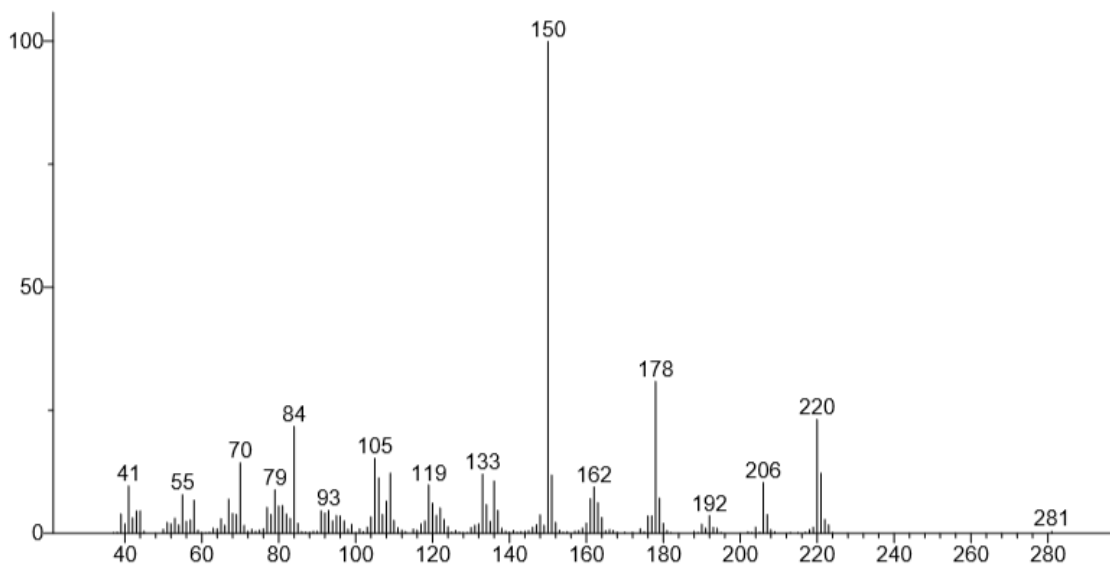
Anexo 28. Espectro de masas de 5,8-Indolizidina (219F), con un tiempo de retención de 25.373 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



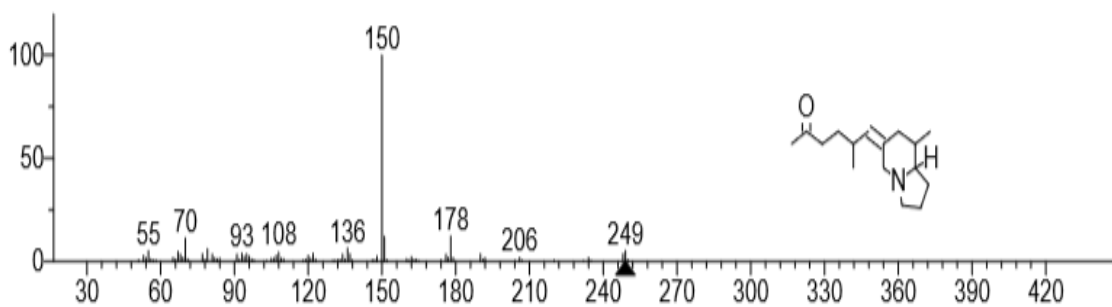
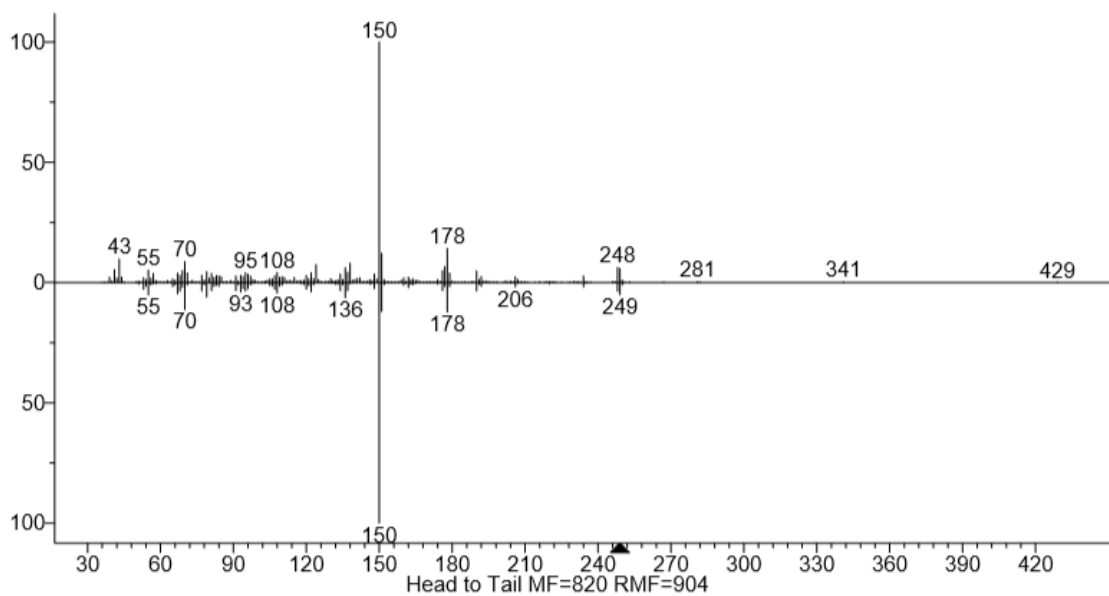
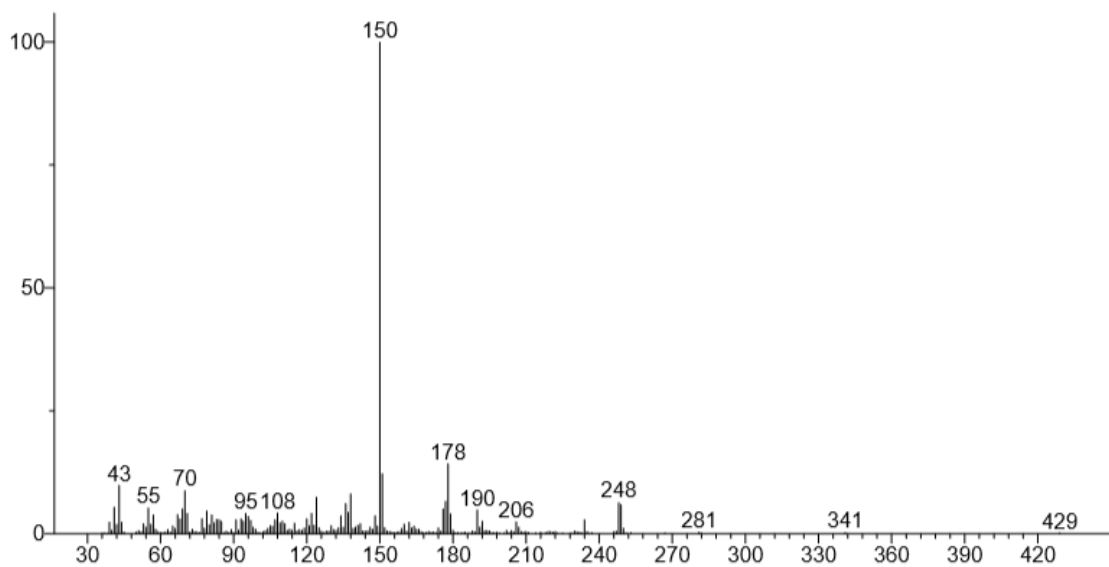
Anexo 29. Espectro de masas de 5,8-Indolizidina (223), con un tiempo de retención de 27.186 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



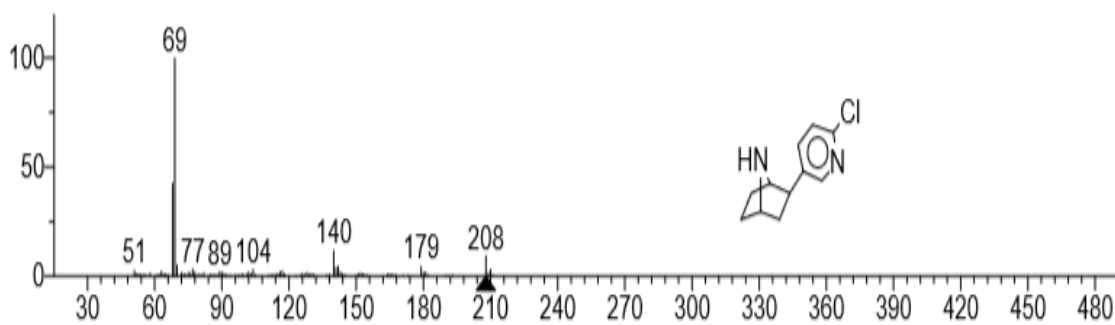
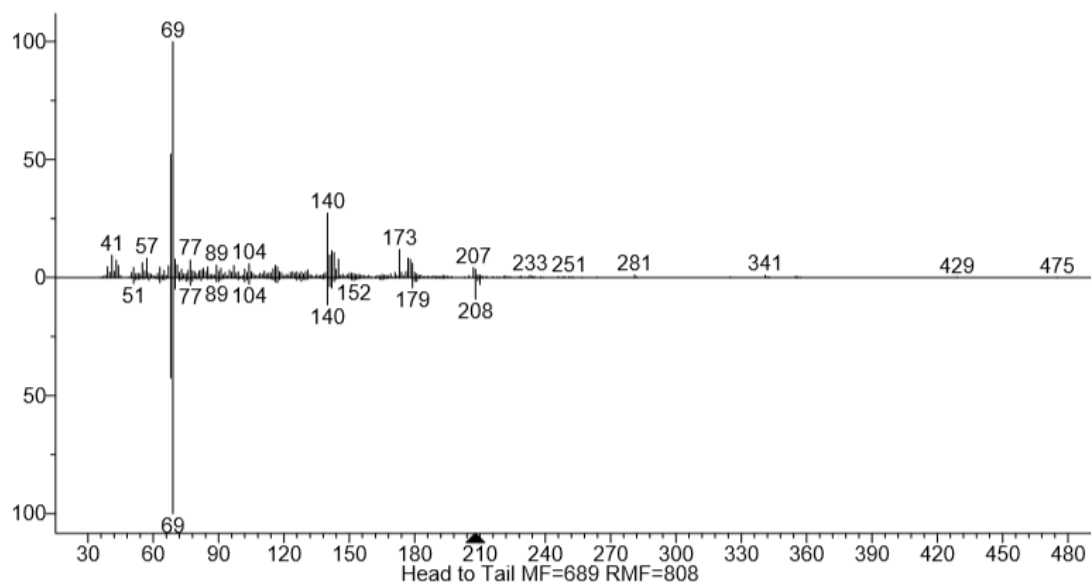
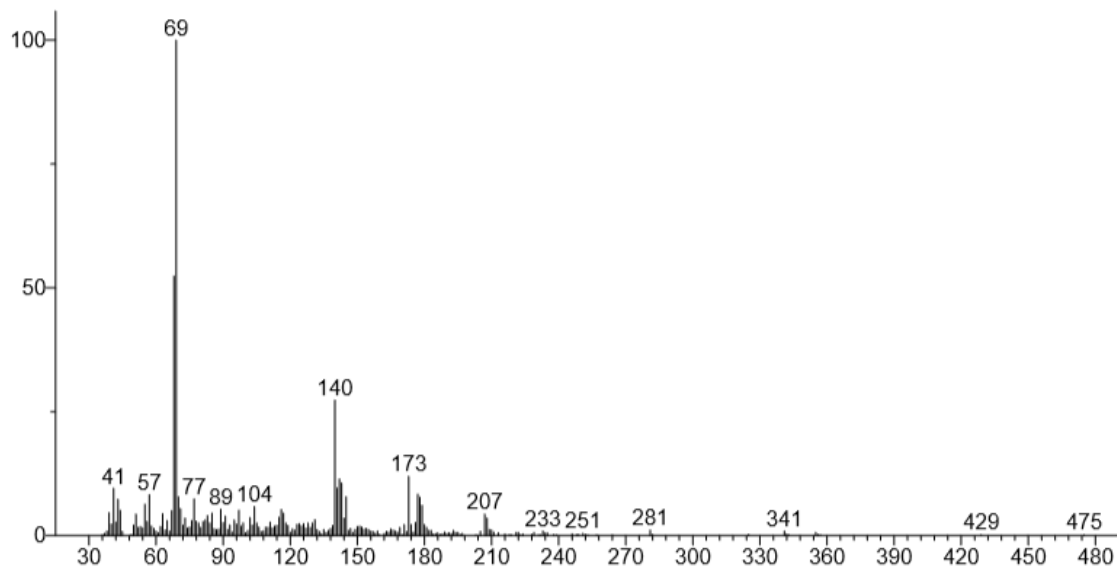
Anexo 30. Espectro de masas de 7-cloro, 4-metil-quinolina, con un tiempo de retención de 24.616 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



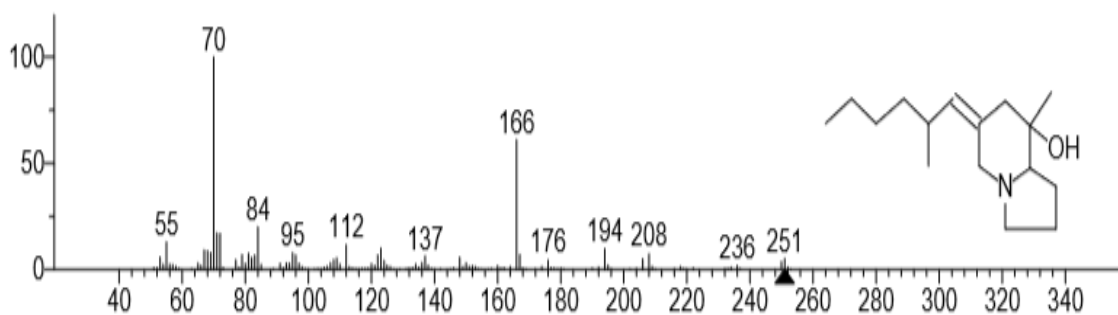
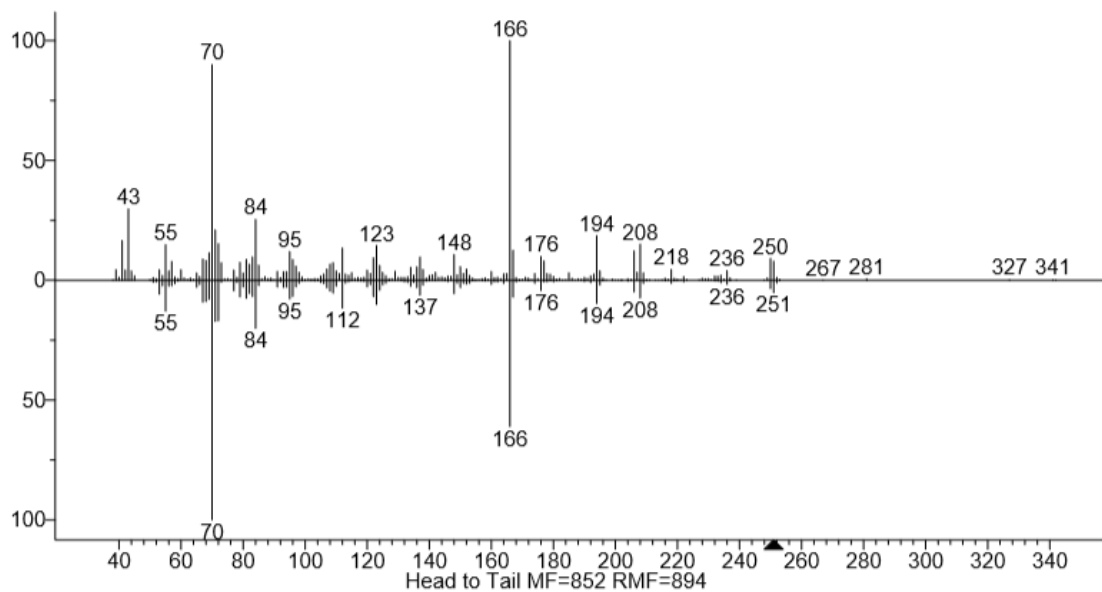
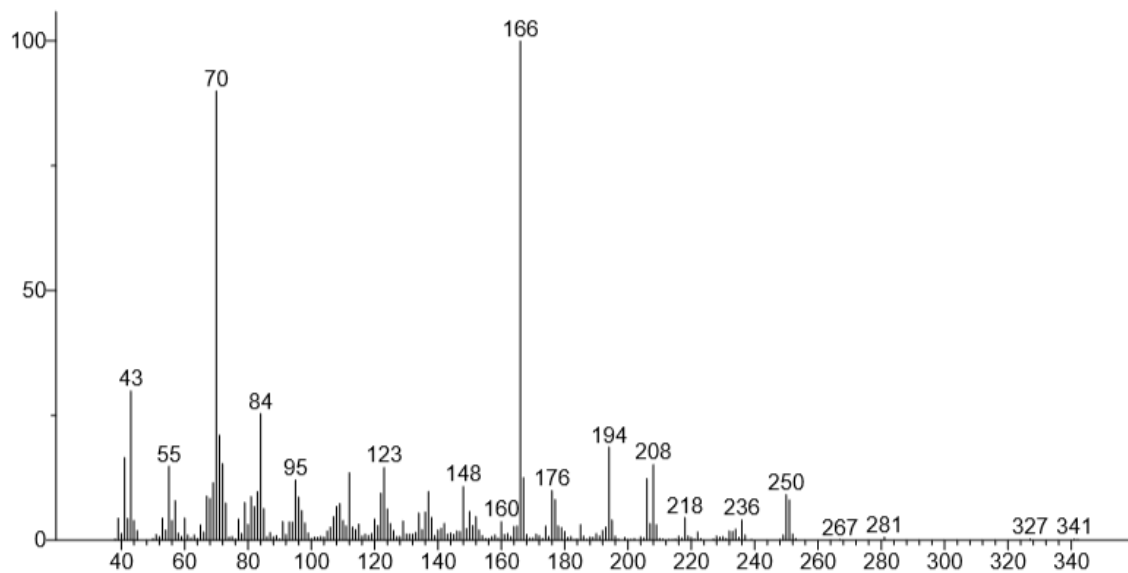
Anexo 31. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (221), con un tiempo de retención de 22.264 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



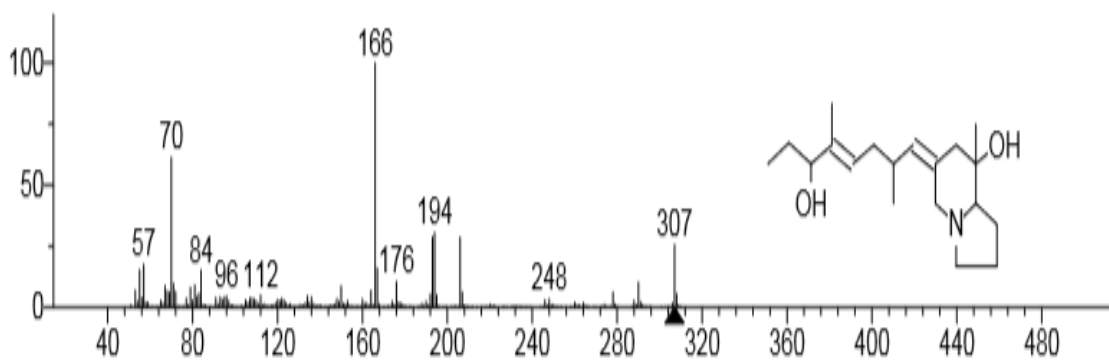
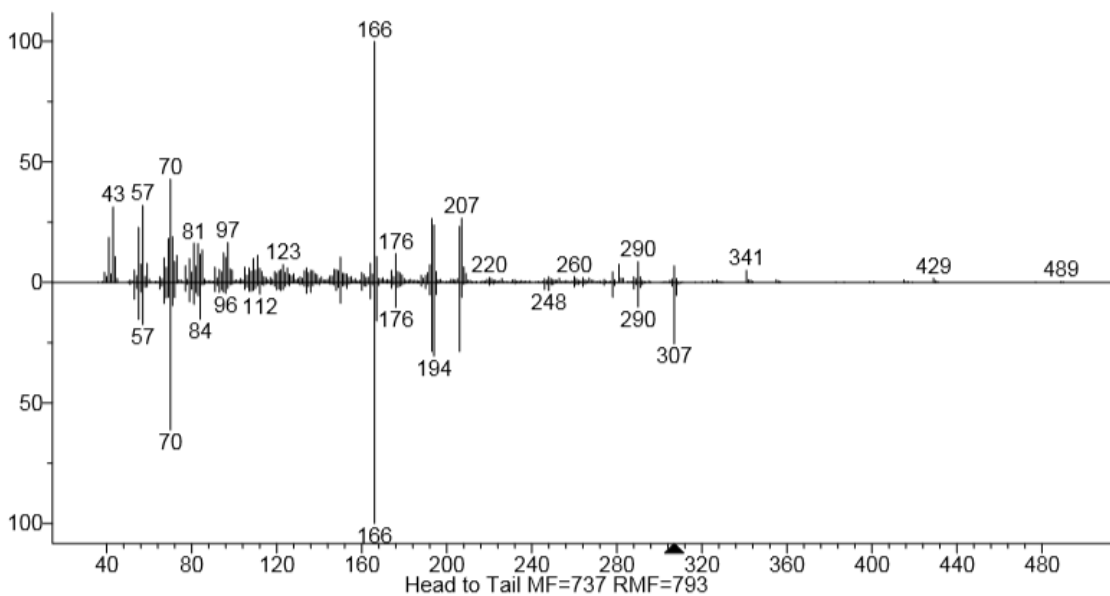
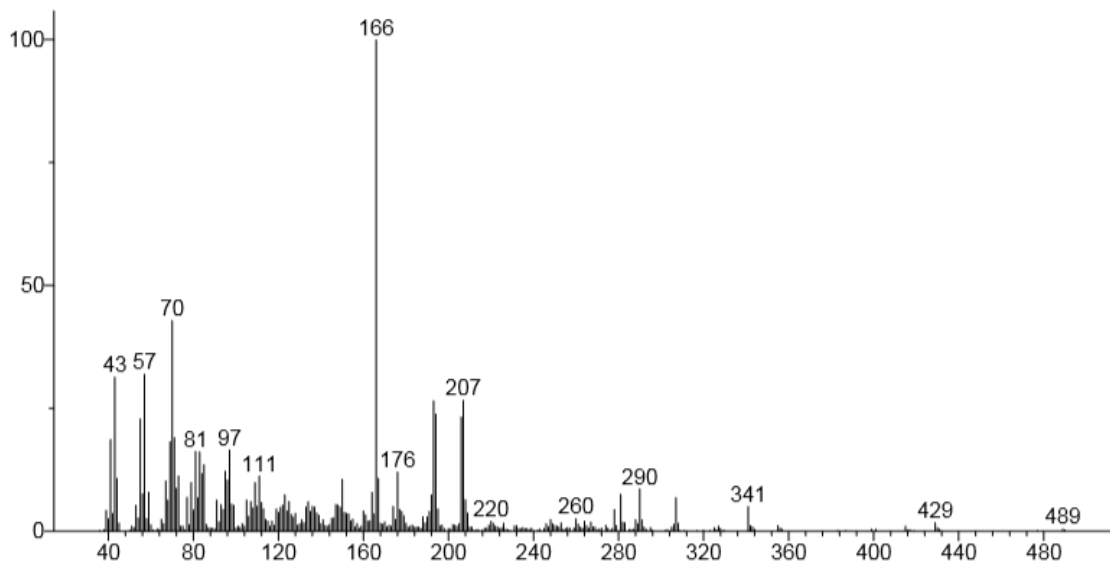
Anexo 32. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (249), con un tiempo de retención de 28.710 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



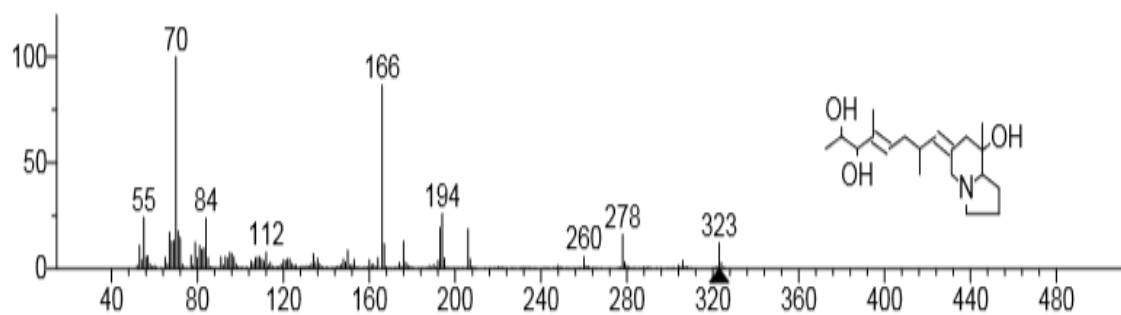
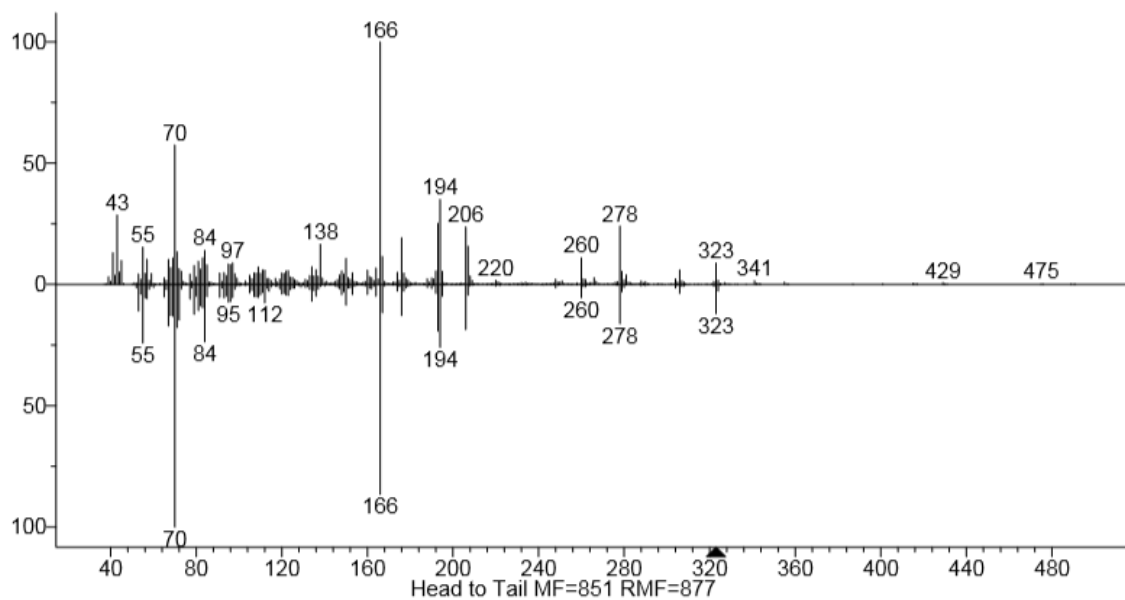
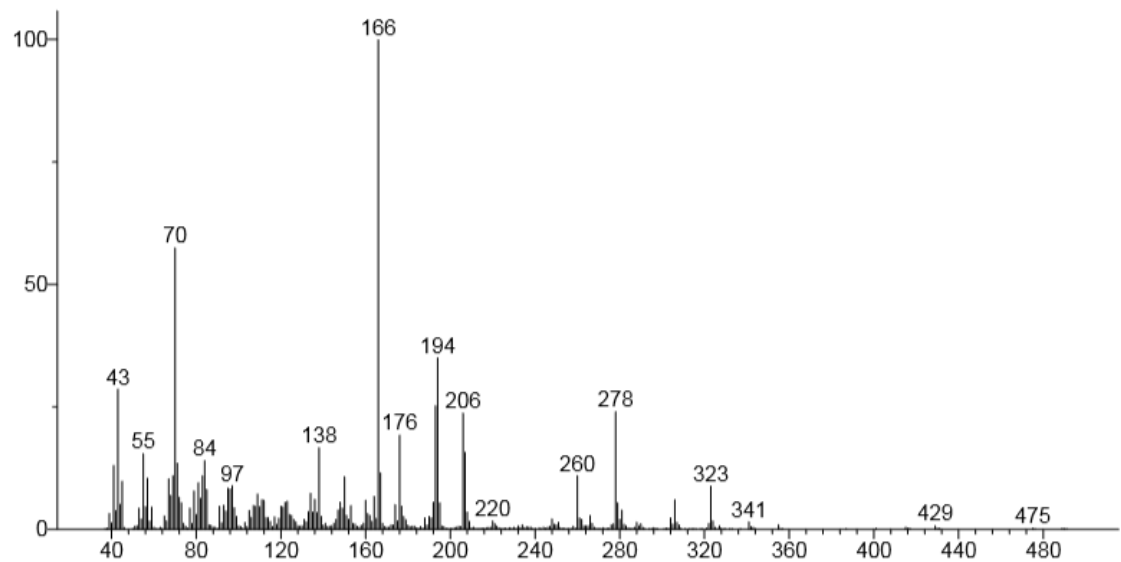
Anexo 33. Espectro de masas de Epibatidina, con un tiempo de retención de 29.870 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



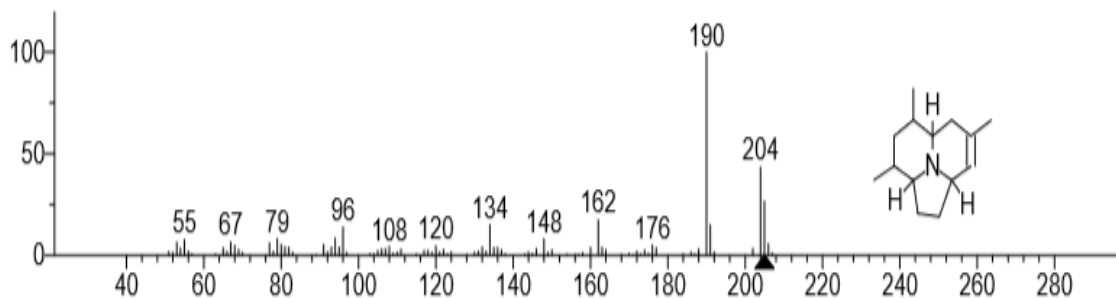
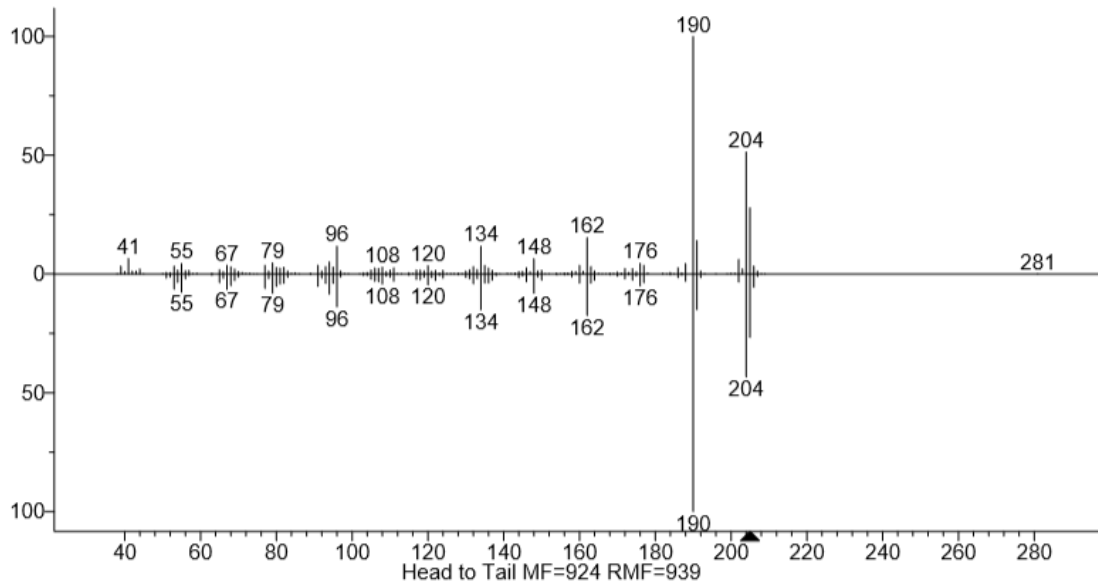
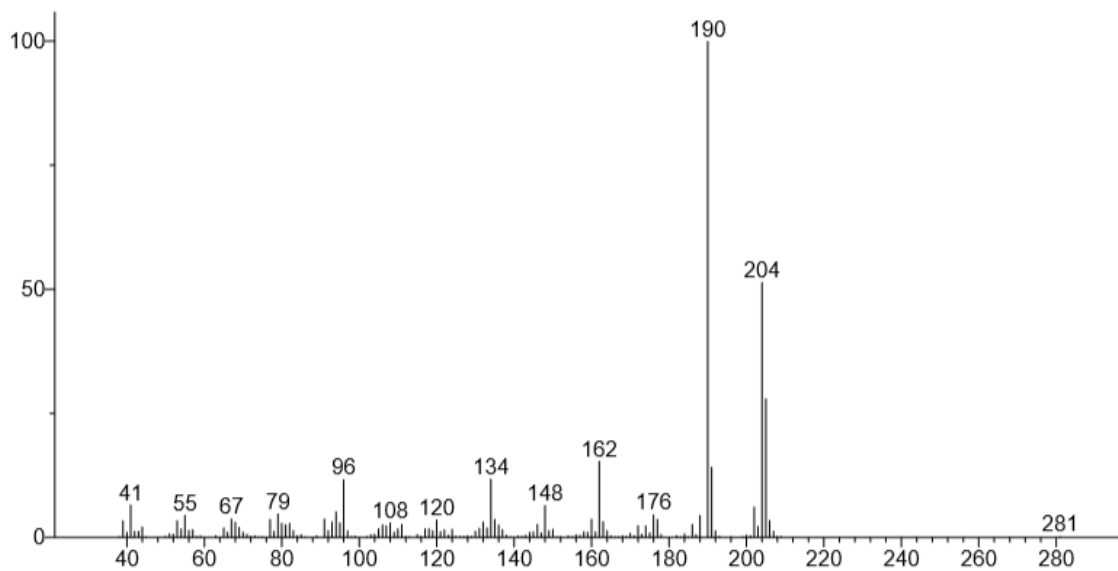
Anexo 34. Espectro de masas de Pumiliotoxina (251D), con un tiempo de retención de 28.378 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



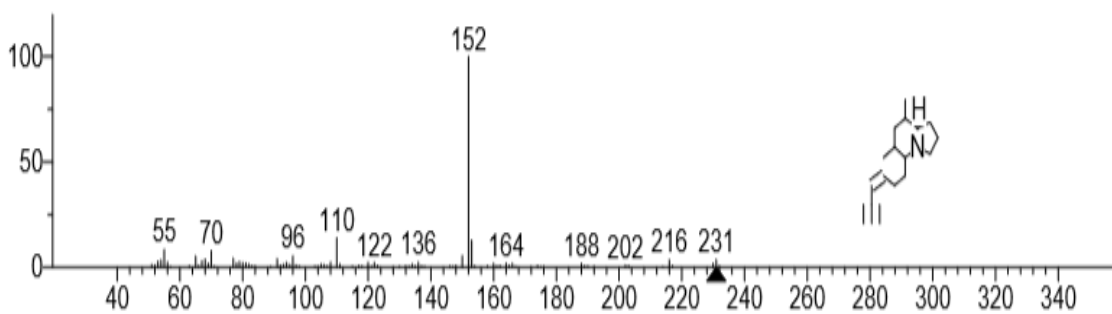
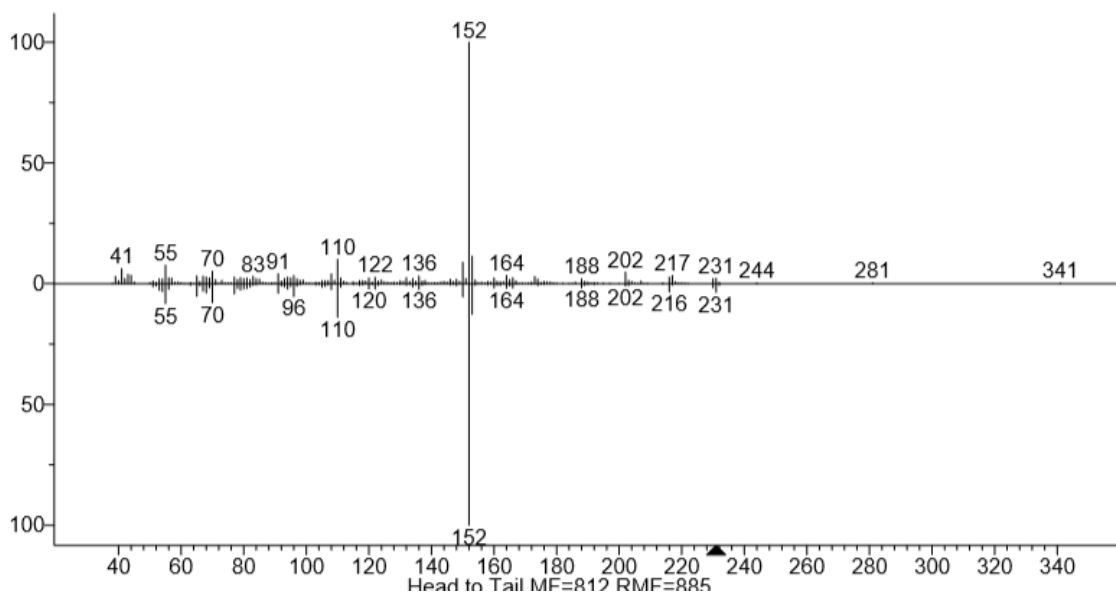
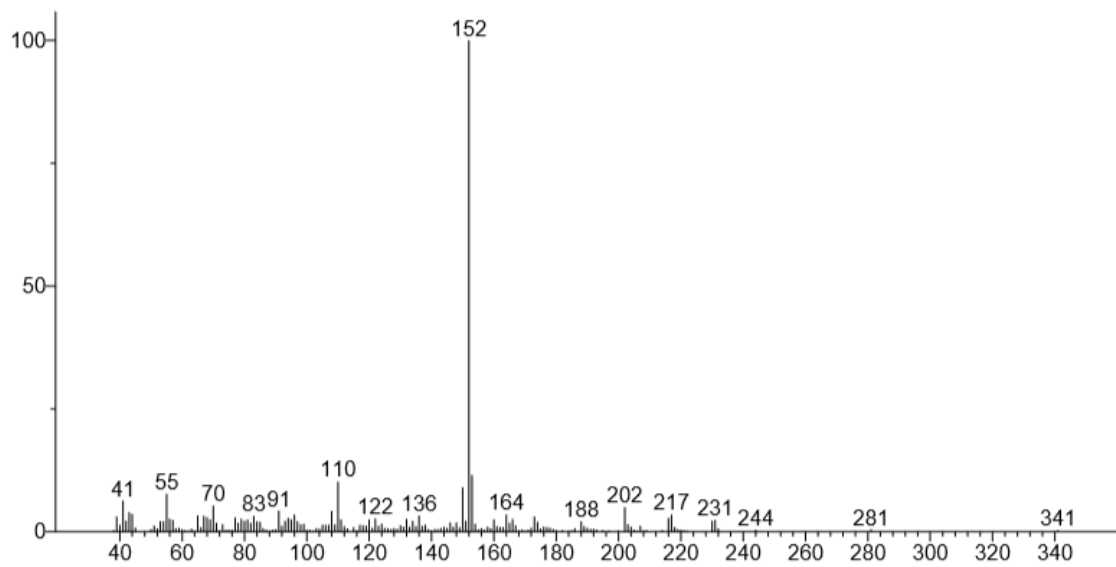
Anexo 35. Espectro de masas de Pumiliotoxina A, con un tiempo de retención de 38.441 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



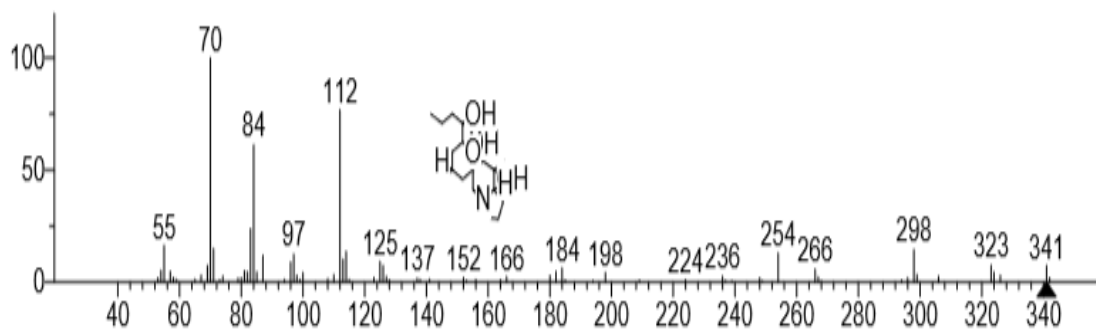
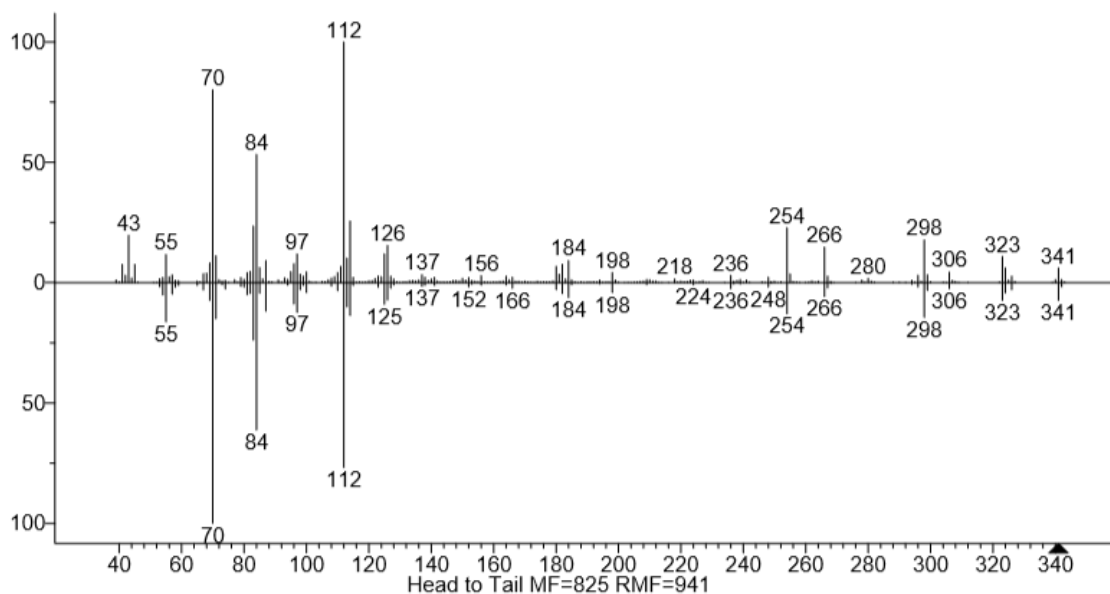
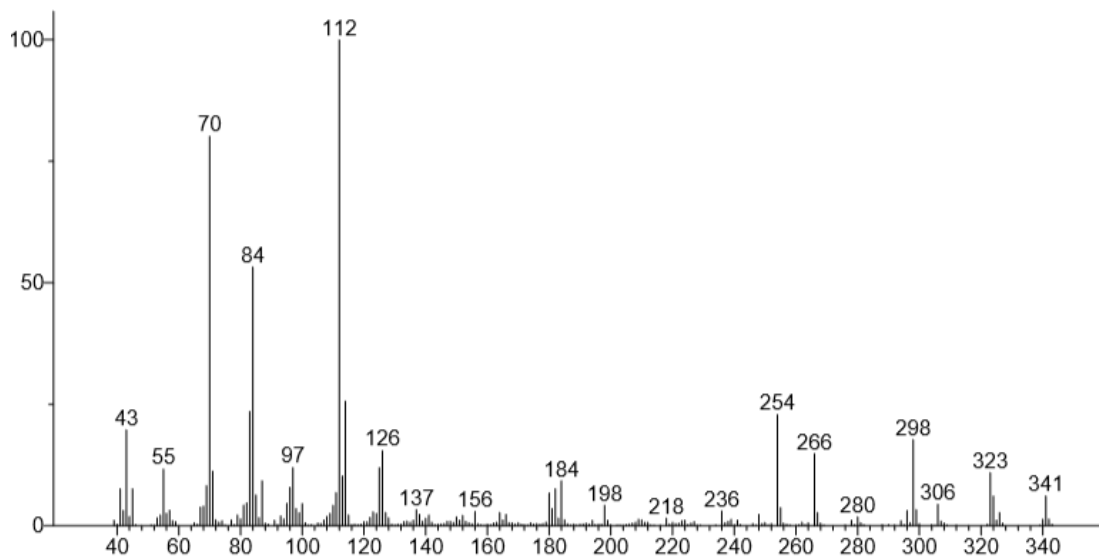
Anexo 36. Espectro de masas de Pumiliotoxina B, con un tiempo de retención de 41.715 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



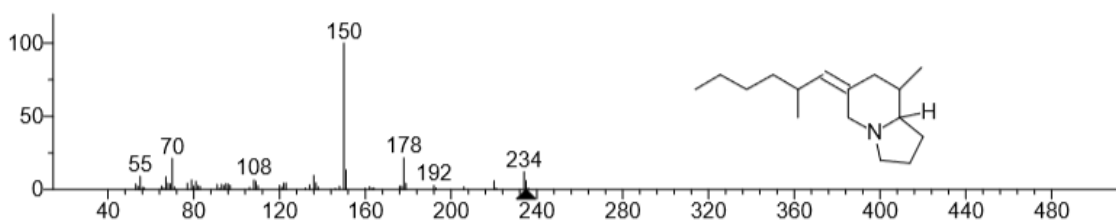
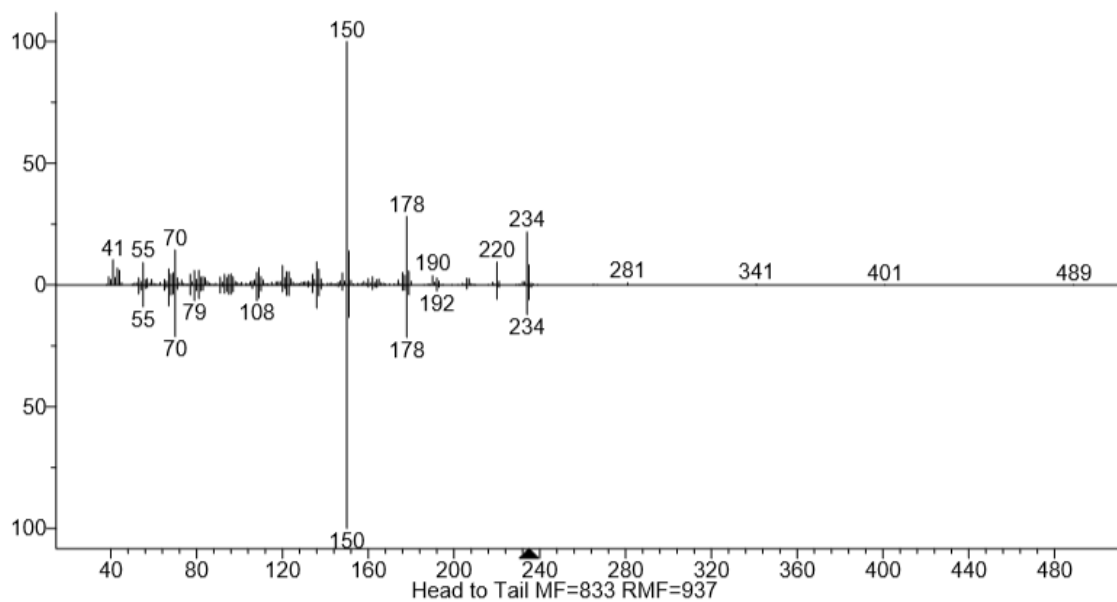
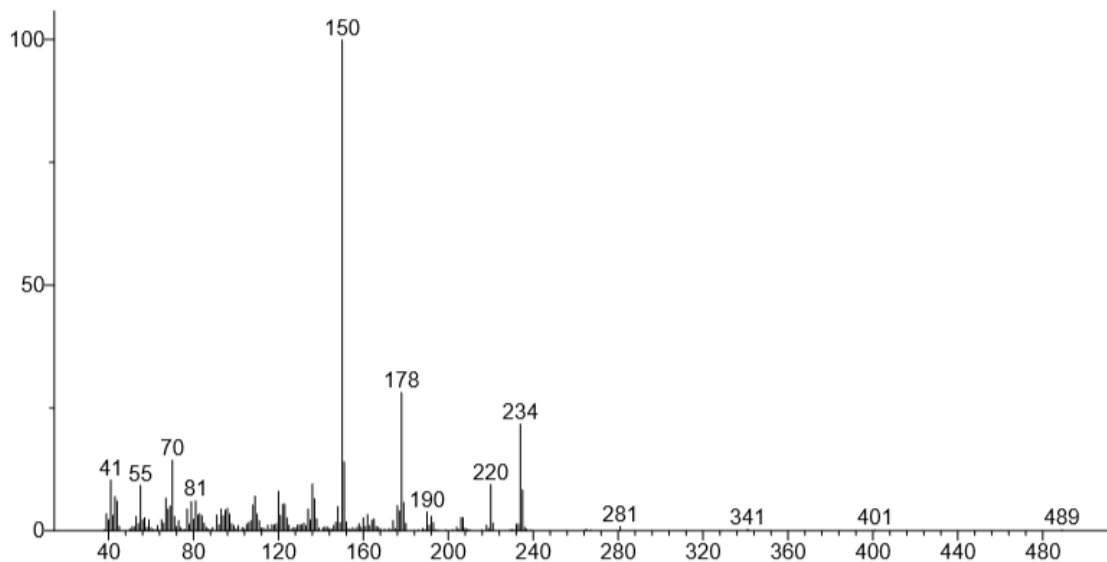
Anexo 37. Espectro de masas de Tricíclico (205B), con un tiempo de retención de 21.828 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A3).



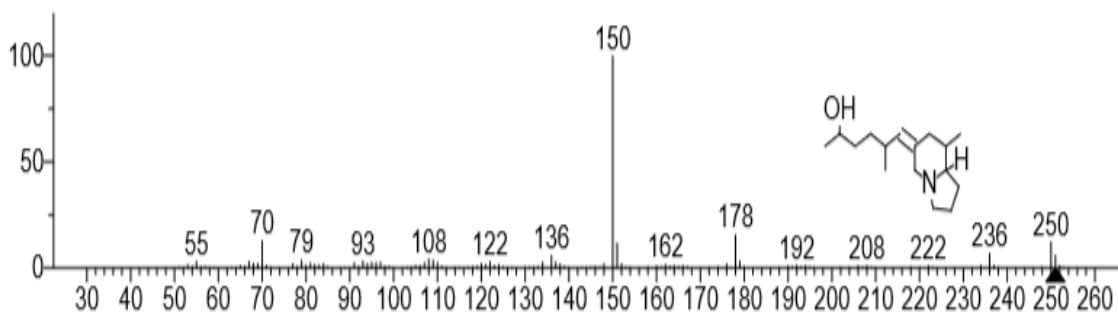
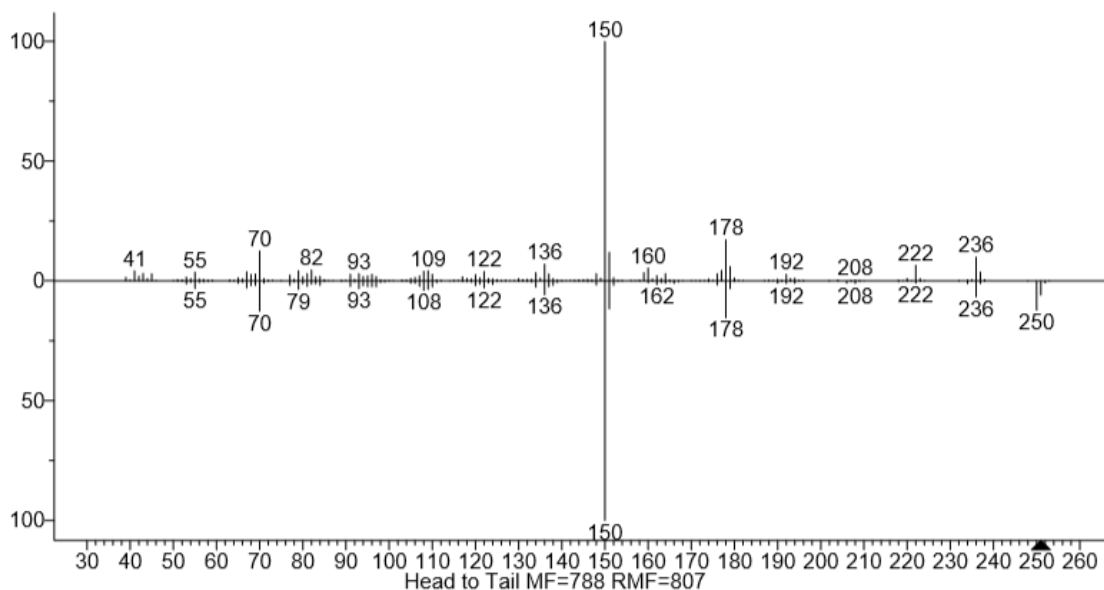
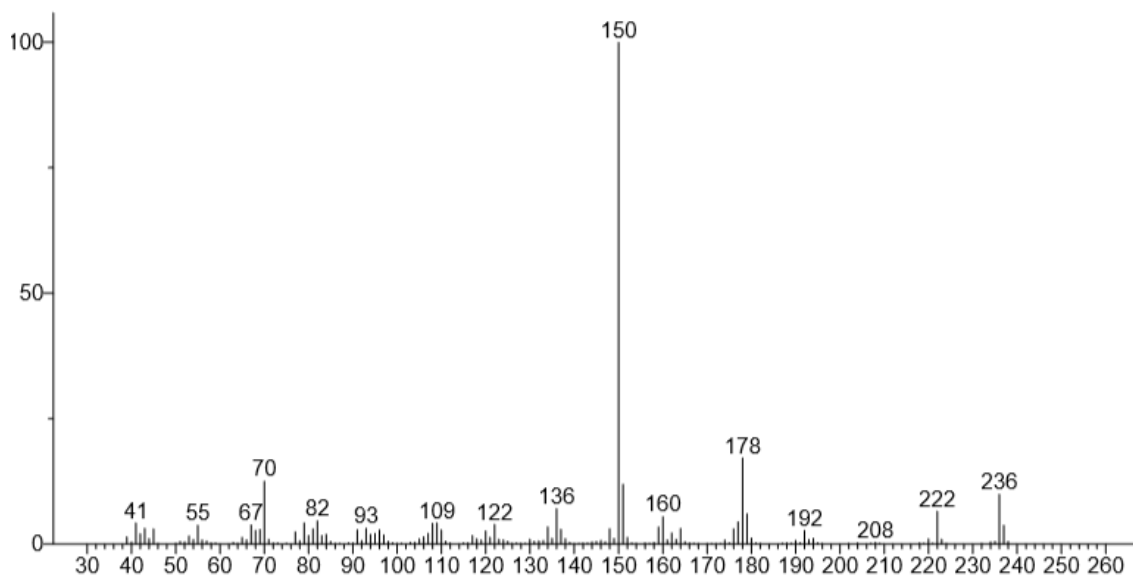
Anexo 38. Espectro de masas de 5,6,8-Indolizidina (231B), con un tiempo de retención de 25.932min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A4).



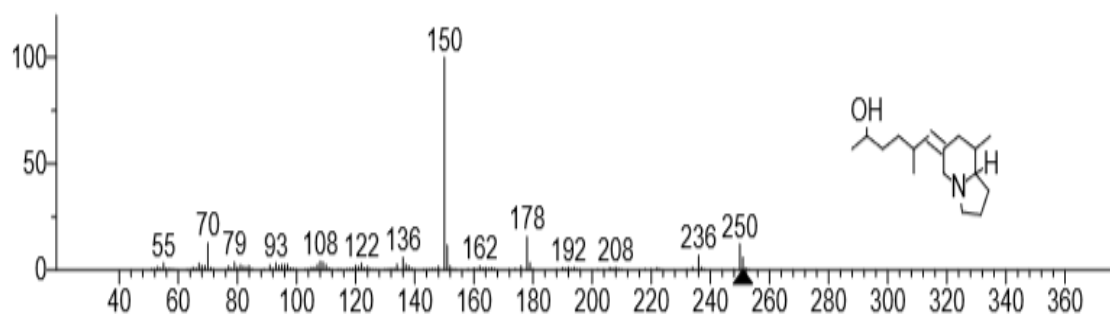
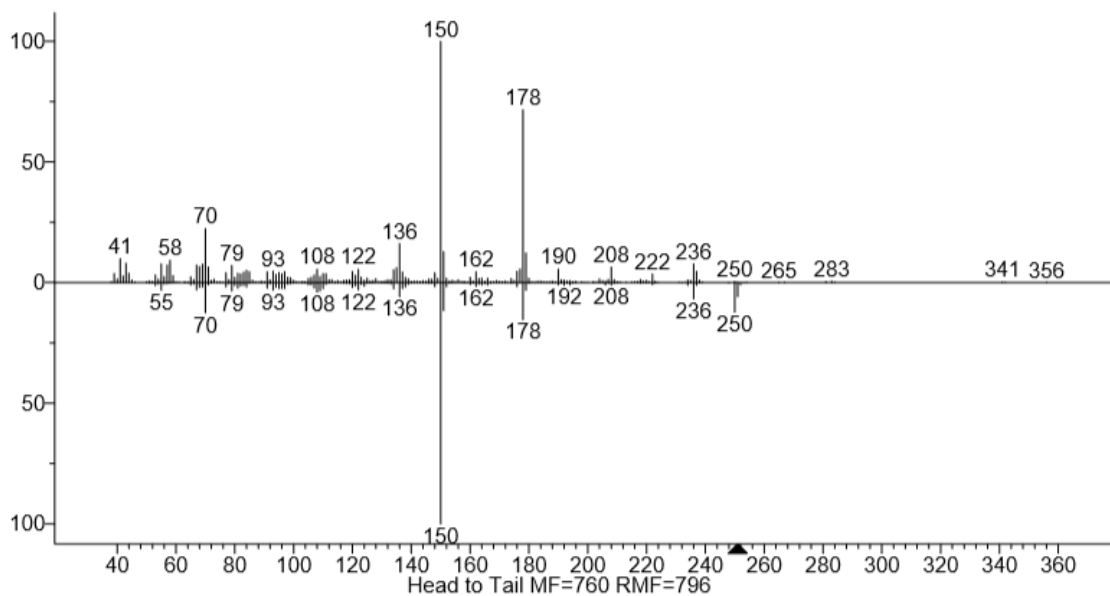
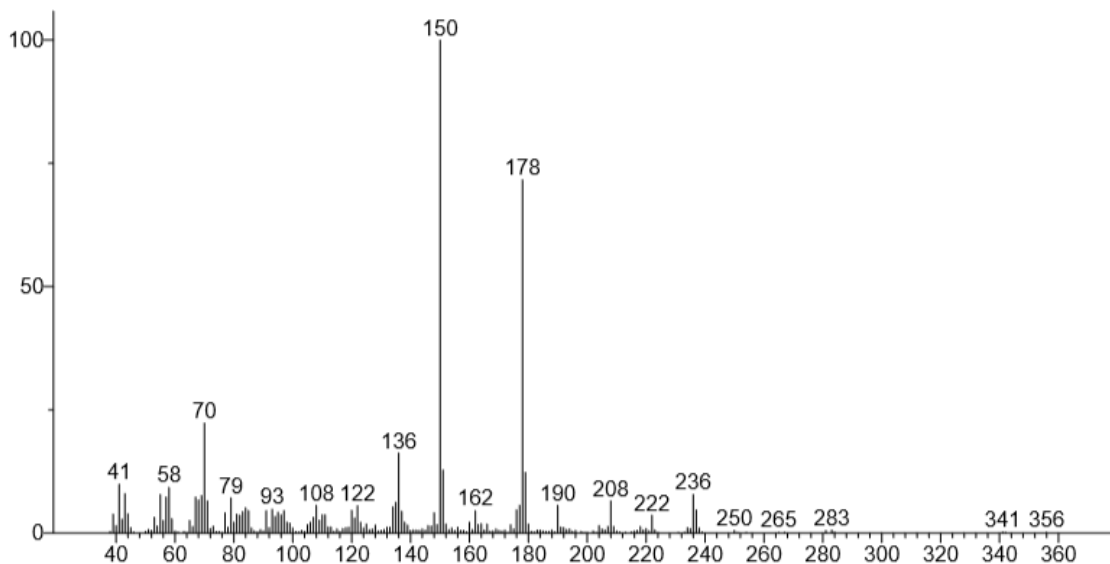
Anexo 39. Espectro de masas de Alopumiliotoxina (341A), con un tiempo de retención de 40.233 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A4).



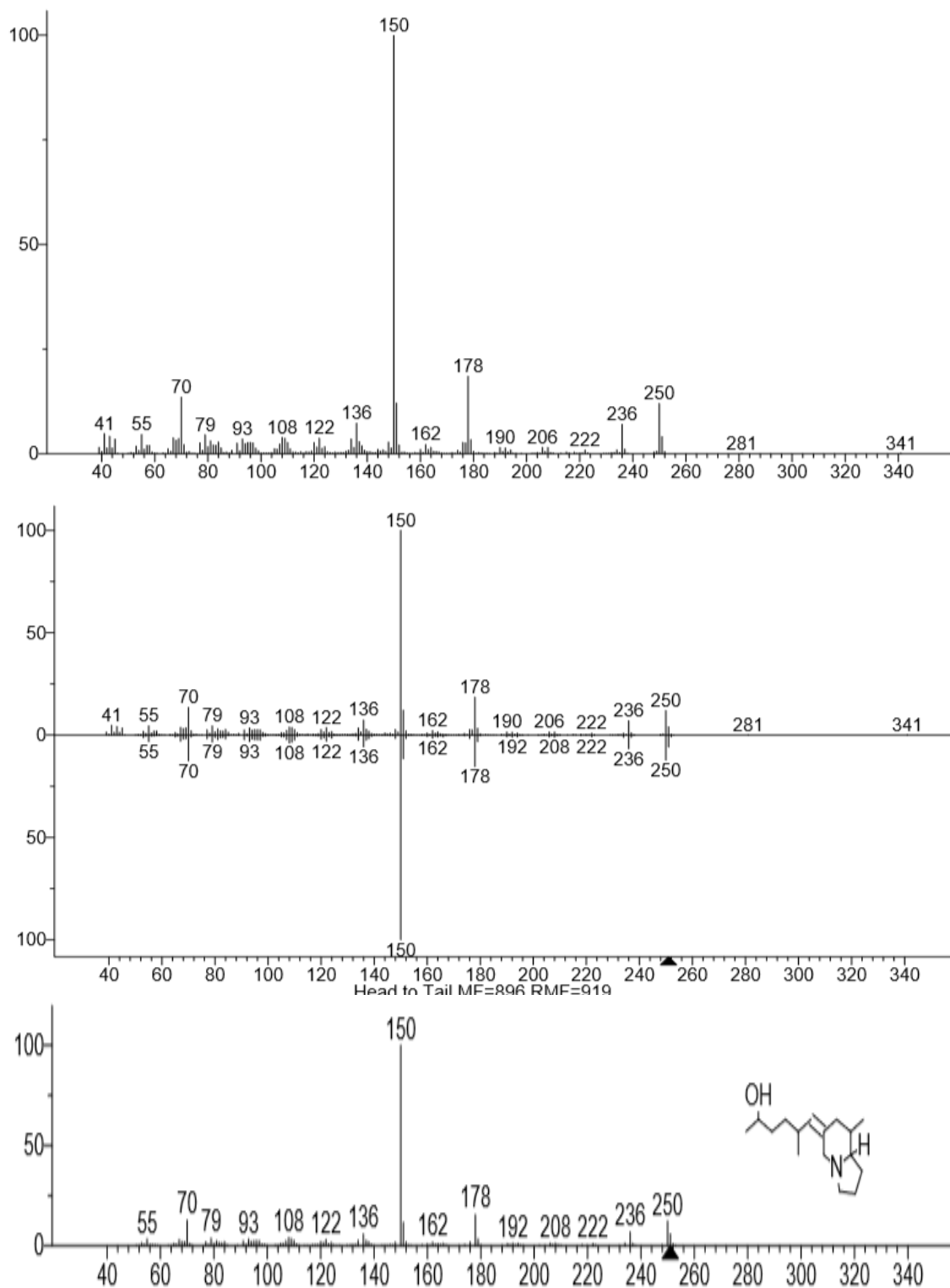
Anexo 40. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (235V), con un tiempo de retención de 24.357 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A4).



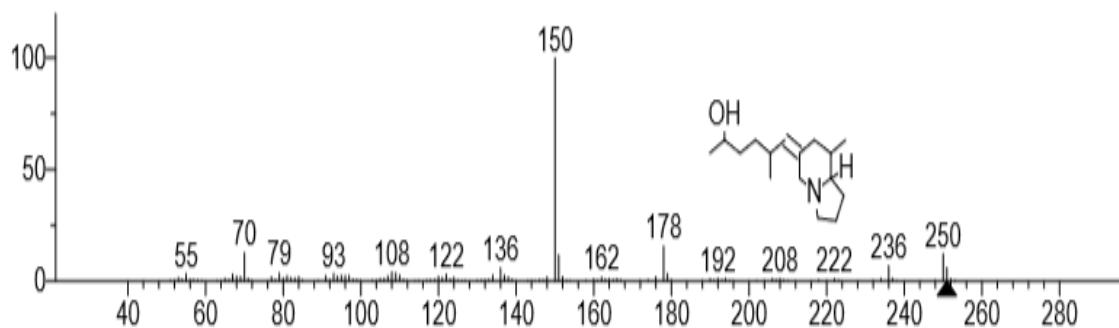
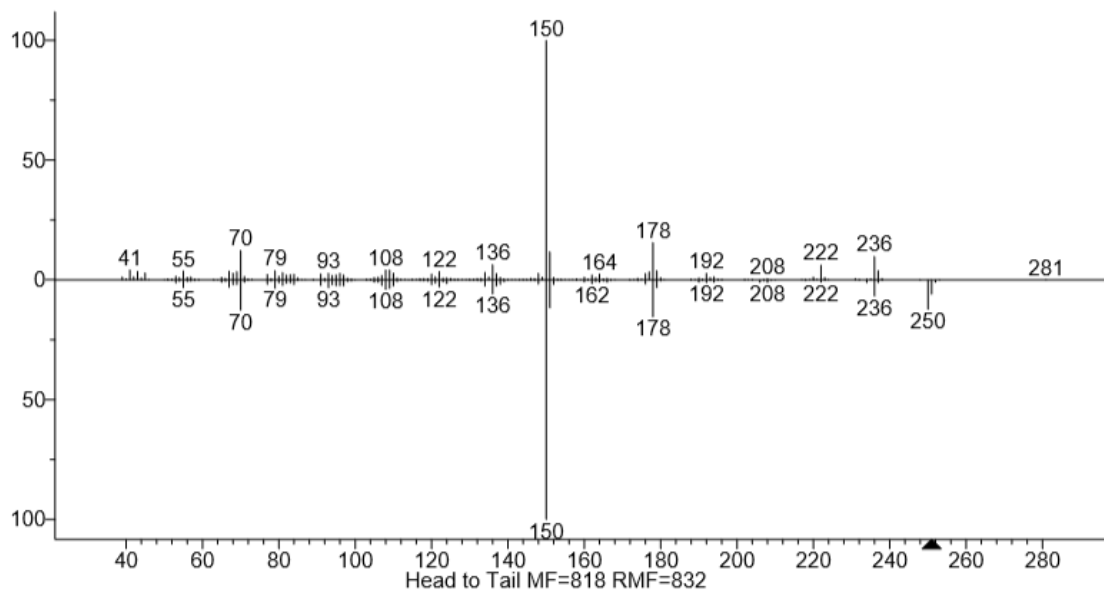
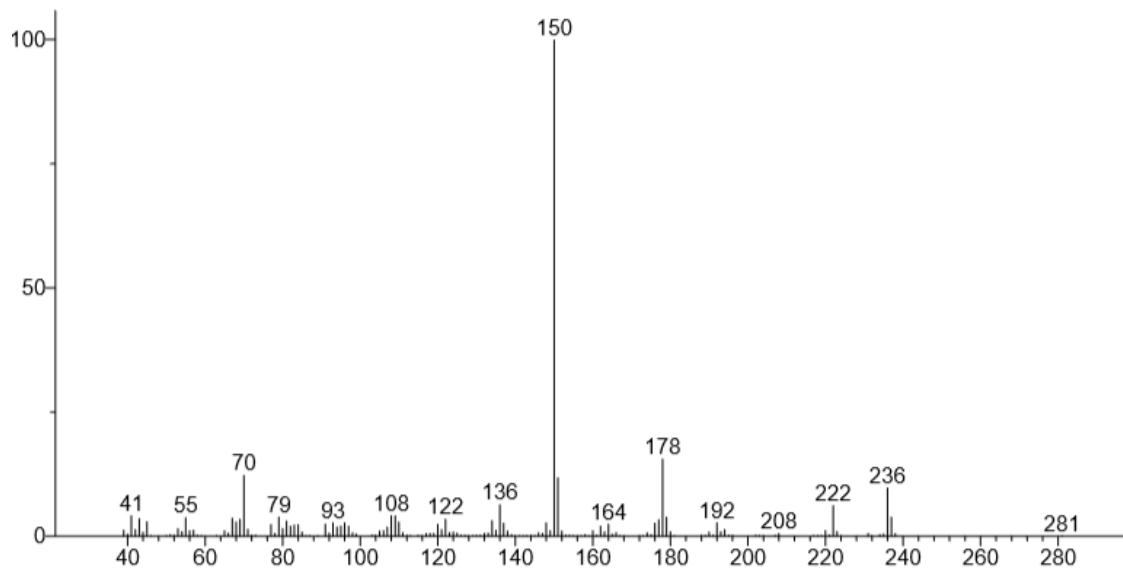
Anexo 41. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 25.507 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A4).



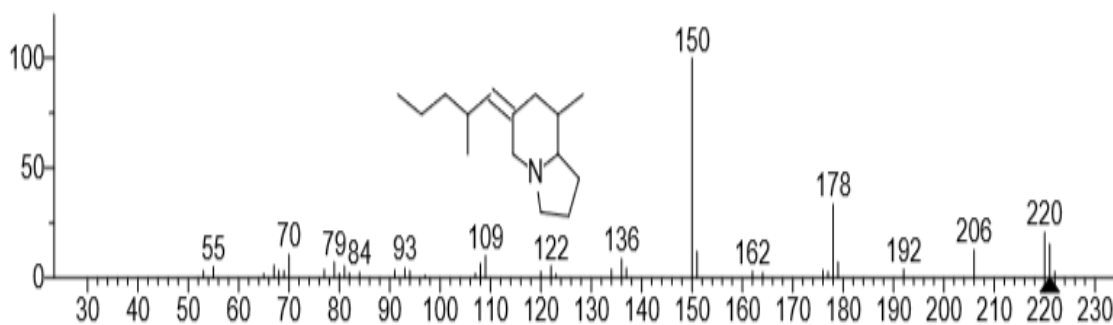
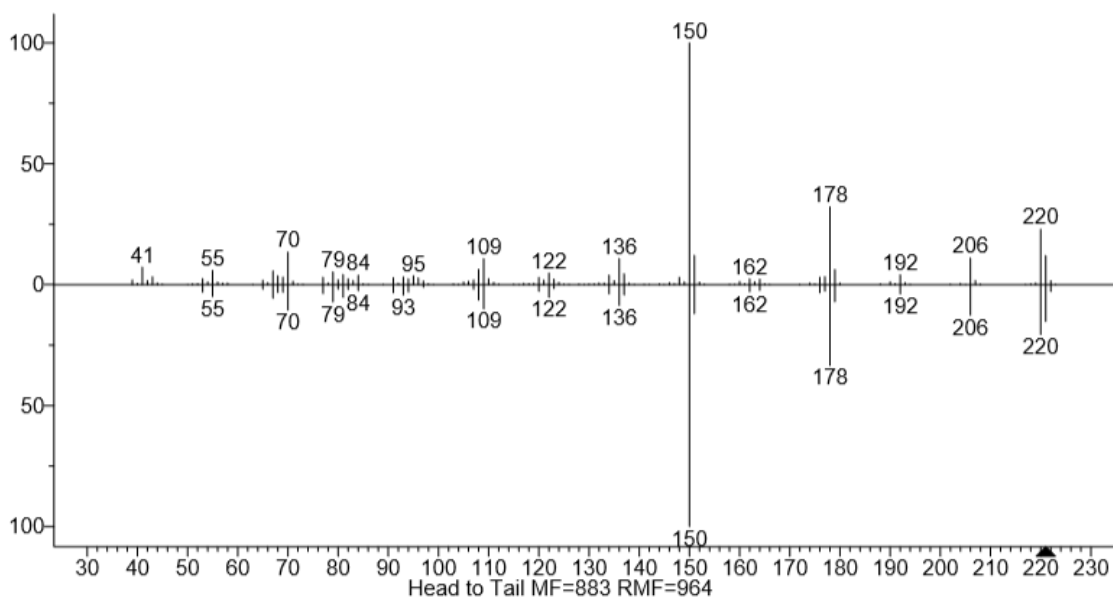
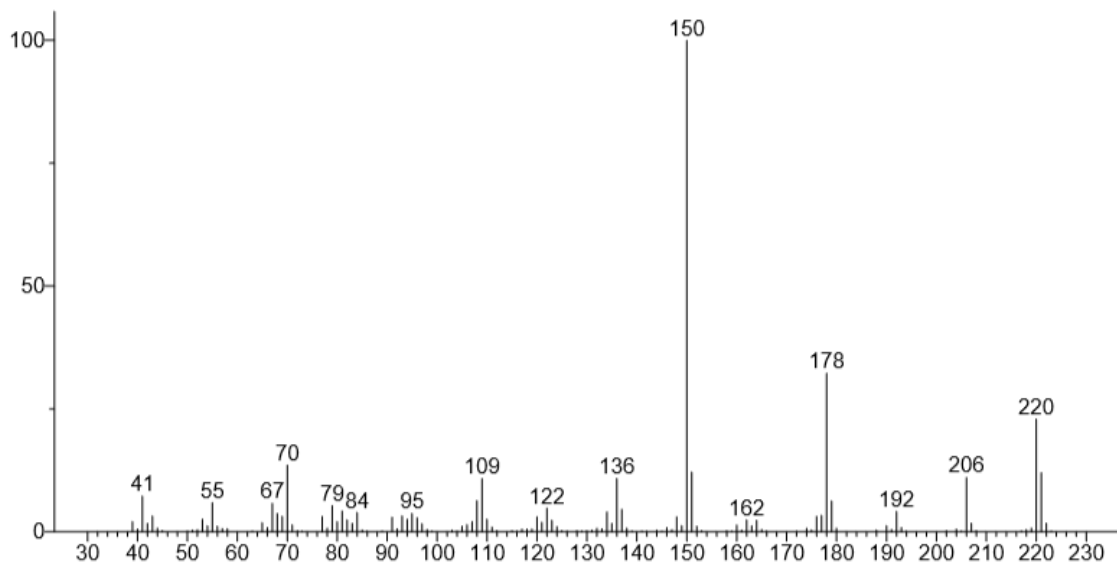
Anexo 42. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 27.290 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A4).



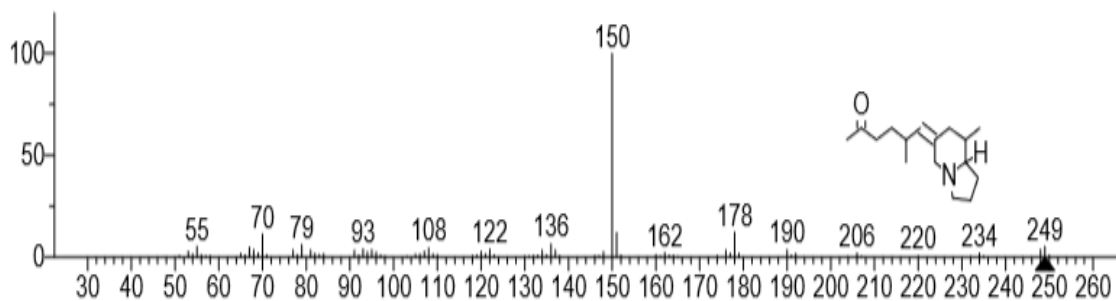
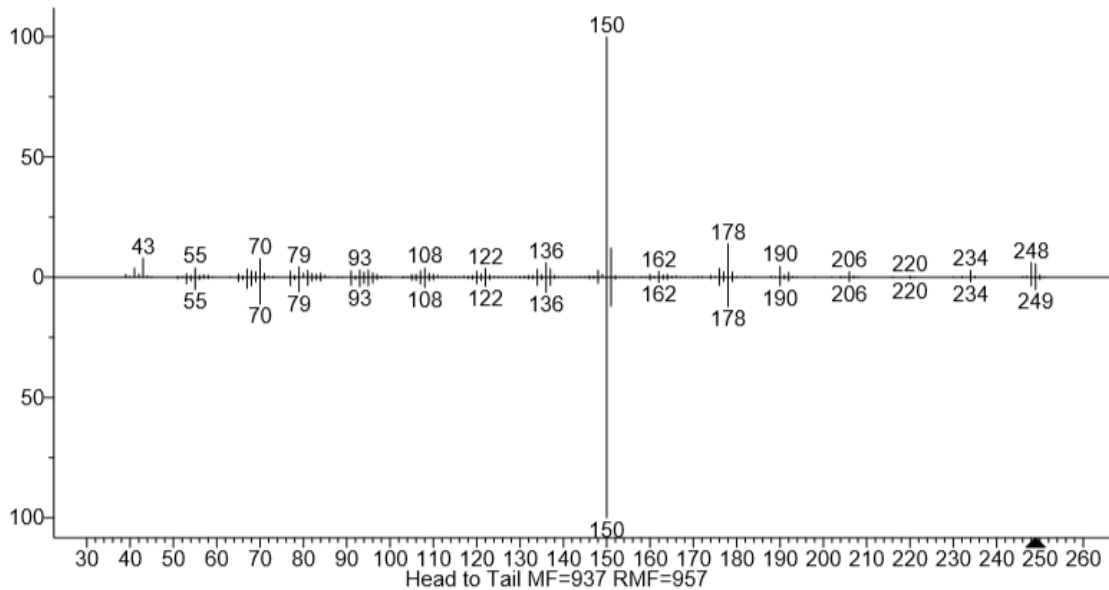
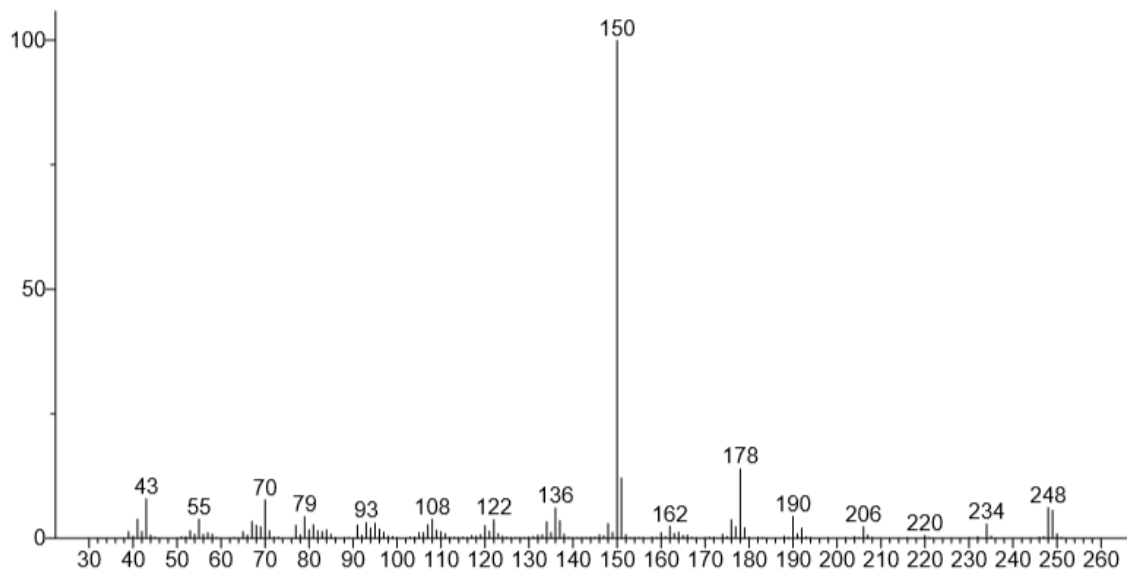
Anexo 43. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 28.948 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A4).



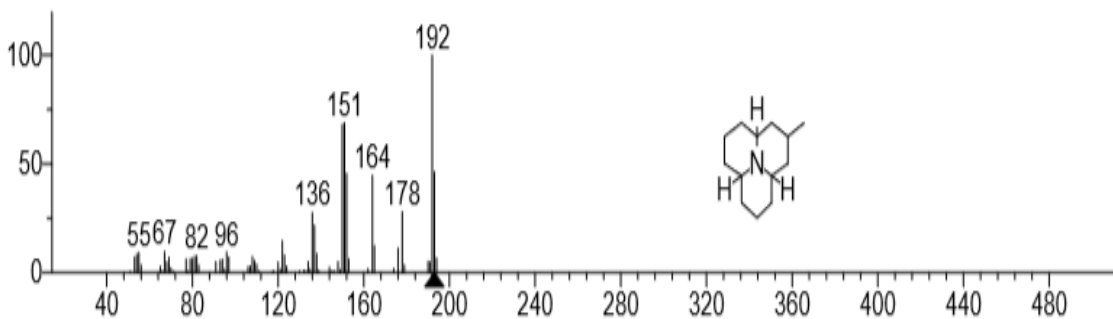
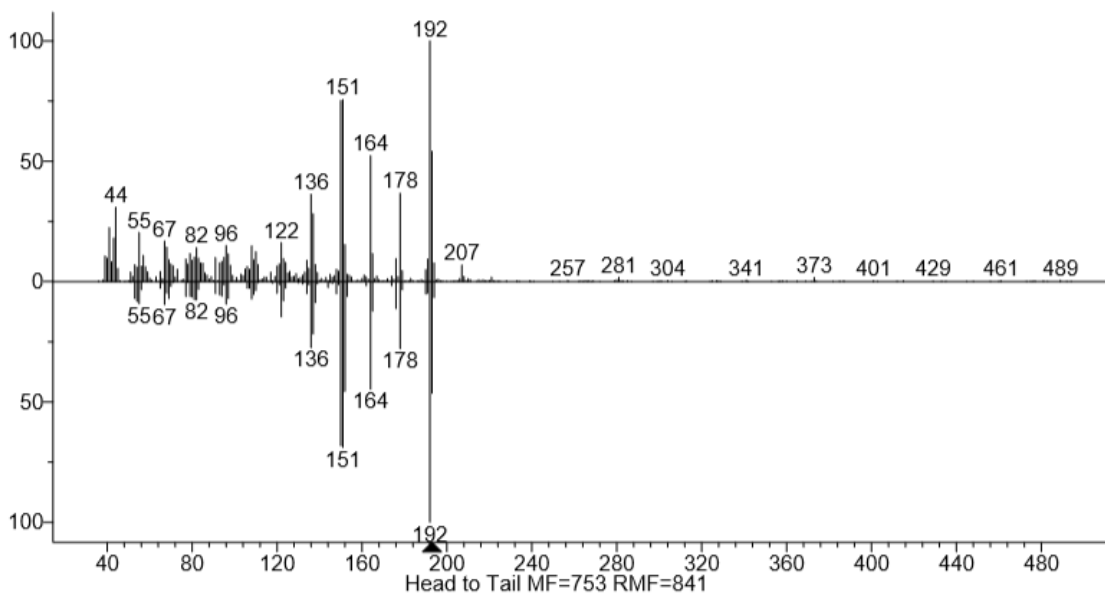
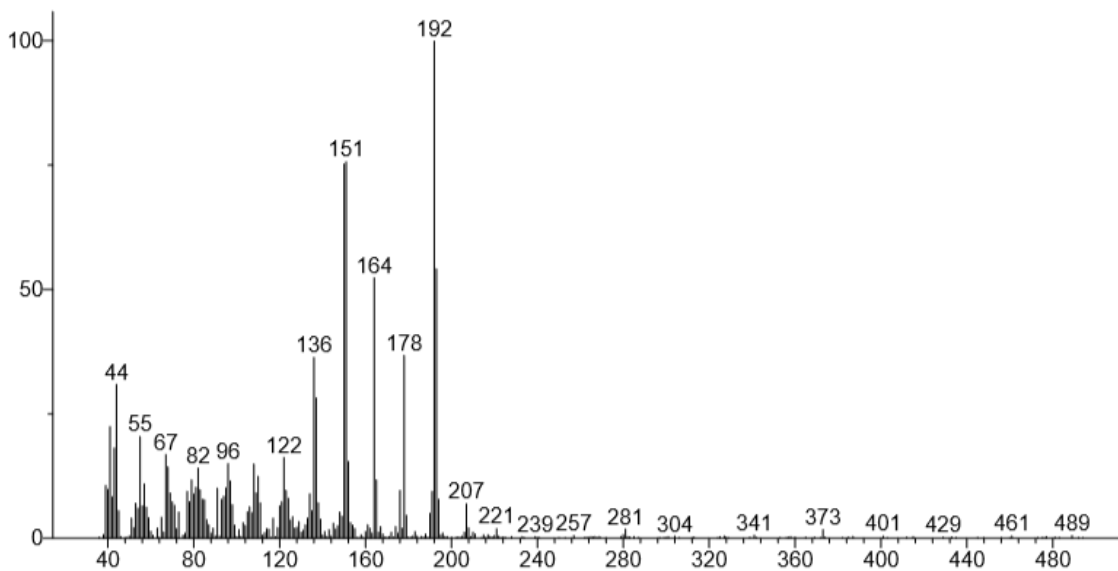
Anexo 44. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 26.585 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A4).



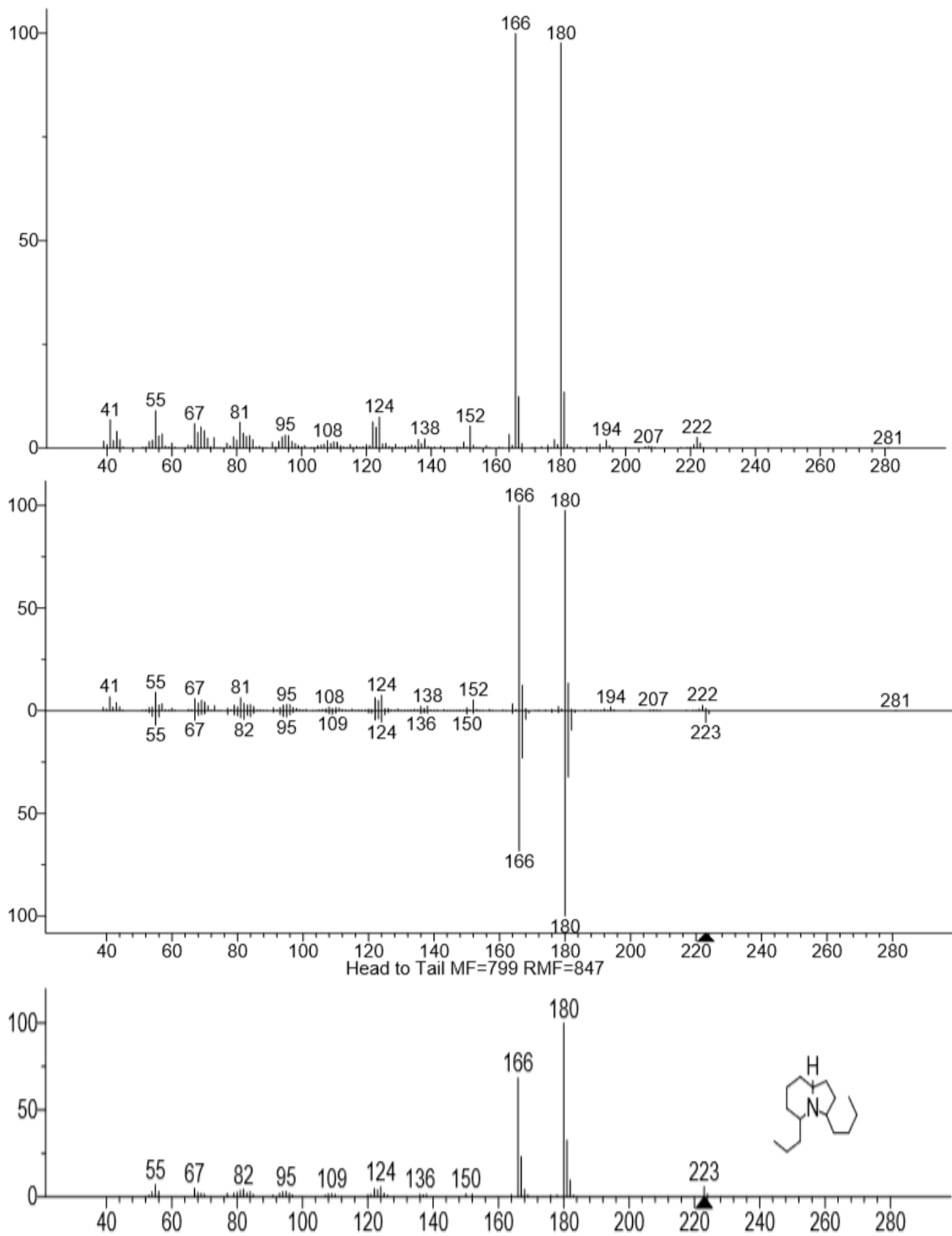
Anexo 45. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 22.264 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A4).



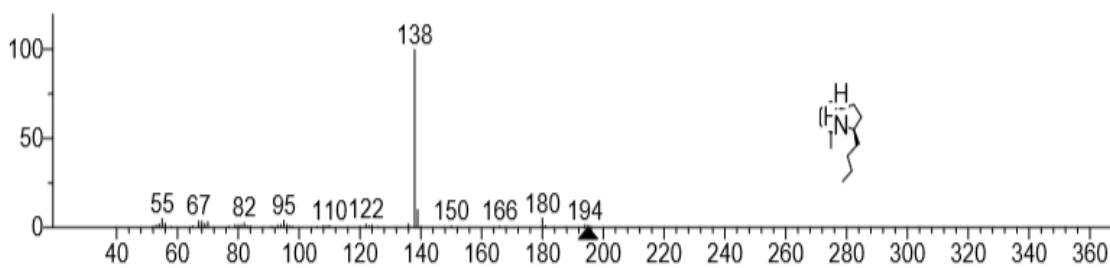
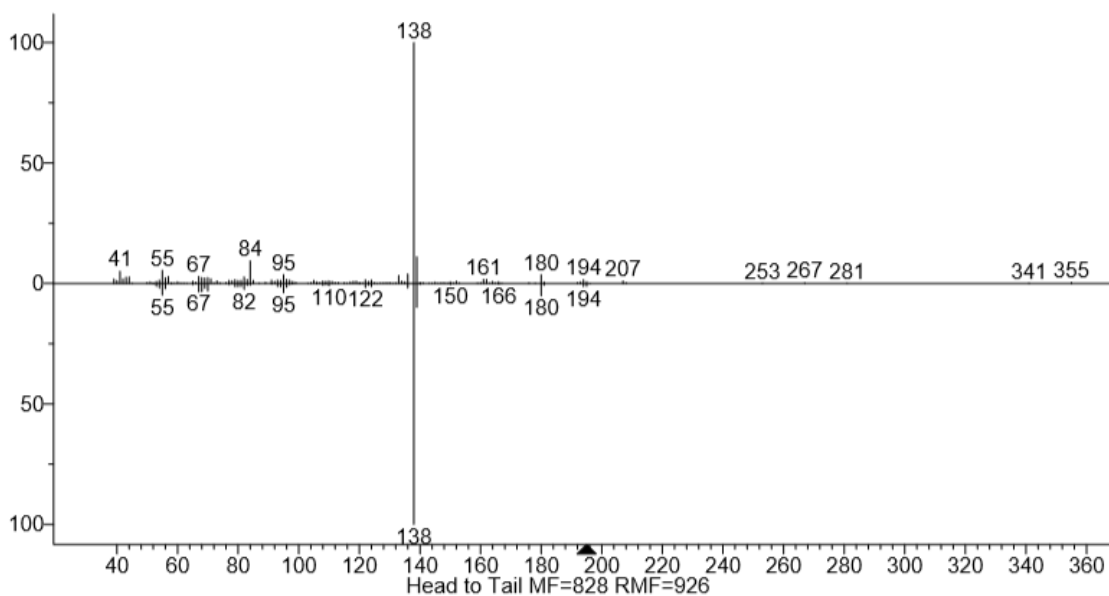
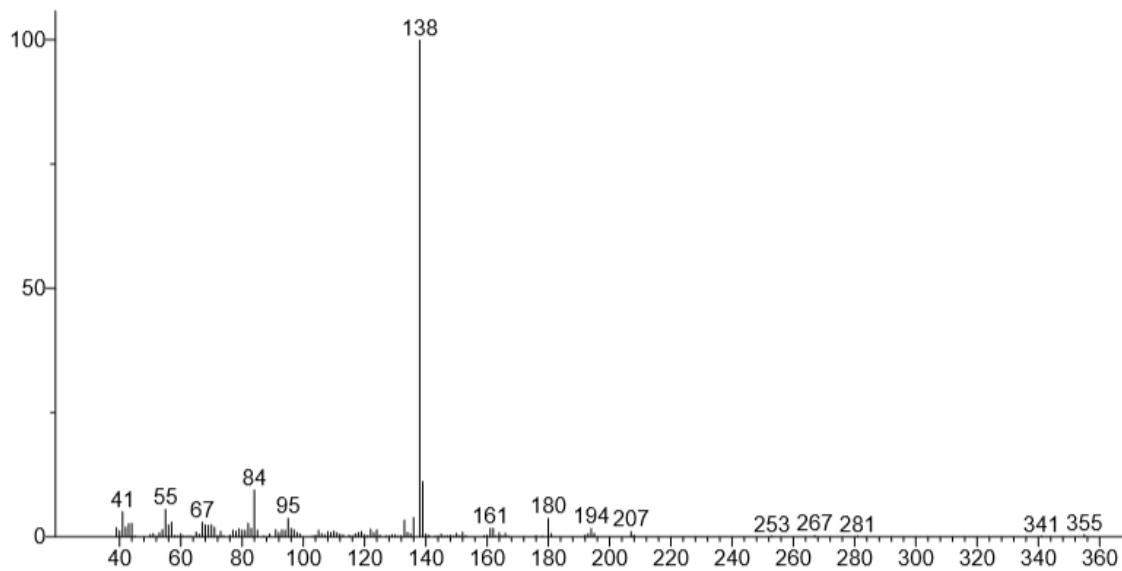
Anexo 46. Espectro de masas de Deoxypumiliotoxina (251H), con un tiempo de retención de 28.699 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A4).



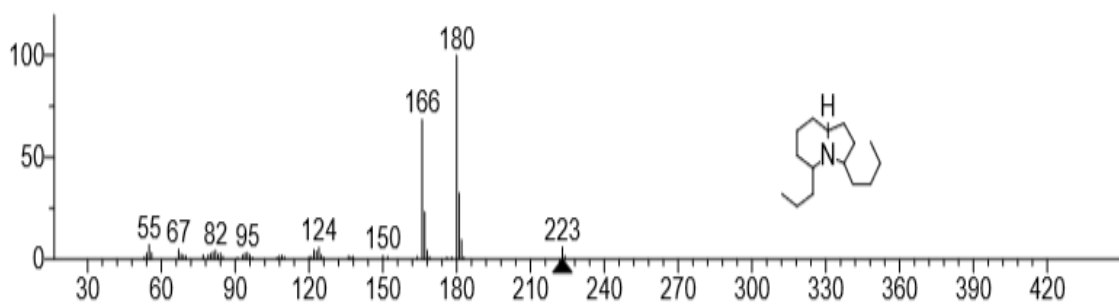
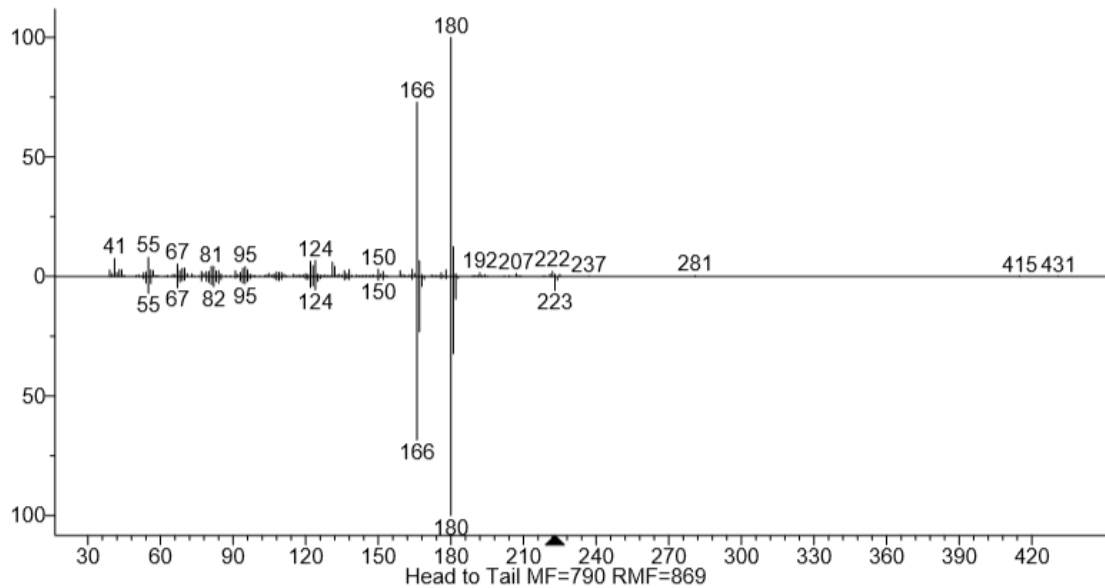
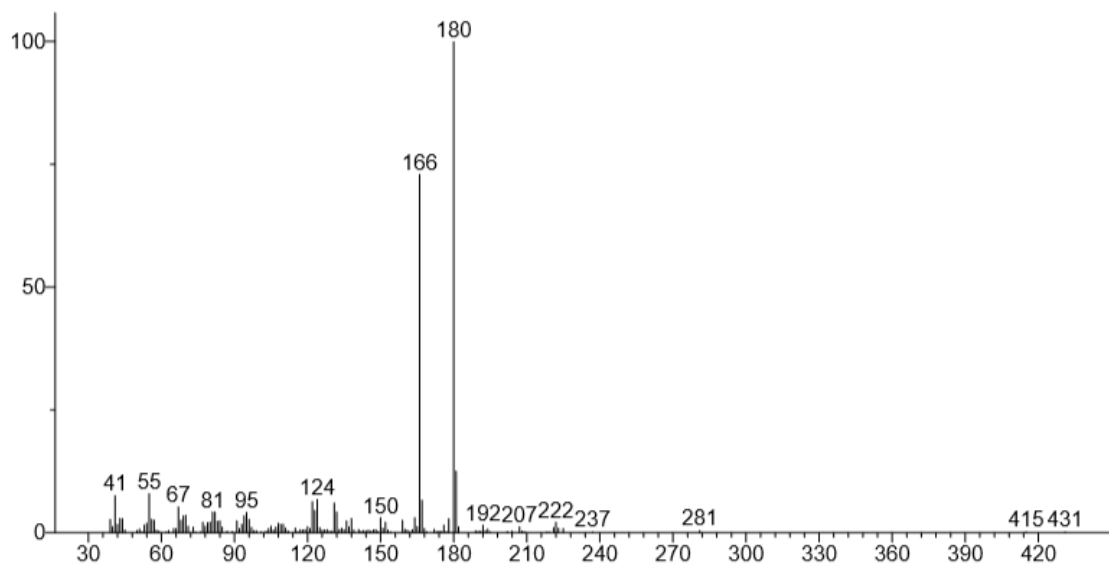
Anexo 47. Espectro de masas de Tricíclico (193C), con un tiempo de retención de 22.523 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates anthonyi* (muestra A4).



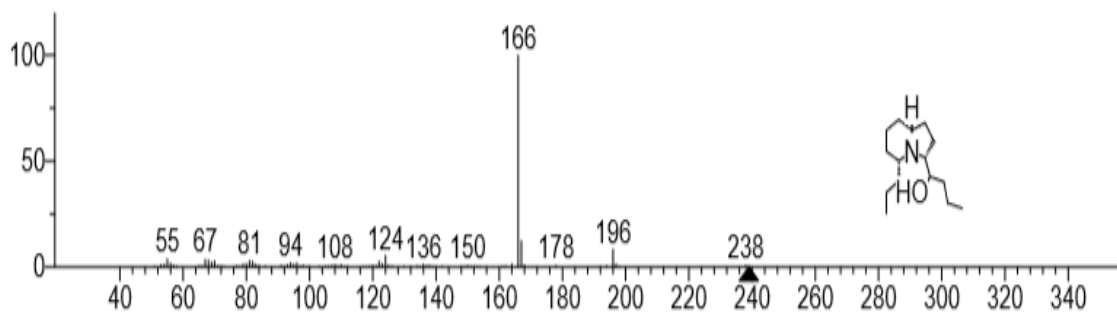
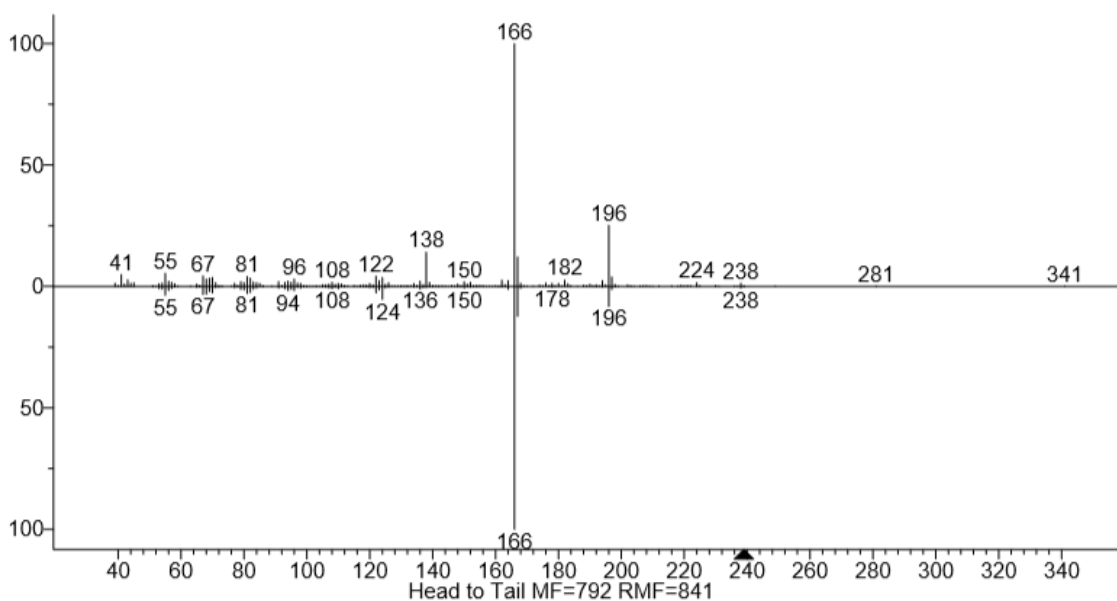
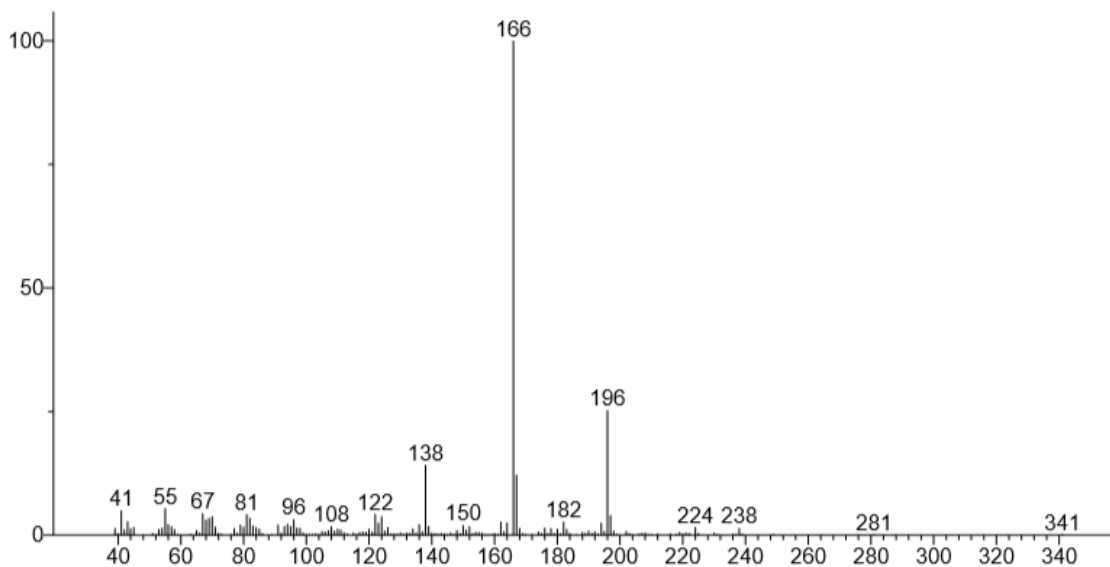
Anexo 48. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (223AB), con un tiempo de retención de 23.570 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



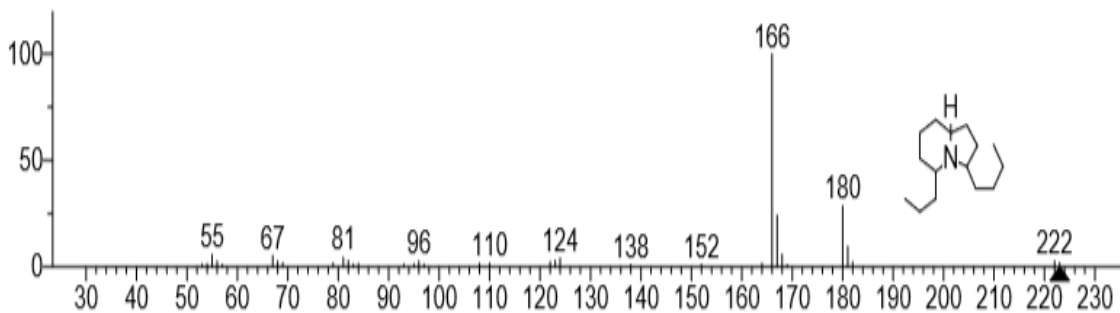
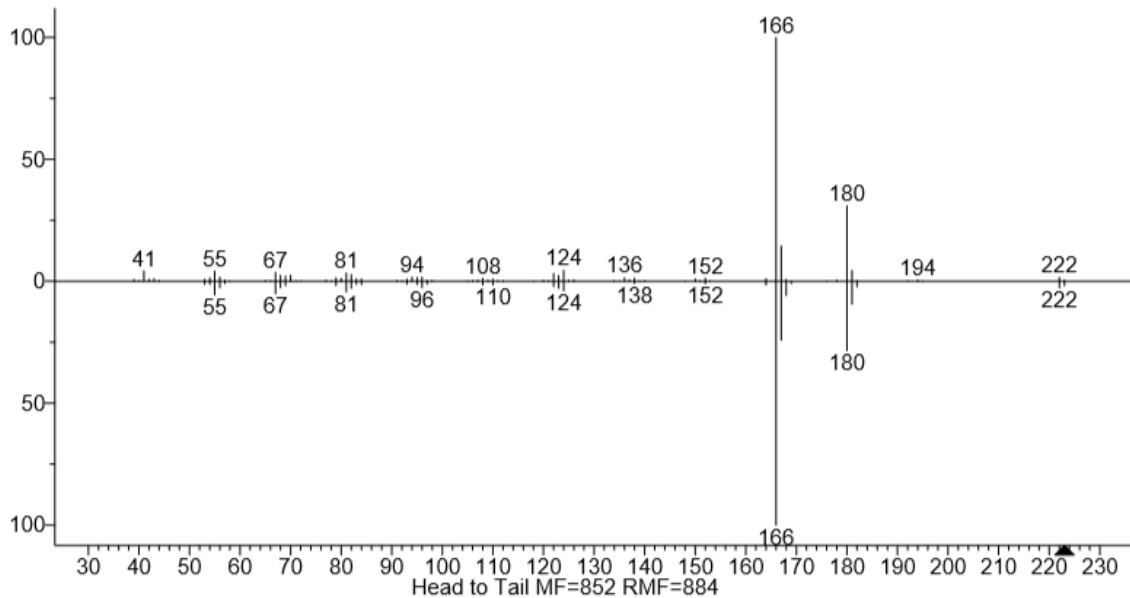
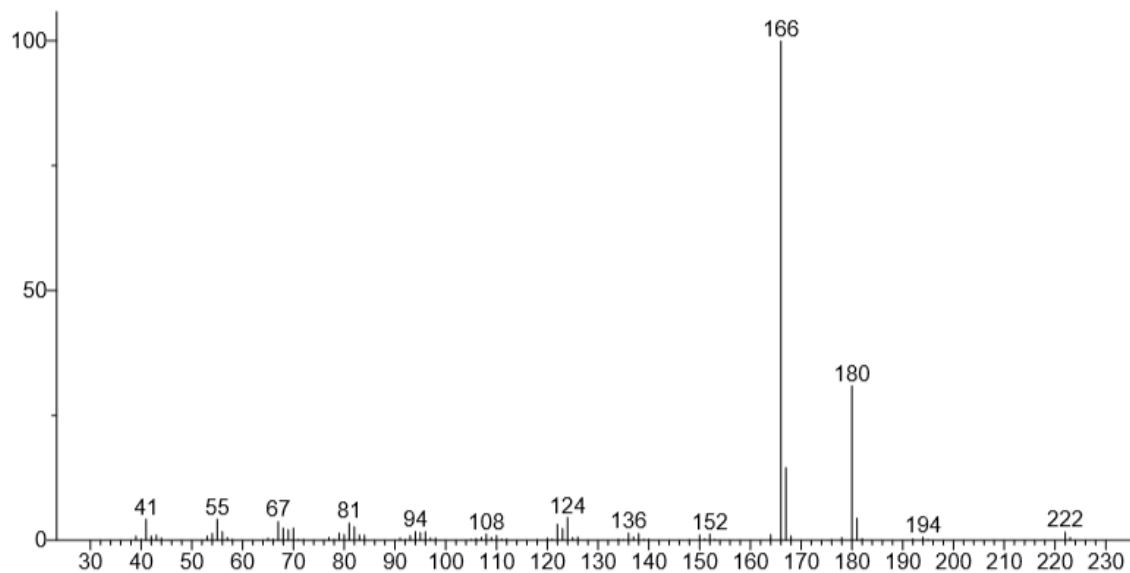
Anexo 49. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (195B), con un tiempo de retención de 18.419 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



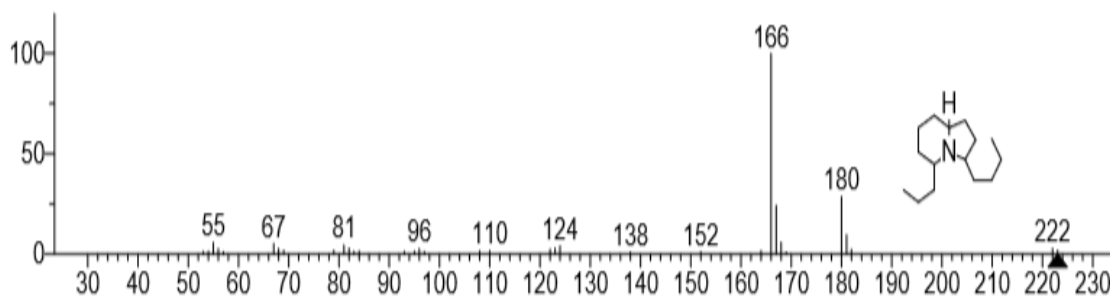
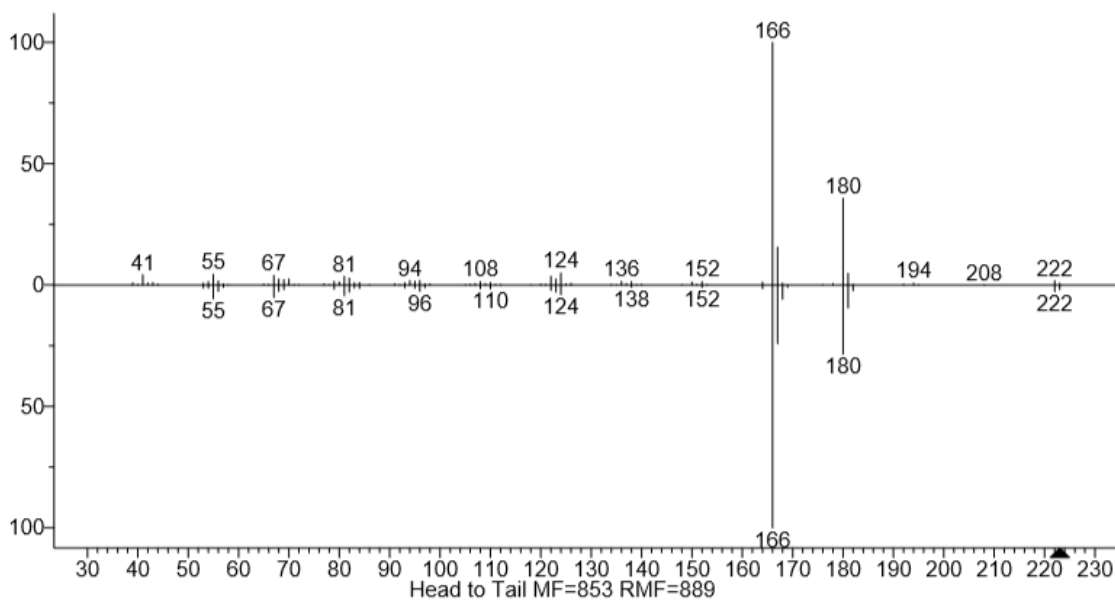
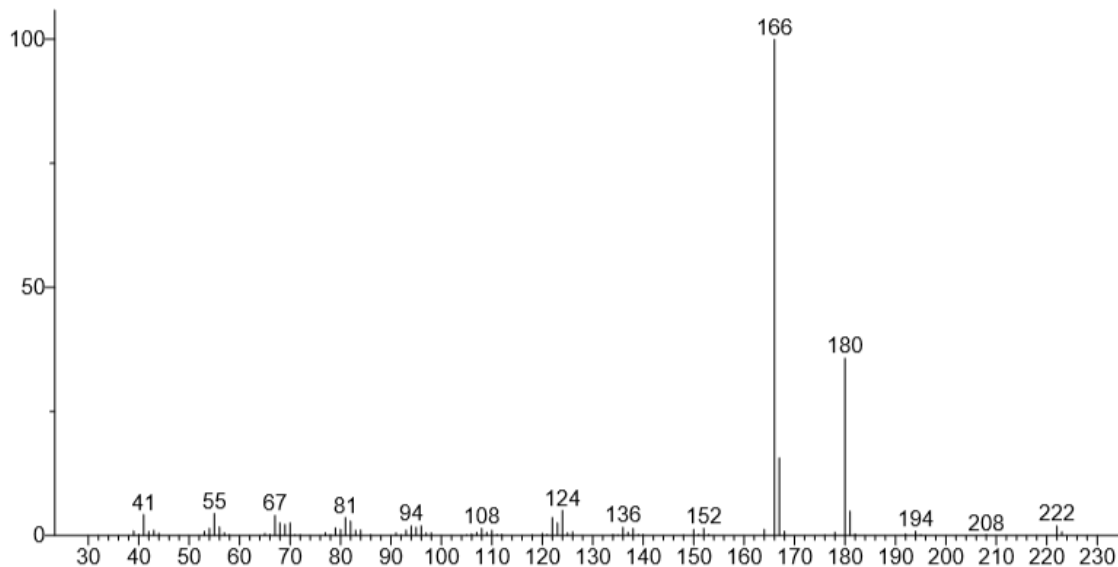
Anexo 50. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (223AB), con un tiempo de retención de 23.145 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



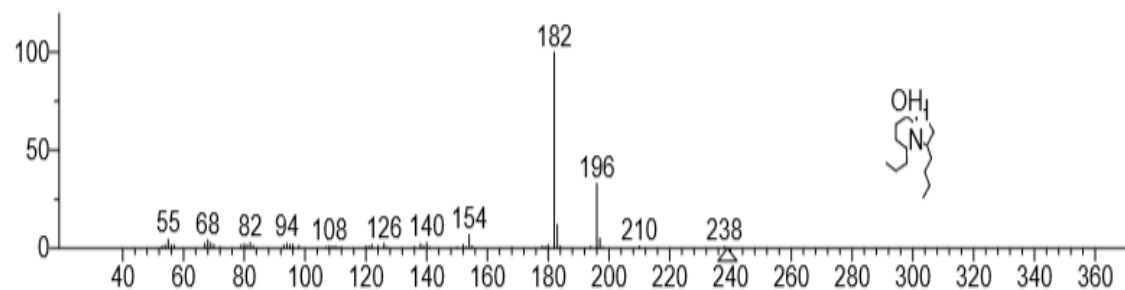
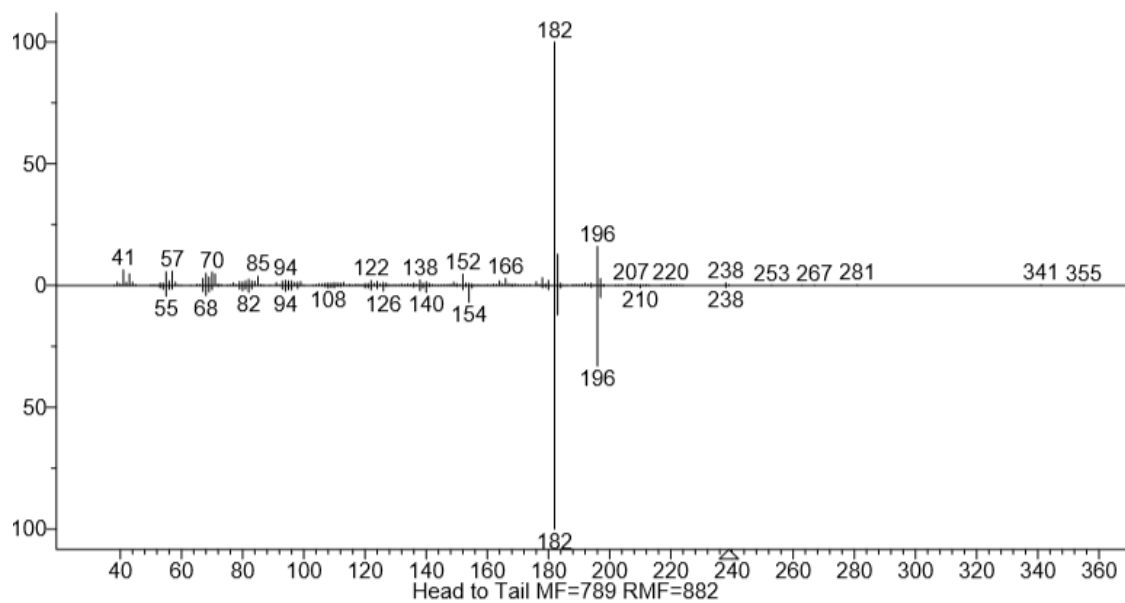
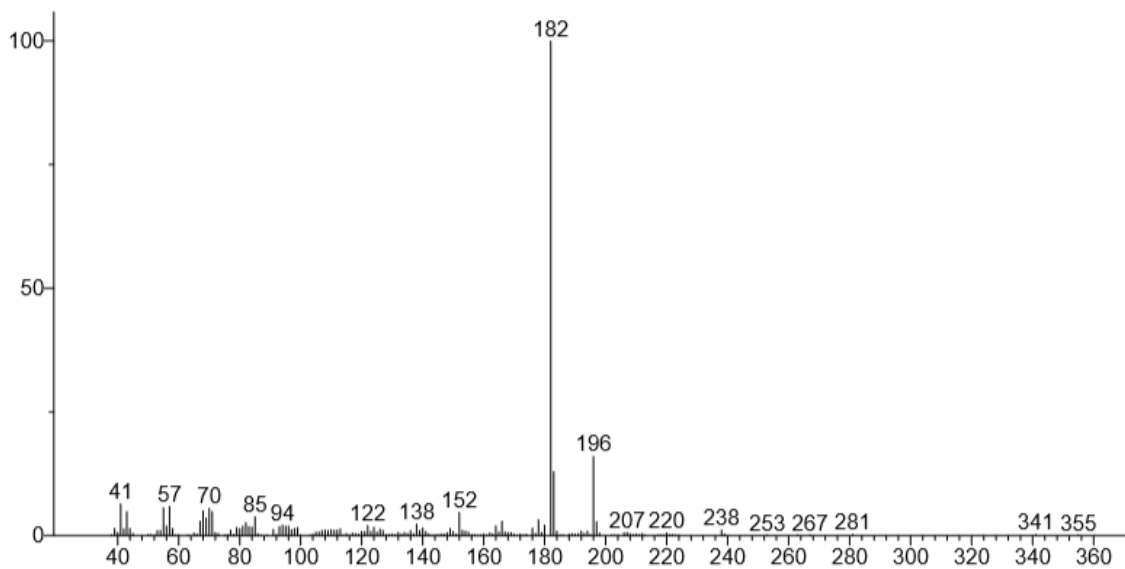
Anexo 51. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (239Q), con un tiempo de retención de 27.850 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



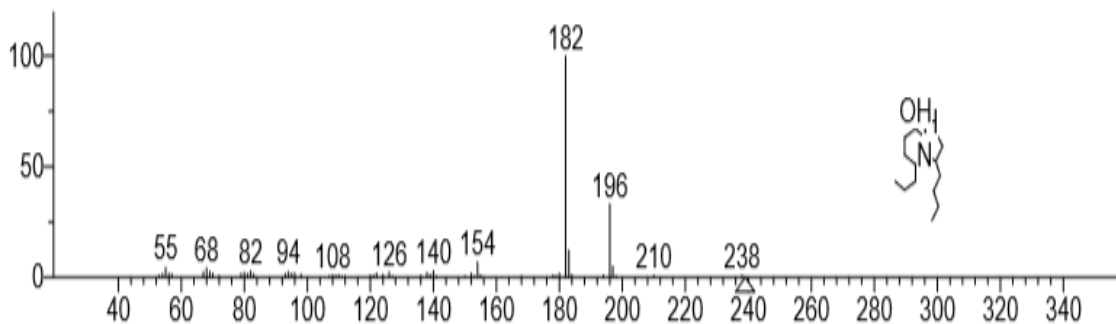
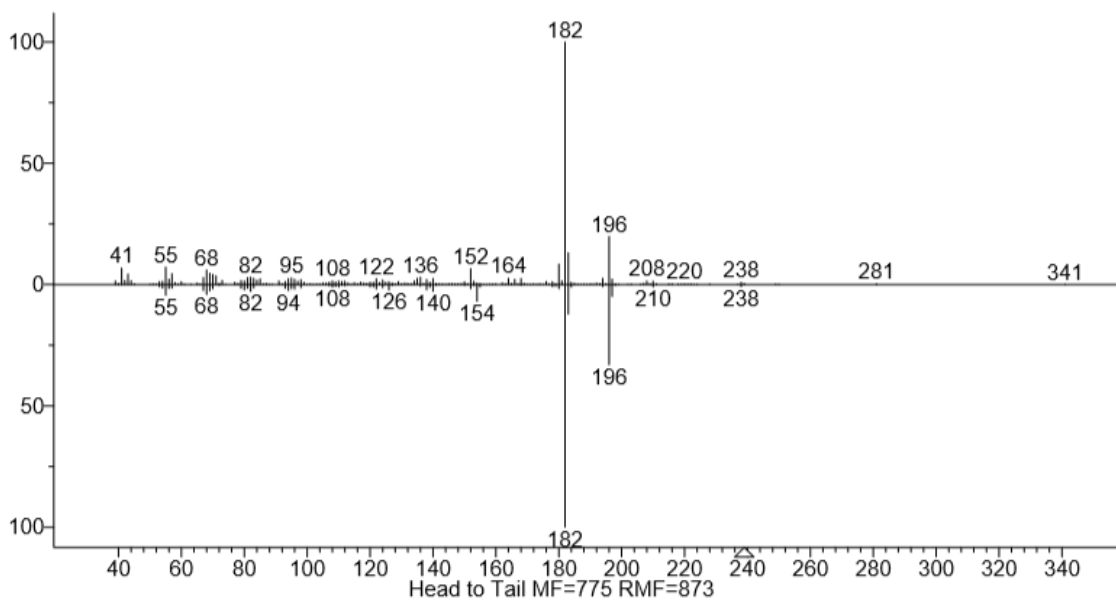
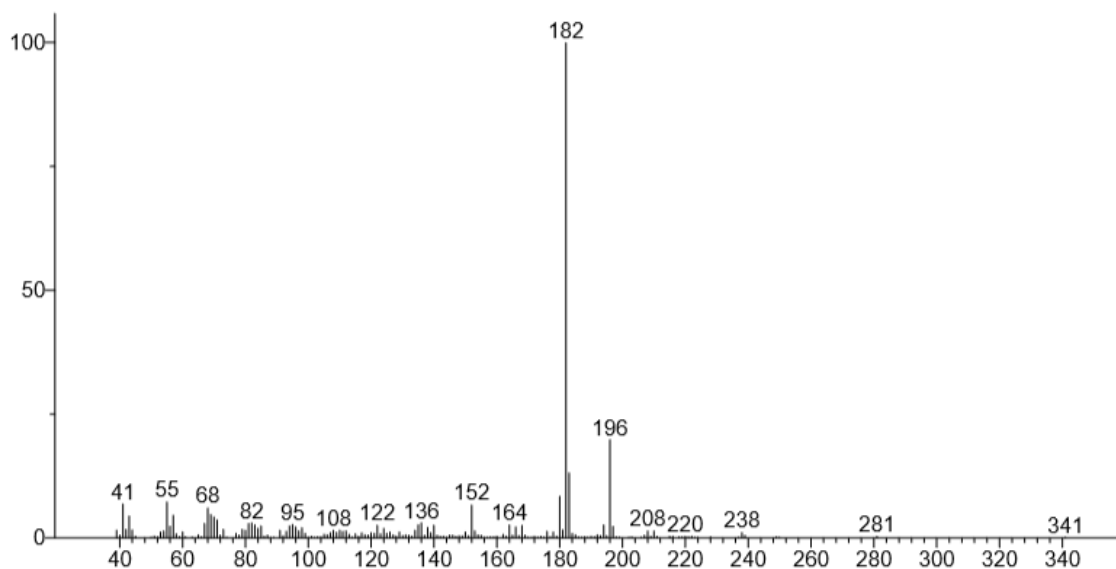
Anexo 52. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (223AB), con un tiempo de retención de 22.834 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



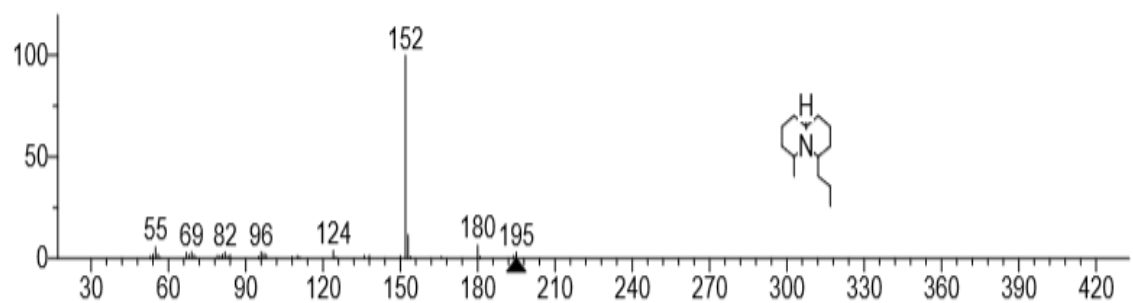
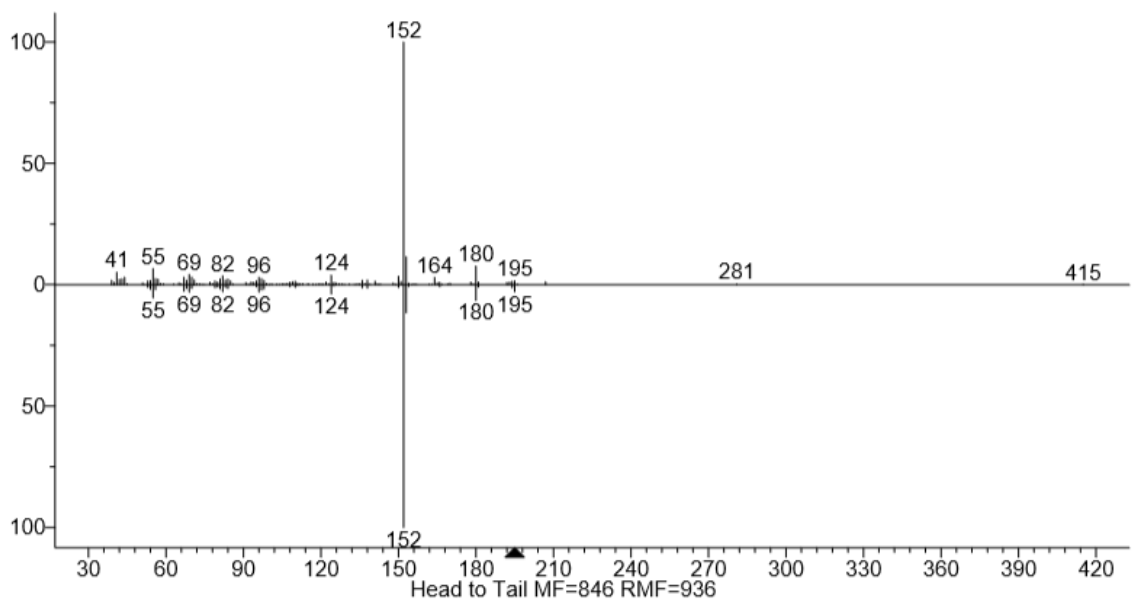
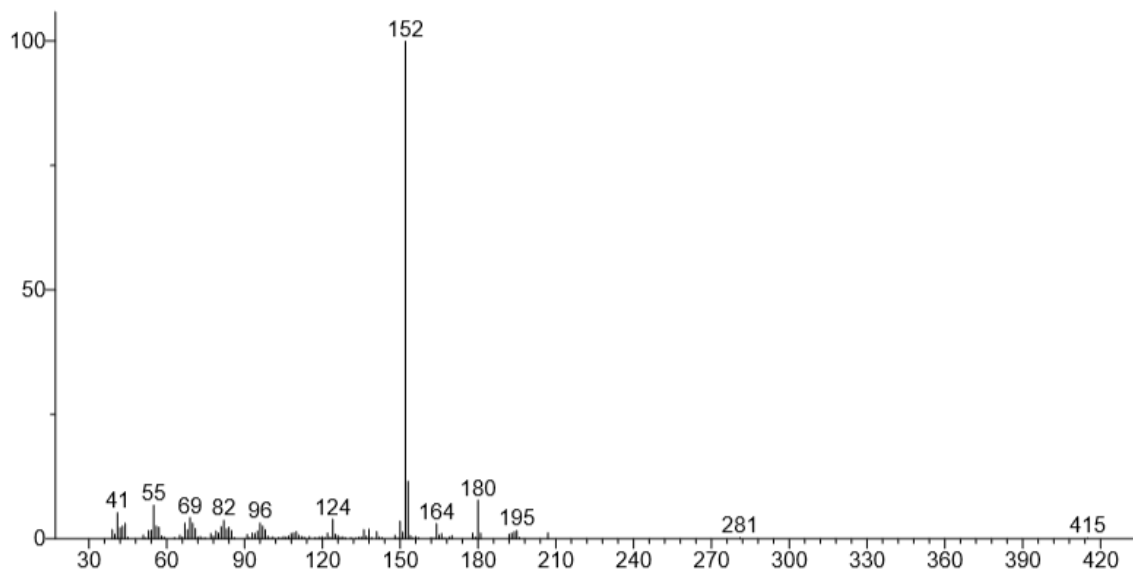
Anexo 53. Espectro de masas de 3,5-Indolizidina (223AB), con un tiempo de retención de 22.855 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



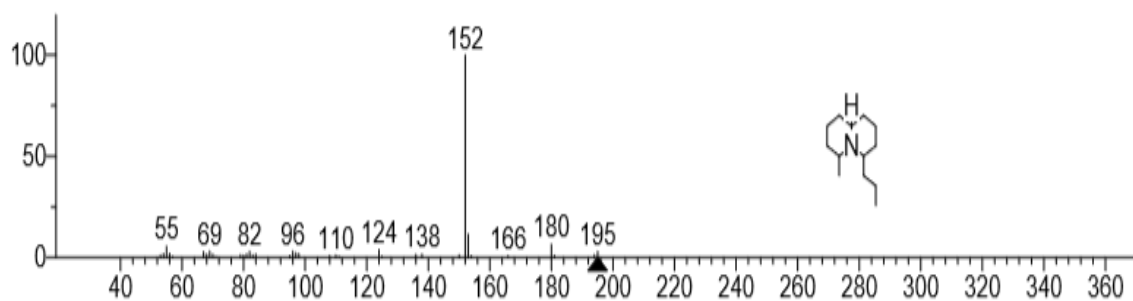
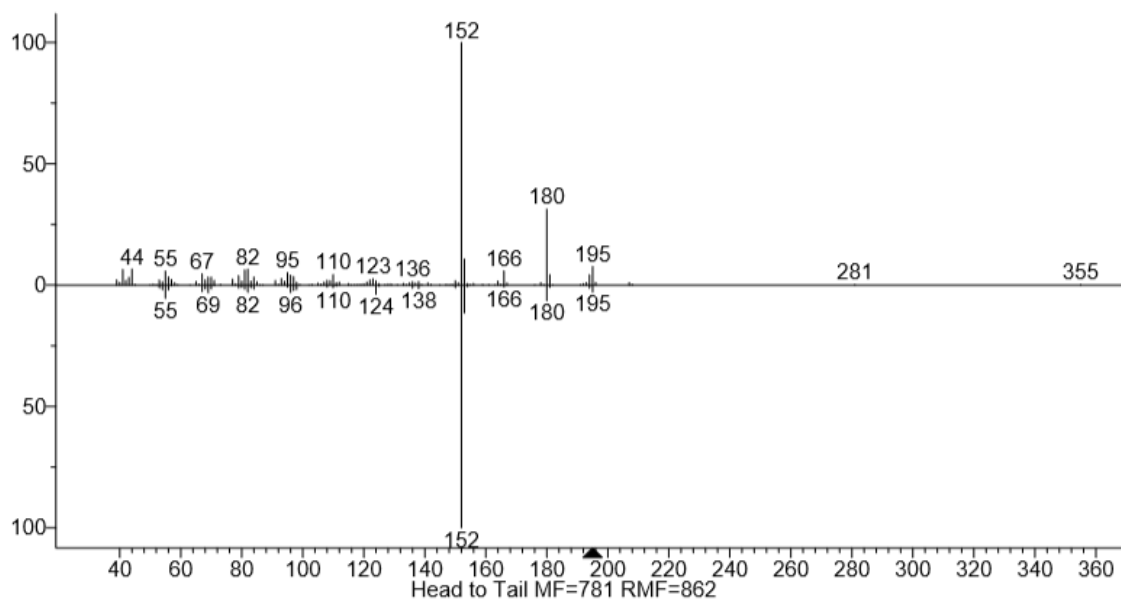
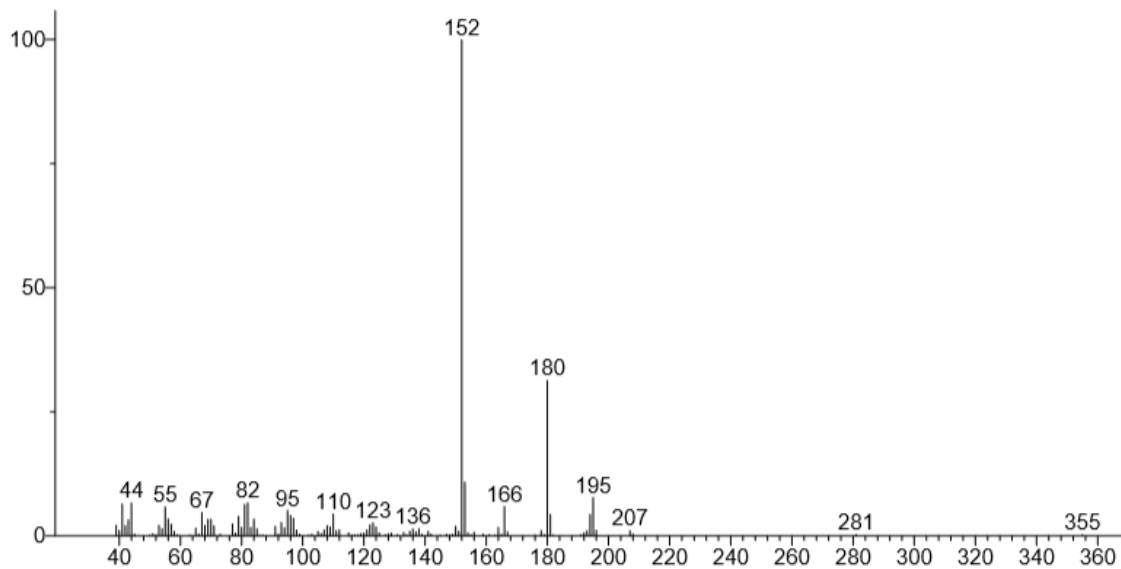
Anexo 54. Espectro de masas de 3,5,8-Indolizidina (239), con un tiempo de retención de 28.192 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



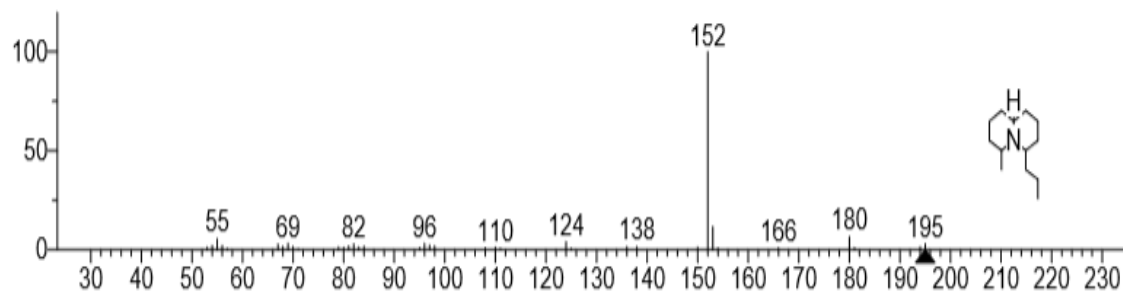
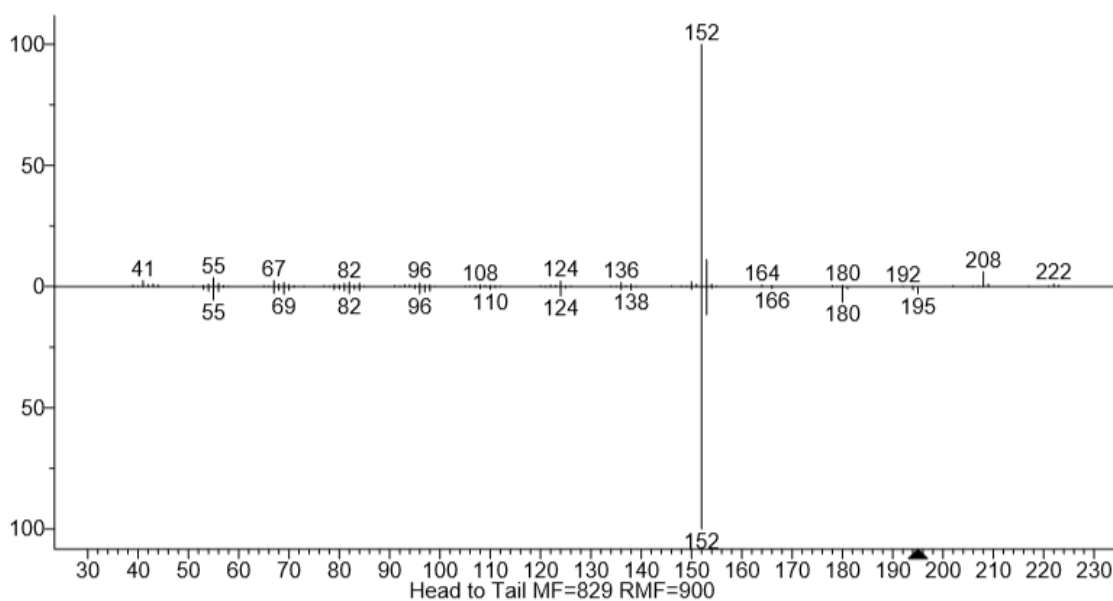
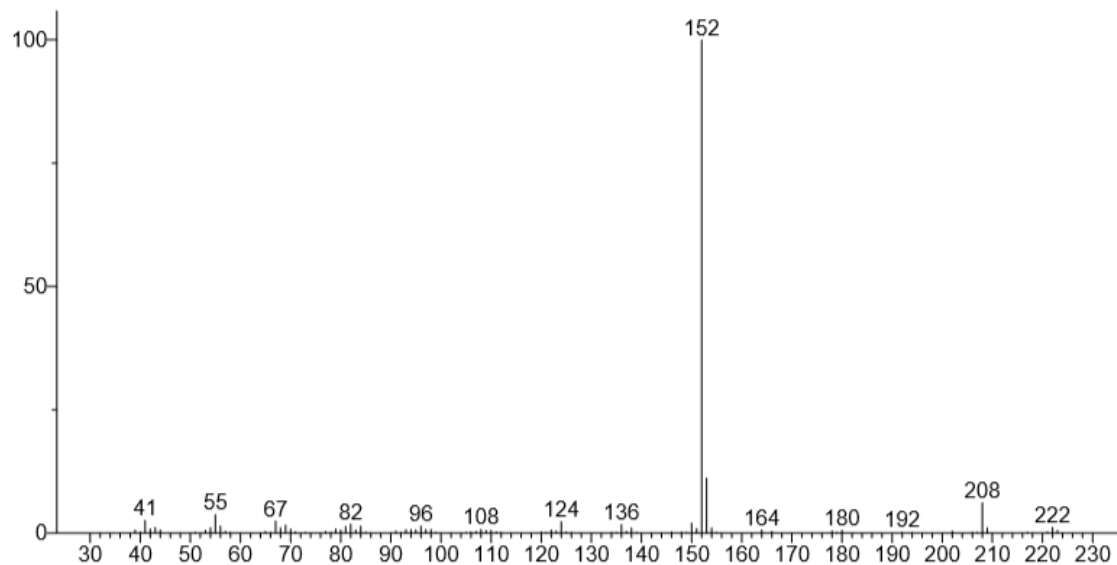
Anexo 55. Espectro de masas de 3,5,8-Indolizidina (239), con un tiempo de retención de 28.461 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



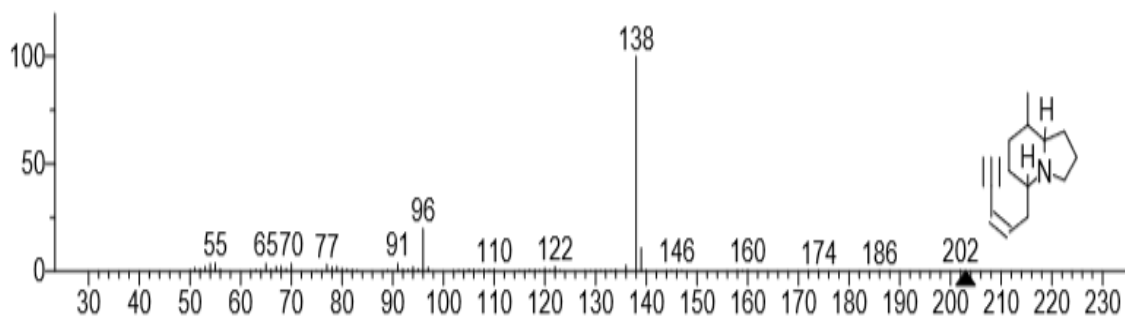
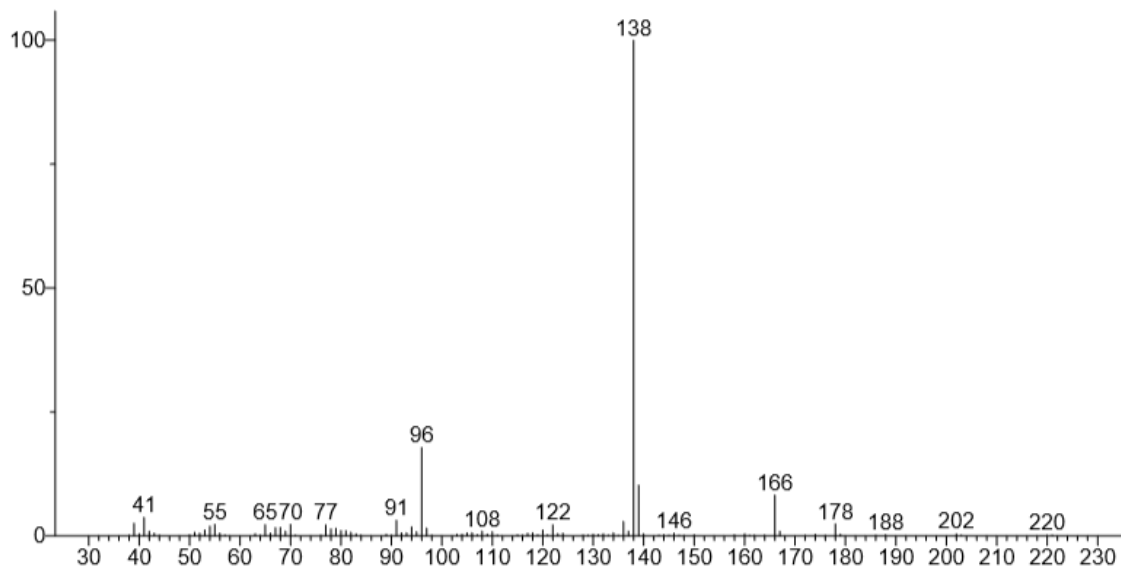
Anexo 56. Espectro de masas de 4,6-Quinolizidina (195C), con un tiempo de retención de 19.891 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



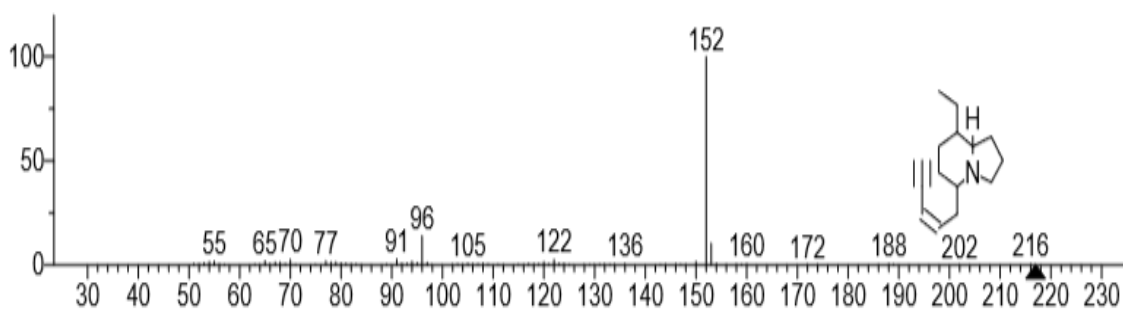
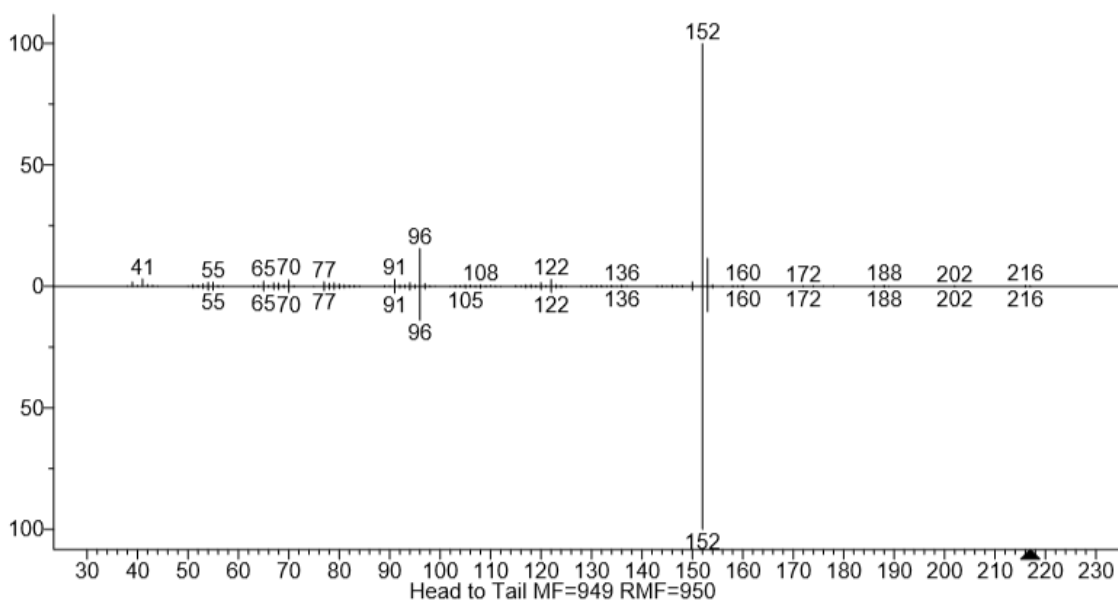
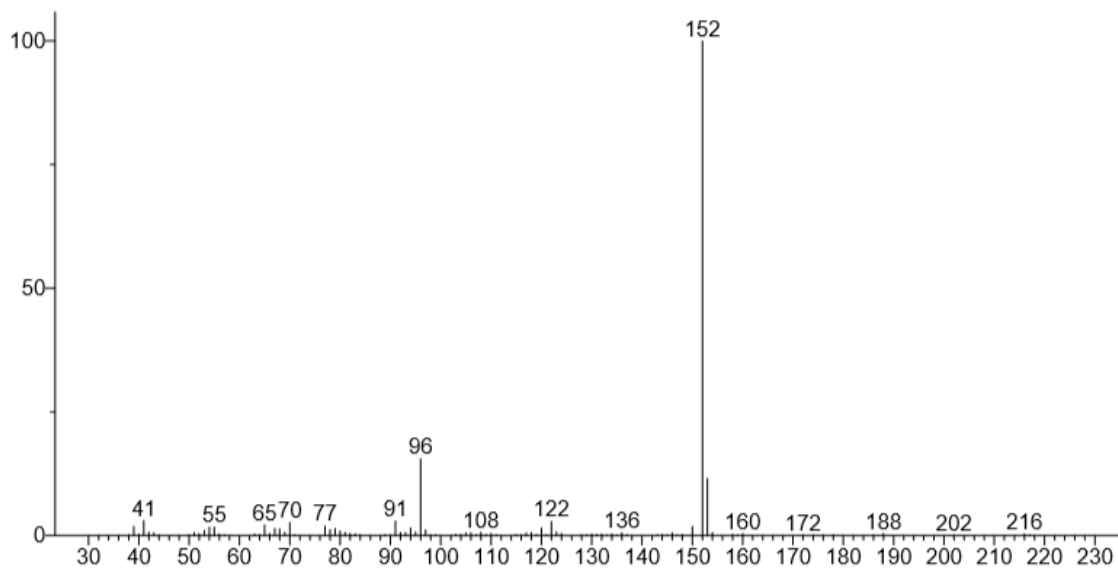
Anexo 57. Espectro de masas de 4,6-Quinolizidina (195C), con un tiempo de retención de 20.595 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



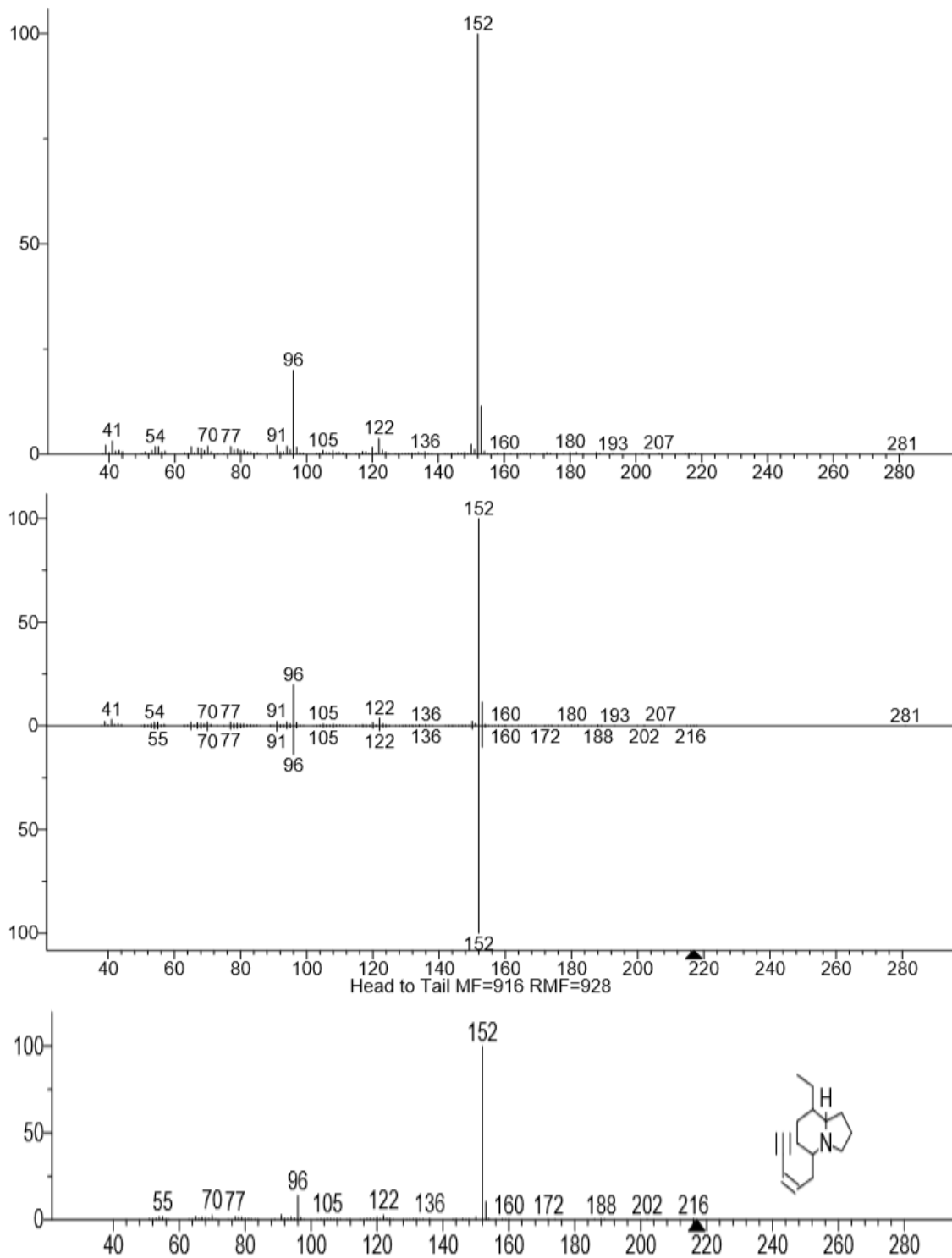
Anexo 58. Espectro de masas de 4,6-Quinolizidina (195C), con un tiempo de retención de 25.093 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



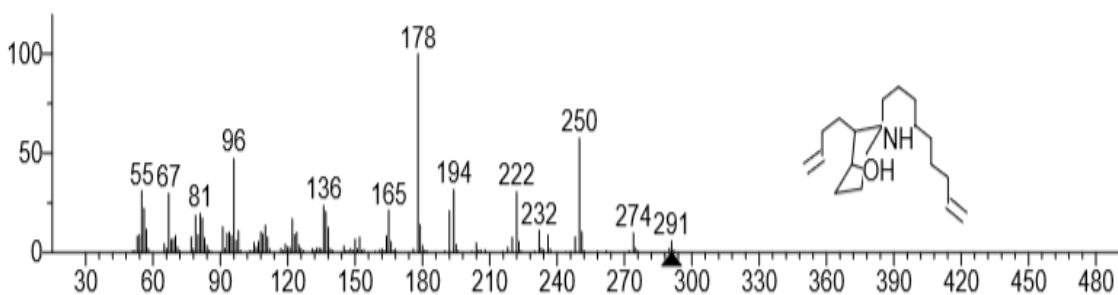
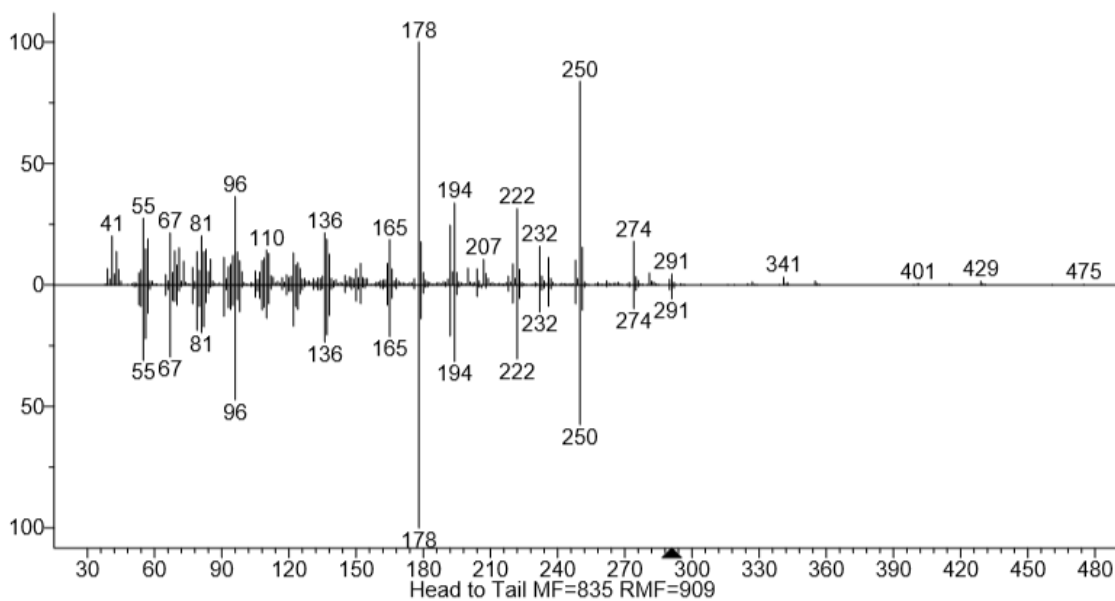
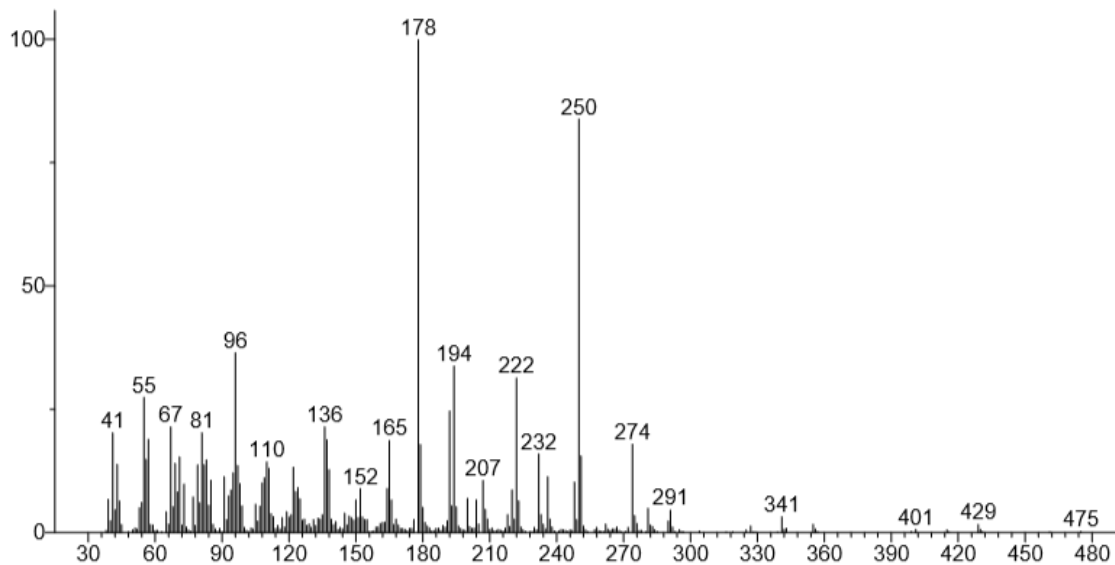
Anexo 59. Espectro de masas de 5,8-Indolizidina (203A), con un tiempo de retención de 22.751 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



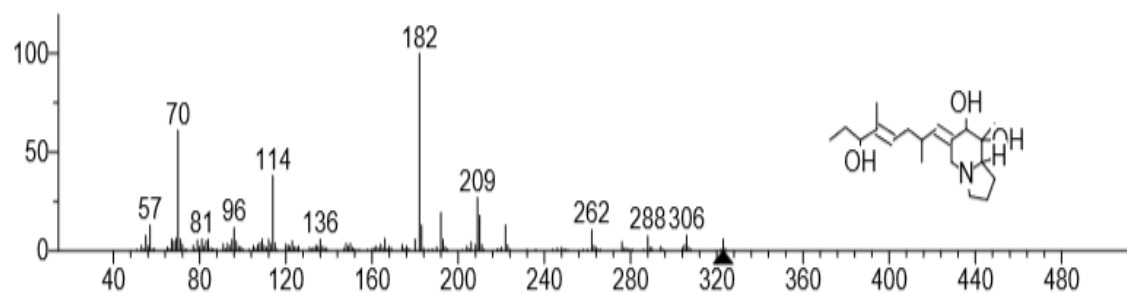
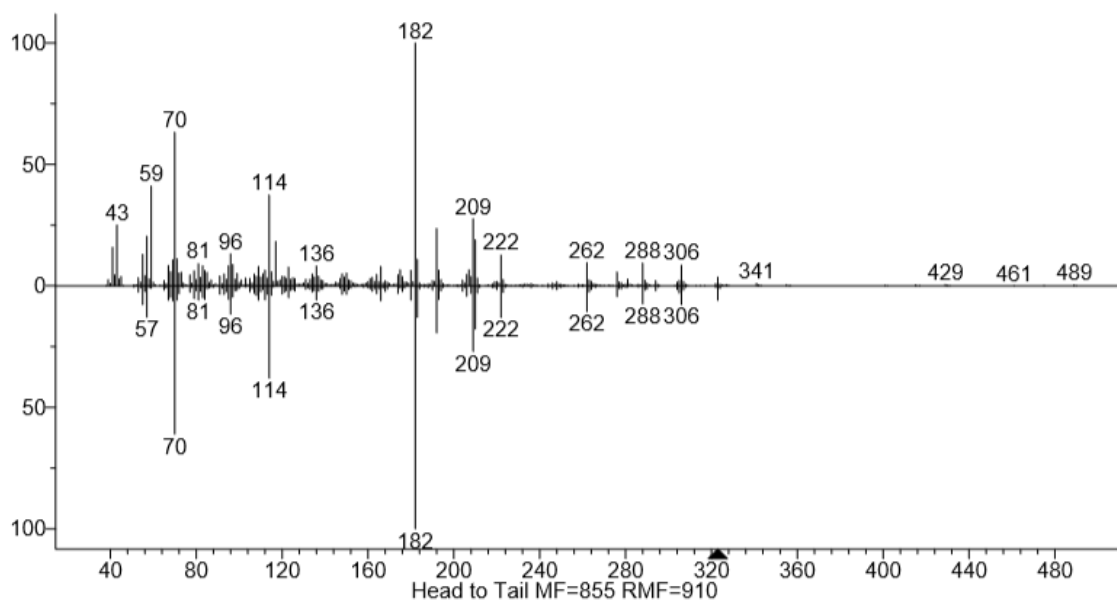
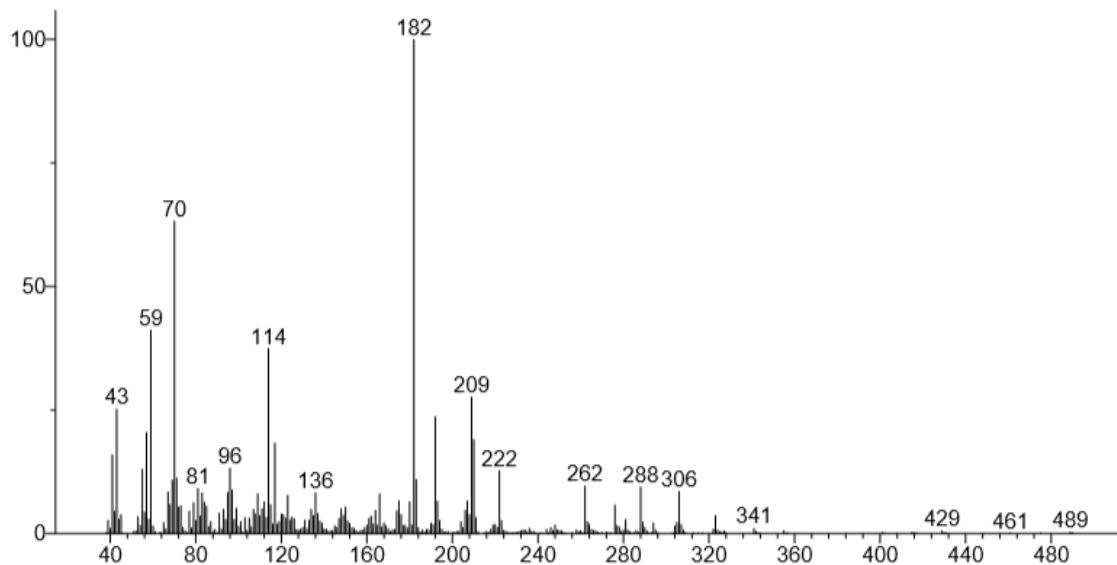
Anexo 60. Espectro de masas de 5,8-Indolizidina (217B), con un tiempo de retención de 25.632 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



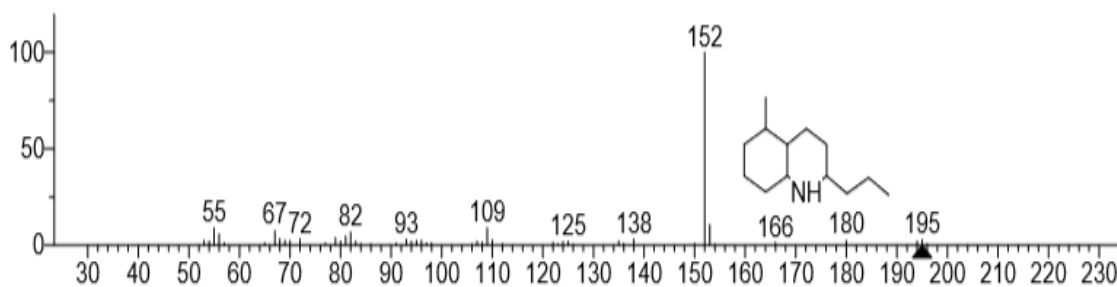
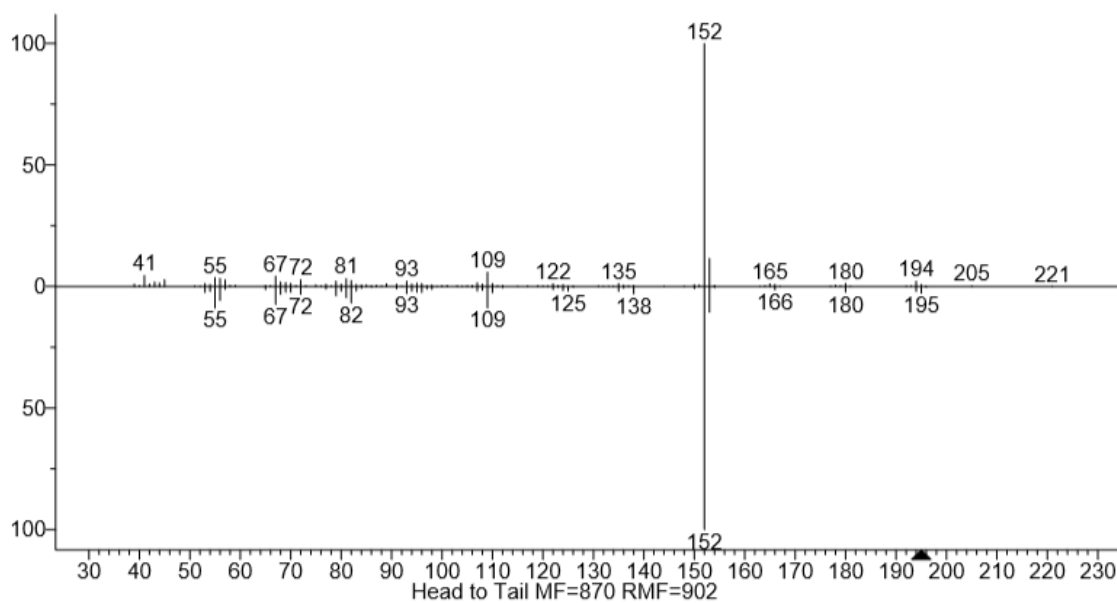
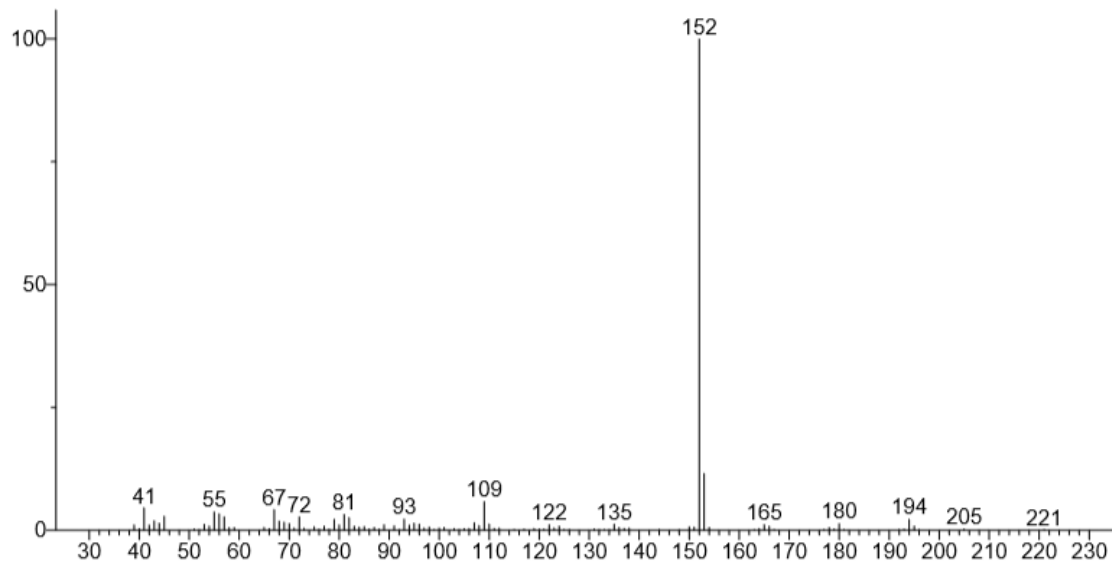
Anexo 61. Espectro de masas de 5,8-Indolizidina (217B), con un tiempo de retención de 25.891 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



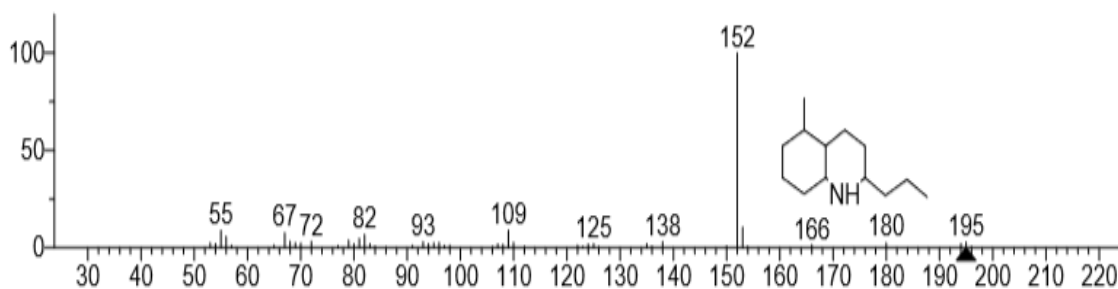
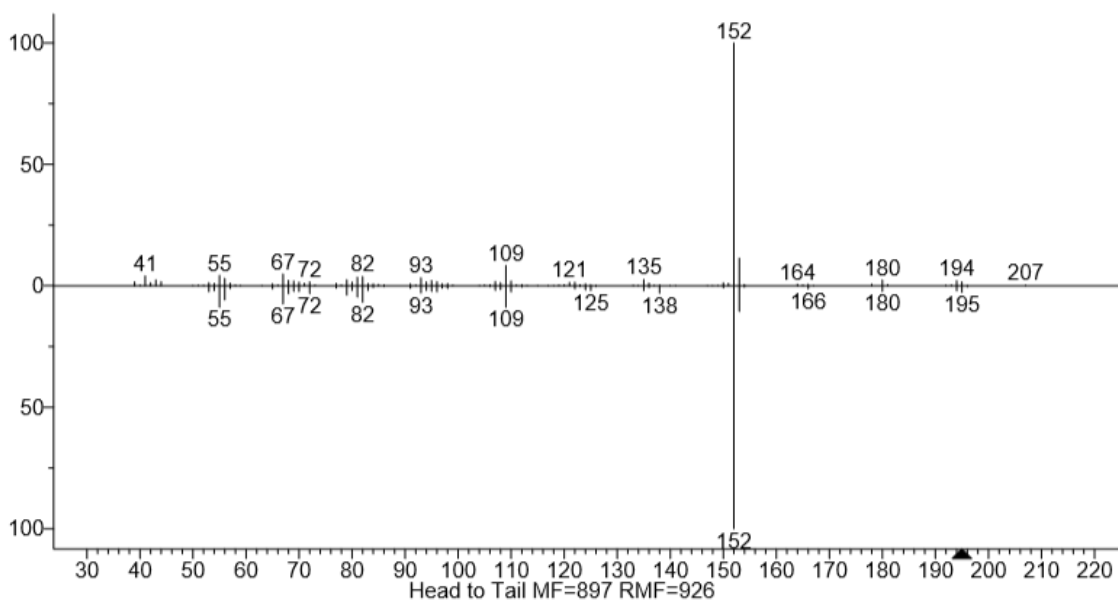
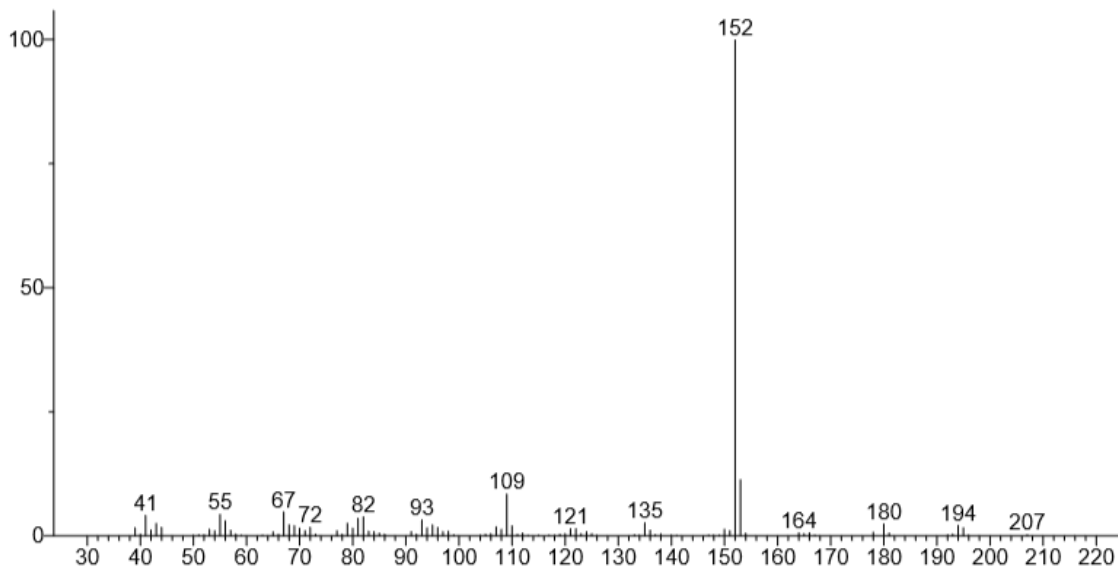
Anexo 62. Espectro de masas de Octahydrohistrionicotoxina (291A), con un tiempo de retención de 37.788 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



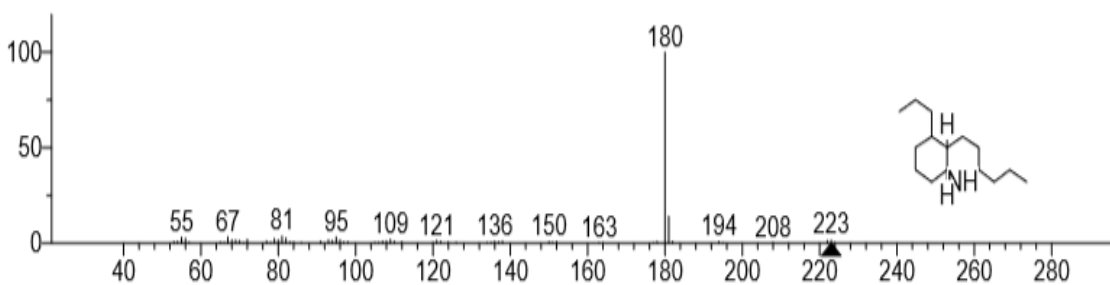
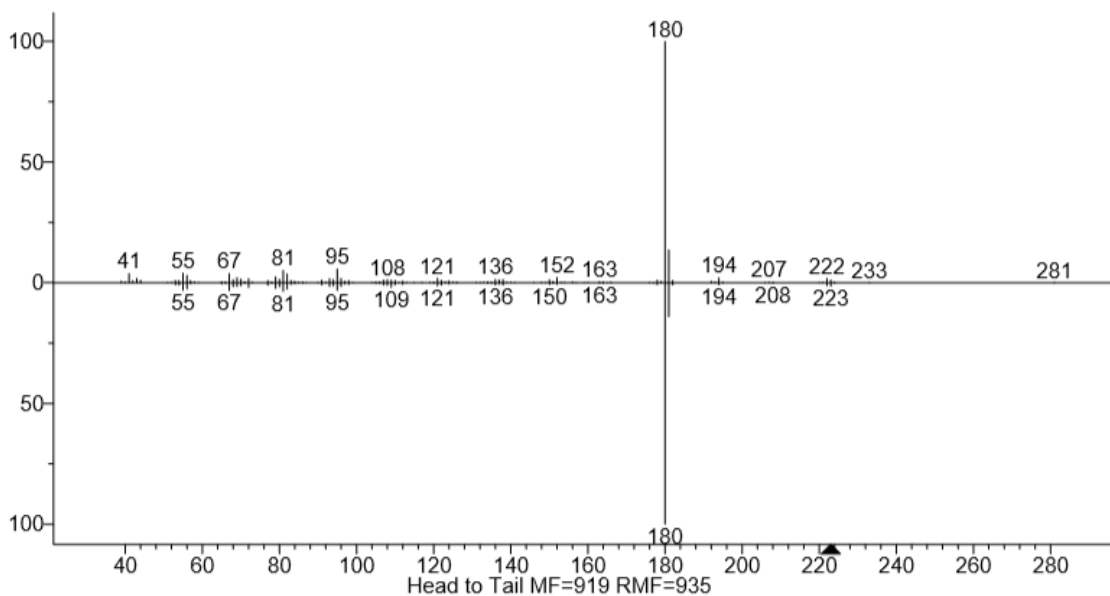
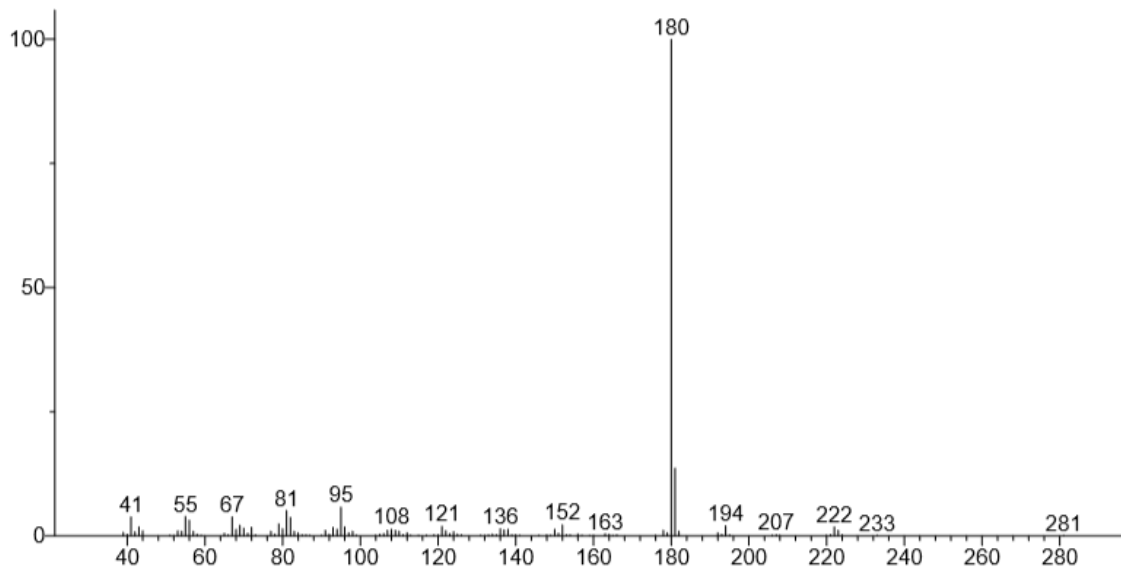
Anexo 63. Espectro de masas de Alopumiliotoxina (323B), con un tiempo de retención de 41.394 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



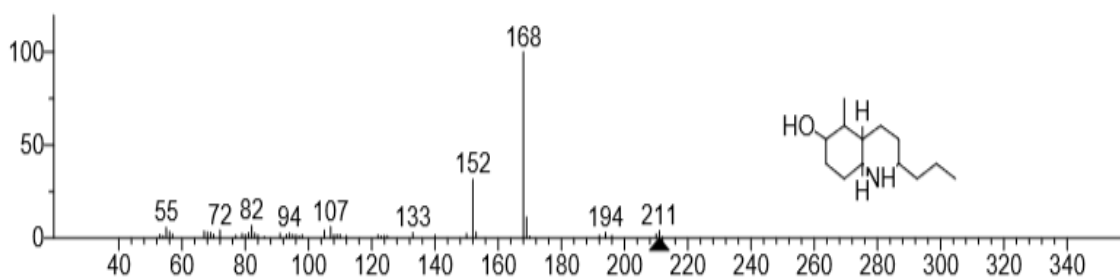
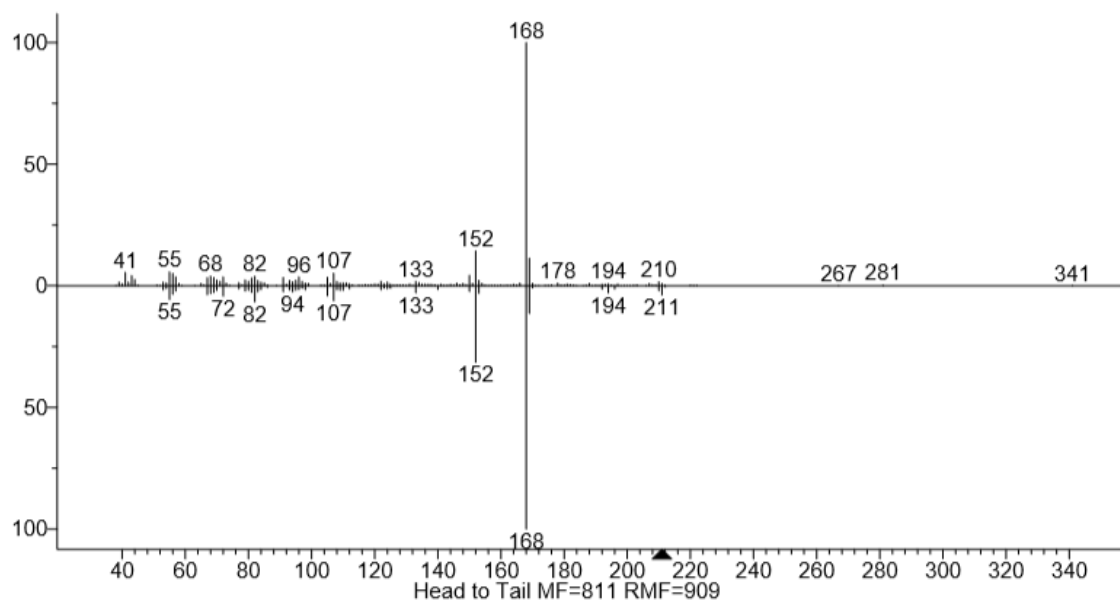
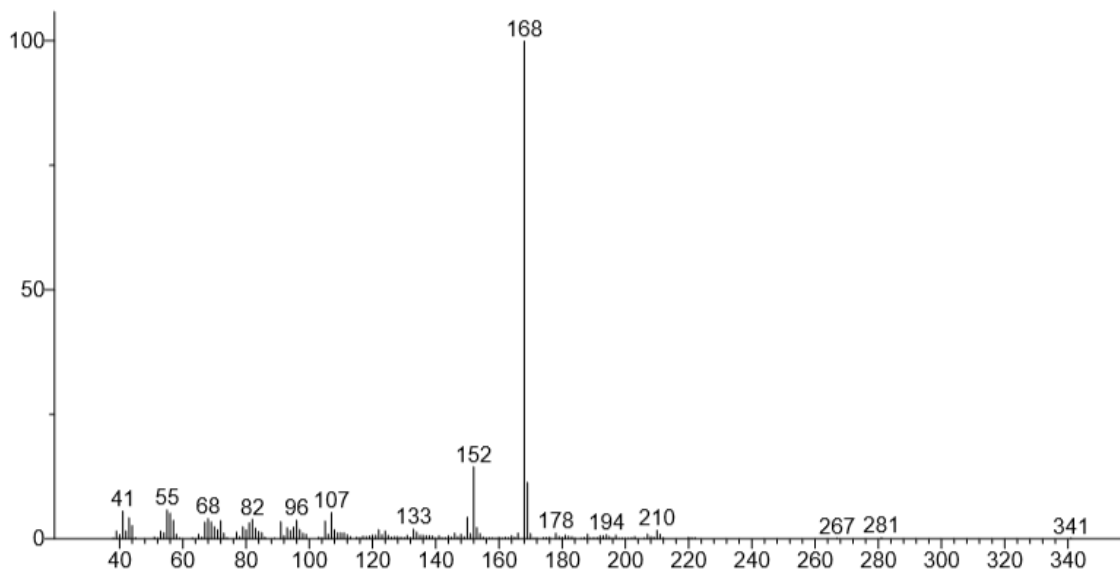
Anexo 64. Espectro de masas de Decahidroquinolina (195A), con un tiempo de retención de 21.155 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



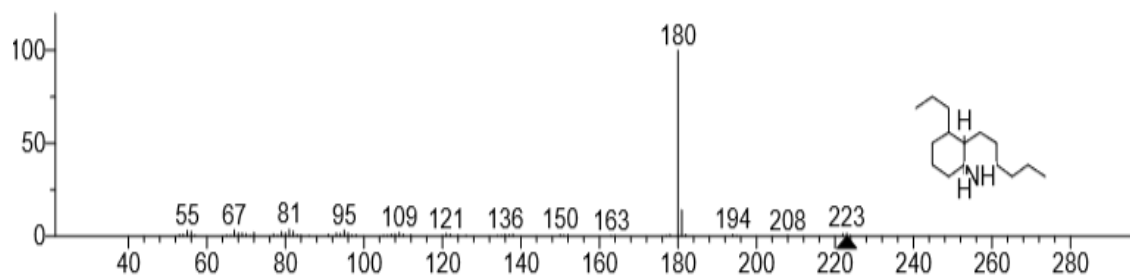
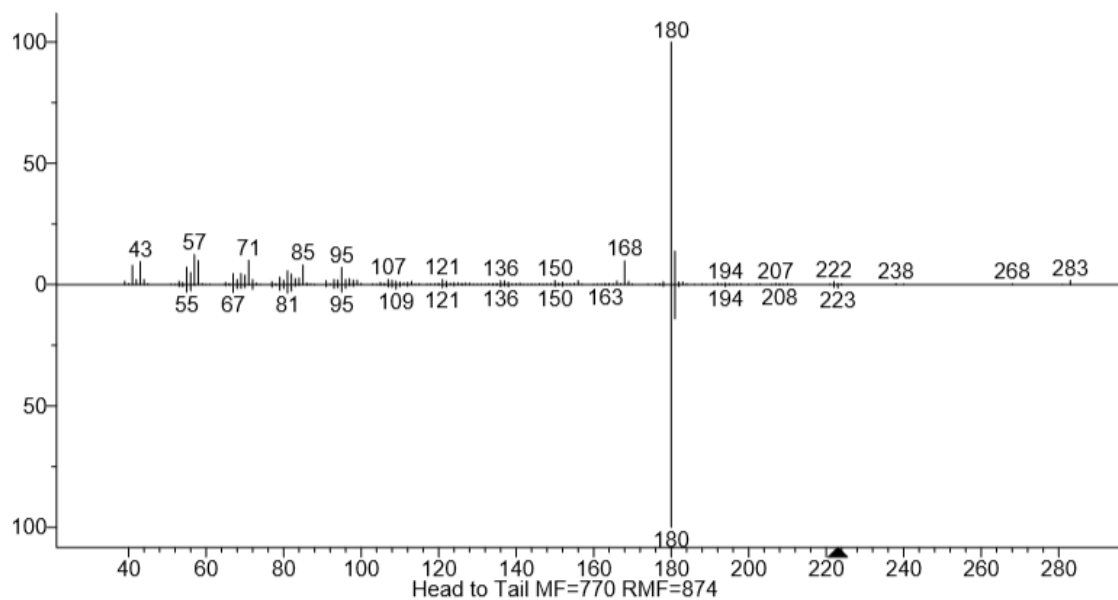
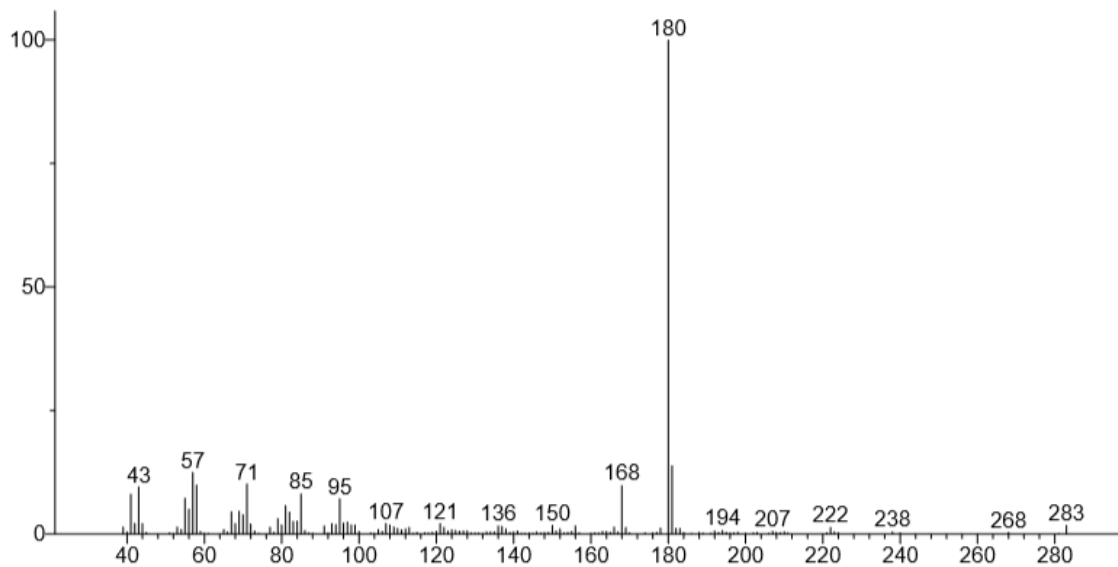
Anexo 65. Espectro de masas de Decahidroquinolina (195A), con un tiempo de retención de 22.772 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



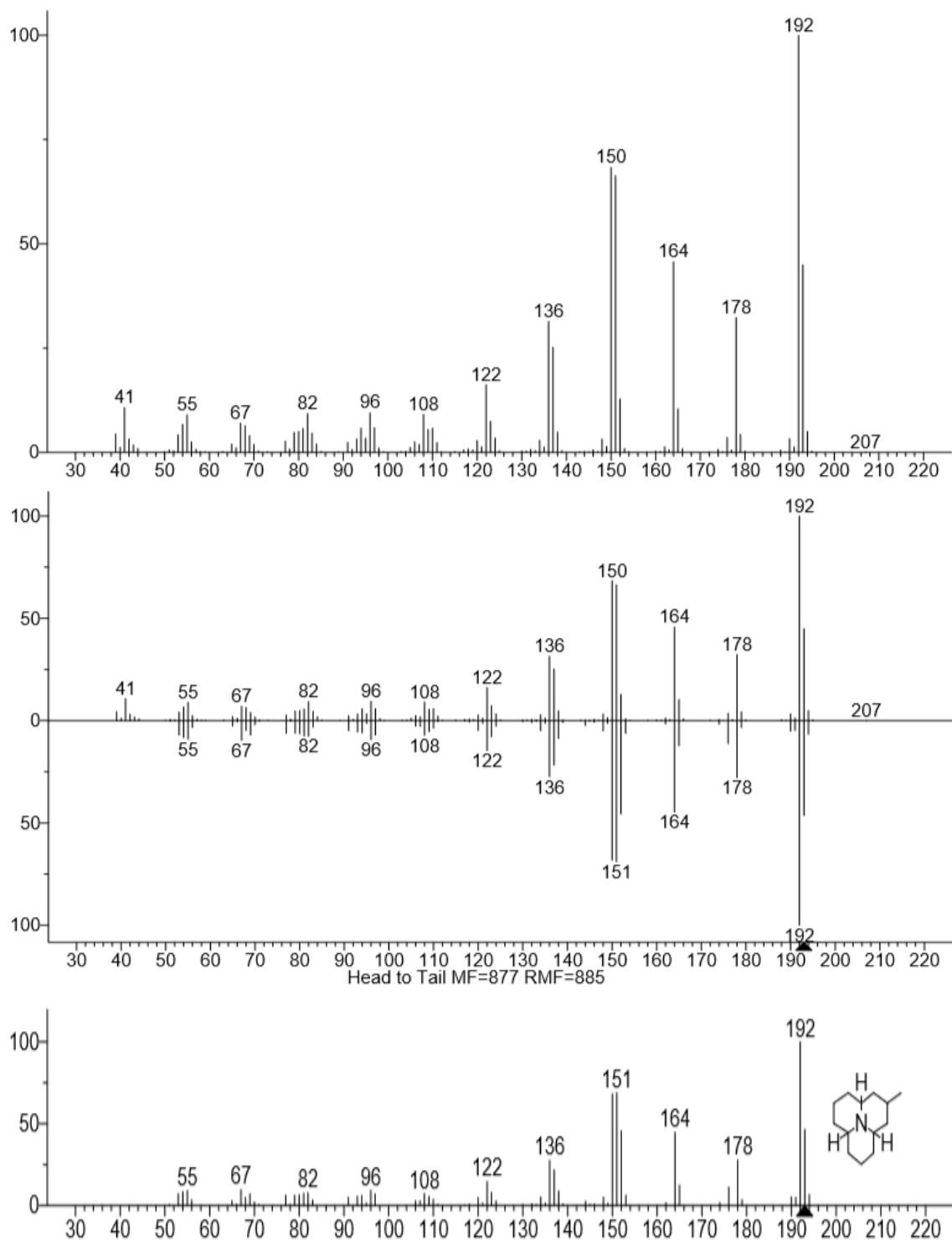
Anexo 66. Espectro de masas de Decahidroquinolina (223F), con un tiempo de retención de 25.466 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



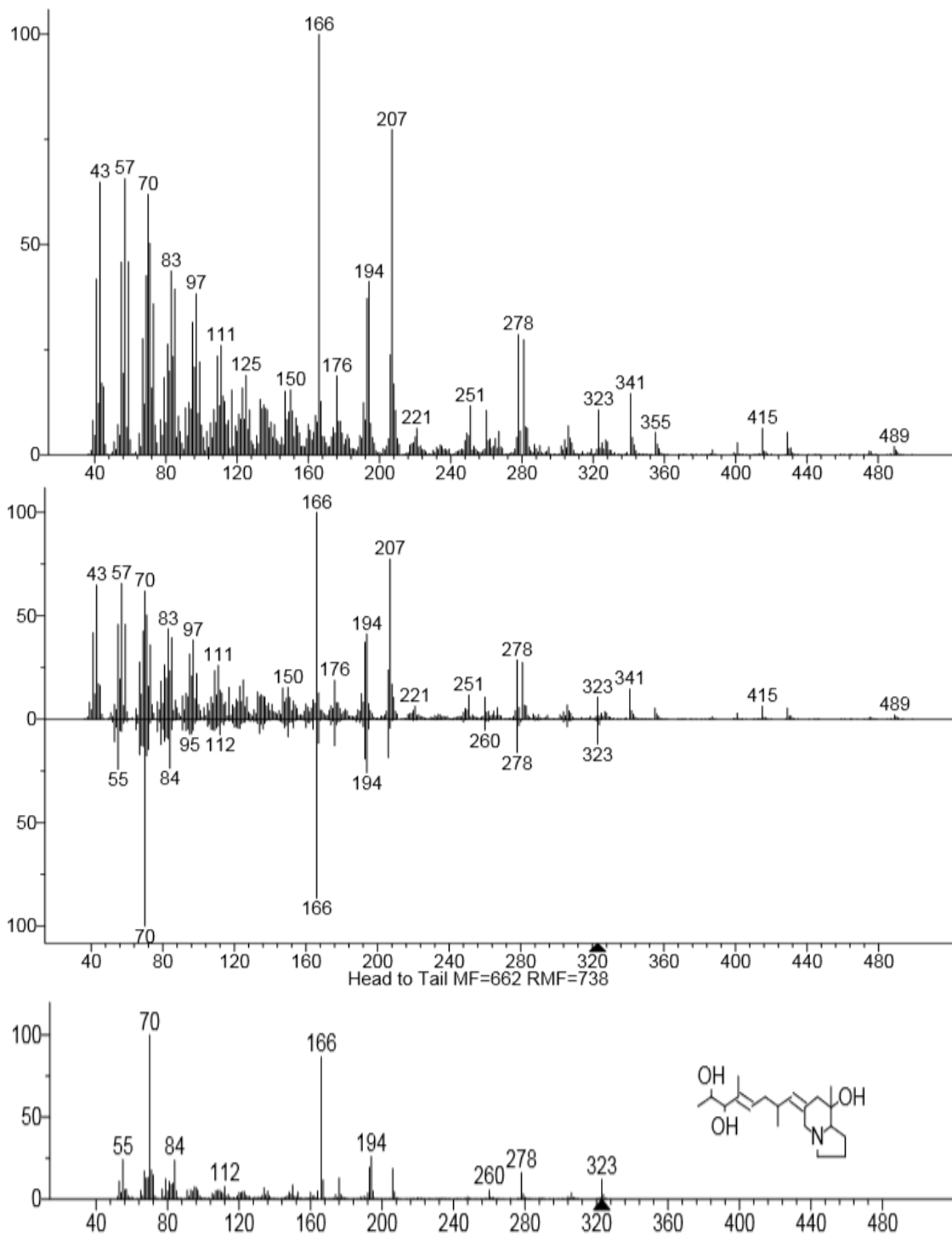
Anexo 67. Espectro de masas de Decahidroquinolina (211A), con un tiempo de retención de 26.969 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



Anexo 68. Espectro de masas de Decahidroquinolina (223F), con un tiempo de retención de 27.124 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



Anexo 69. Espectro de masas de Tricíclico (195C), con un tiempo de retención de 22.513 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).



Anexo 70. Espectro de masas de Pumiliotoxina B, con un tiempo de retención de 41.716 min, obtenido con ranas de la especie *Epipedobates darwinwallacei* (muestra S).

**PARA GRADOS ACADÉMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN**

Yo, Alex Nicolay Torres Campaña con c.i 1716084320, autor del trabajo de disertación titulado: “Separación y caracterización de alcaloides producidos en la piel de dendrobátidos ecuatorianos de las especies *Epipedobates darwinwallacei* y *Epipedobates anthonyi*, mediante técnicas espectroscópicas y cromatográficas”, previo a la obtención del grado académico de LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorización a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 12 de febrero del 2019

Sr. Alex Nicolay Torres Campaña

C.I. 1716084320