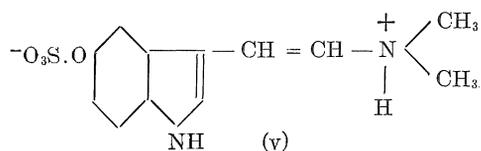
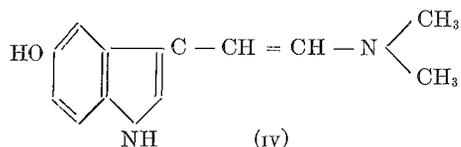
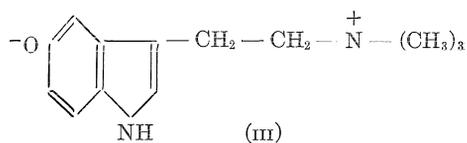
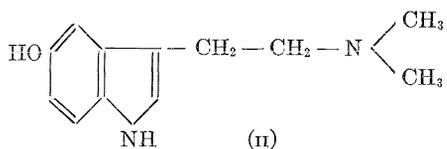
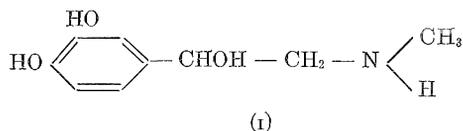


## Los constituyentes básicos de los venenos de algunos sapos sudamericanos

Por **VENANCIO DEULOFEU** y **ENRIQUE DUPRAT**

En el veneno de los sapos se encuentra siempre presente un grupo de sustancias que se han denominado los componentes básicos (1).

Son la adrenalina (I) y los derivados indólicos: bufotenina (II), bufotenidina (III), dehidrobufotenina (IV) y bufotionina (V):



Por los métodos que se describen en la parte experimental, estos componentes se han investigado en los venenos de algunos sapos sudamericanos. Se introducen algunos métodos de separación y una marcha de caracterización. Los datos obtenidos con respecto al *Bufo chilensis*, *B. crucifer* y *B. spinulosus* son totalmente nuevos, pues dichas especies no habían sido nunca estudiadas. Los referentes al *B. arenarum* y *B. paracnemis* son complementarios de otras publicaciones de diversos autores que se detallan en cada caso particular.

#### PARTE EXPERIMENTAL

*Métodos empleados.*— En algunos experimentos se empleó veneno seco de sapo. En otros se trabajó con la piel entera. El veneno se obtiene por presión de las glándulas parotoides y desecación en vacío. Las picles se secan previamente. Los métodos empleados son ligeramente diferentes para cada caso.

*Veneno seco.*— Para este material se siguió el método descrito por Wieland, Hesse y Hüttl (2) con algunas modificaciones. El veneno seco se extrajo a fondo con cloroformo que disuelve los componentes neutros (bufaginas). El veneno extraído se seca y se extrae nuevamente con una gran cantidad de alcohol metílico frío, repitiendo la extracción. La solución metanólica se destila a temperatura bien baja y el residuo se disuelve en una pequeña cantidad de etanol absoluto añadiéndose luego cloroformo hasta que no precipite más.

La solución contiene las bufotoxinas, los componentes básicos están en el precipitado. El precipitado se seca bien y se disuelve en agua. Todo el material insoluble se filtra. La solución acuosa es ligeramente ácida. Se lleva a un pH 2,5 y se extrae con éter libre de peróxidos, tipo que se emplea en todas las operaciones. Por evaporación del éter se obtiene ácido subérico, cuando se encuentra presente en cantidad adecuada.

La solución acuosa extraída con éter, se alcaliniza con hidrato de bario y se extrae de nuevo con éter. Por evaporación del éter se obtiene la bufotenina como un jarabe amarillo. Este jarabe se disuelve en una pequeña cantidad de ácido clorhídrico diluido y la solución se divide en dos partes.

A una de ellas, se añade ácido flaviánico, se calienta y por enfriamiento se obtiene flavianato de bufotenina, como agujas rojas que funden a 131-33° (3), y que se puede purificar por recristalización de agua. A la otra porción se añade ácido pícrico y con un poco de práctica es fácil obtener el dipicrato rojo de bufotenina

que funde a 174°. Este se puede transformar en el picrato (mono) amarillo que funde a 180° por ebullición con benzol y cristalización de agua (4). La bufotenina puede caracterizarse ulteriormente por transformación en iodhidrato de bufotenidina que funde a 215° por tratamiento de la misma con ioduro de metilo (5).

El bario se elimina de la solución acuosa alcalina por el añadido de ácido sulfúrico diluído. En la solución restante se puede investigar la bufotenidina por la adición de ácido flaviánico. Ninguno de los venenos contenía esta base.

La solución se concentraba entonces a baja temperatura manteniendo el pH cerca de la neutralidad. De tiempo en tiempo, por ejemplo cuando el volumen se reducía a la mitad, se tomaba una muestra, se llevaba a ligera acidez con ácido clorhídrico y se trataba con ácido pícrico. Si se encuentra presente la dehidrobufotenina, se obtiene en alguno de los ensayos un picrato amarillo que después de ser reocrystalizado de etanol absoluto funde a 187°. De etanol al 50 % funde en forma indefinida a 147-150°. Wieland y Wieland (4) señalan que el picrato de bajo punto de fusión puede transformarse en el de alto punto de fusión por ebullición con ácidos minerales.

El residuo de veneno que ha sido extraído primero con cloroformo y luego con metanol, se seca y puede emplearse ulteriormente para el aislamiento de adrenalina. Se lo extrae con una solución acuosa al 1 % de ácido acético y puede seguirse el método descrito por Deulofeu (6).

Por este método es relativamente fácil caracterizar todos los componentes básicos de los venenos que se han mencionado. No hemos podido obtener bufotionina que se aisla fácilmente de los cueros de sapo secos.

*Pielés de sapo.*—Las pieles bien secas se extraen dos veces con una gran cantidad de etanol 70-80 %. Los extractos reunidos se concentran a baja temperatura hasta casi sequedad y el residuo se trata varias veces con éter de petróleo hasta que este disolvente no deje ningún residuo por evaporación.

El resto, insoluble en éter de petróleo, se trató con un pequeño volumen de etanol absoluto, donde se disuelve en su mayor parte quedando insolubles la bufotionina y las sales minerales. El residuo insoluble se filtra y por reocrystalización de agua, con el empleo de carbón si se juzga necesario, se puede aislar fácilmente bufotionina como prismas incoloros que funden a 250° (ennegreciendo desde 240°) y que se caracteriza ulteriormente por transformación en clorhidrato de dehidrobufotenina (punto de fusión 244°) por ebullición con ácido clorhídrico 2 N.

La solución etanólica se concentra a un pequeño volumen y se añade a una gran cantidad de agua helada. Se forma un precipitado que se filtra, formado en su mayor parte por bufaginas, mientras que las bases pasan a la solución.

La solución acuosa de las bases se concentra a baja temperatura, se filtra nuevamente si aparece un precipitado y su pH se lleva a 2,5. De la misma se puede aislar ácido subérico, bufotenina, dehidrobufotenina y también bufotenidina si se encuentra presente, aplicando el método que se ha descrito para el veneno.

No se consigue aislar adrenalina ni aun de pieles de sapos que la contienen en el veneno seco. Aparentemente se destruye durante el proceso.

En todos los casos se determinaron los puntos de fusión mezcla de las sustancias aisladas como complemento de la identificación, empleando muestras características.

RESULTADOS OBTENIDOS. — *Bufo chilensis*. — Esta es la especie más común de sapo que existe en Chile. De la piel se pudo aislar bufotionina de punto de fusión 252° que luego se transformó en clorhidrato de dehidrobufotenina, fundiendo a 243° por tratamiento con ácido clorhídrico. De la solución alcohólica se pudo aislar ácido subérico que fundió a 143° y bufotenina. Se obtuvo un dipicrato rojo de punto de fusión 172-173° que pasó al monopicrato amarillo por ebullición con benzol (P. F. 179°). También se aisló el flavianato de bufotenina de punto de fusión 130-131°. También se encuentra dehidrobufotenina puesto que se aisló un picrato de punto de fusión 187° después de la separación de bufotenina.

*Bufo crucifer*. — Este sapo muy pequeño existe en algunas zonas del Brasil. Dispusimos tan solo de una cantidad limitada (350) de pieles secas.

Se caracterizó bufotionina (punto de fusión 250°) y por tratamiento con ácido clorhídrico se obtuvo clorhidrato de dehidrobufotenina (punto de fusión 240-41°). Entre las sustancias solubles en alcohol se encontró la bufotenina. Su dipicrato rojo fundía a 173° y el flavianato a 130-31°. También se encontró dehidrobufotenina aislada como picrato amarillo de punto de fusión 187°.

*Bufo spinulosus*. — Es una especie de sapo común en el Perú. Pudimos obtener solamente 43 pieles secas. Solamente se pudo caracterizar bufotionina (puntos de fusión 249°) y dehidrobufotenina (picrato amarillo de punto de fusión 187°). La pequeña cantidad de material empleado no permite excluir la presencia de bufotenina o bufotenidina en esos cueros.

*Bufo paracnemis*. — Este sapo de gran tamaño que se encuentra en la parte norte de la R. Argentina fué estudiado por Deulofeu y Mendive (3) quienes aislaron del veneno seco bufotenina y adrenalina.

Trabajando con la piel seca hemos podido caracterizar bufotionina fundiendo a 249° que se transforma en clorhidrato de dehidrobufotenina de punto de fusión 240-41°.

También se caracterizó bufotenina como dipicrato rojo de punto de fusión 174°. De este picrato se obtuvo la bufotenina libre amorfa suspendiéndolo en ácido clorhídrico 2 N y extrayendo la suspensión con éter en un aparato de trabajo continuo. La solución acuosa de clorhidrato de bufotenina se llevó a alcalinidad con hidrato de bario y se extrajo de nuevo con éter. Por evaporación del éter se obtuvo la bufotenina como un jarabe. Este se disolvió en una pequeña cantidad de éter y se trató con yoduro de metilo produciéndose casi de inmediato un precipitado amorfo. Este se filtró y por disolución en una pequeña cantidad de alcohol metílico da cristales incoloros de iodhidrato de bufotenidina que funden a 213-215°.

También se encontró dehidrobufotenina que se pudo caracterizar fácilmente por intermedio de su picrato amarillo de punto de fusión 187°.

No pudo caracterizarse adrenalina que en cambio se había aislado del veneno seco.

*B. arenarum*. — Esta es la especie de sapo predominante en la parte central de la R. Argentina. En el veneno seco, Chen, Jensen y Chen (7) encontraron dehidrobufotenina y bufotenina que caracterizaron como flavianatos. Posteriormente Deulofeu encontró (6) adrenalina y Jensen (8) bufotionina.

De los cueros Wieland, Konz y Mittasch (5) habían aislado bufotionina, bufotenina y dehidrobufotenina.

Nosotros hemos repetido el aislamiento de todas las substancias anteriores y hemos confirmado su presencia. No pudo aislarse adrenalina.

#### DISCUSIÓN

La información lograda con estas experiencias se suma a la existente sobre otro sapo sudamericano el *B. marinus* cuyo habitat se extiende hasta Jamaica. En el *B. marinus*, Abel y Macht (9) caracterizaron por vez primera a la adrenalina en un veneno de sapo. Posteriormente Chen y Chen (10) obtuvieron dehidrobufotenina como flavianato y Deulofeu y Mendive (3) bufotenina. No se ha descrito el aislamiento de bufotionina de la secreción y no se han tra-

bajado cueros de los cuales se puede aislar tan fácilmente. Como las secreciones del *B. marinus* y *B. paracnemis* son idénticas en sus componentes químicos, pensamos que se encontrará bufotionina en la misma si se la investiga empleando un número adecuado de cueros.

El veneno de todos estos sapos sudamericanos está caracterizado por la presencia entre sus componentes básicos de dehidrobufotenina, su derivado de conjugación sulfúrico, la bufotionina y su producto de reducción la bufotenina.

Aunque no podemos formular ninguna hipótesis documentada sobre la forma en que estas bases se producen en el organismo, es interesante señalar que la bufotenina aumenta la presión arterial, mientras que esta actividad falta en sus dos derivados, el de conjugación, que por otra parte es muy insoluble y el de deshidrogenación. En vista de esta relación no es difícil pensar que la transformación de una substancia en otra es un mecanismo para regular la cantidad del componente activo, y mantener siempre presentes sus posibles antecesores.

Es interesante que en ningún sapo sudamericano se haya encontrado bufotenidina, que se ha encontrado en especies de otras regiones.

Estamos particularmente seguros de su falta en los venenos de *B. paracnemis* y *B. arenarum* pues hemos dispuesto de material abundante para realizar su estudio y en el caso del *B. marinus* en el cual empleamos exclusivamente una muestra de veneno para intentar caracterizar el mencionado compuesto.

#### RESUMEN

1) Se han estudiado los componentes básicos de los venenos de los siguientes sapos sudamericanos: *B. chilensis*, *B. crucifer*, *B. spinulosus*, *B. paracnemis* y *B. arenarum*.

2) Bufotionina, bufotenina y dehidrobufotenina son los componentes más comunes en el veneno. La adrenalina se ha podido aislar en los estudios realizados con veneno seco. No se ha encontrado bufotenidina, ni en el veneno seco ni en los cueros.

\* \* \*

Una parte de este trabajo fué realizado en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas (Buenos Aires).

Deseamos agradecer al Dr. G. Villela (Río Janeiro, Brasil), Dr. A. Taborda (San Pablo, Brasil), Dres. H. Croxatto y O. Koref (San-

tiago, Chile), Dr. V. Carcamo (Lima, Perú) y Dr. J. Vellard (Tucumán) la recolección y el envío de mucho del material utilizado en el mismo.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Un resumen parcial se encuentra en VAN ORDER, R. H., y LINDWALL, H. G. — *Chem. Reviews*, **30**, 69 (1942).
- (2) WIELAND, H.; HESSE, G., y HUTTEL, R. — *Ann. Chem.*, **524**, 203 (1936).
- (3) DEULOFEU, V., y MENDIVE, J. R. — *Ann. Chem.*, **534**, 288 (1938).
- (4) WIELAND, H., y WIELAND, T. — *Ann. Chem.*, **528**, 234 (1937).
- (5) WIELAND, H.; KONZ, y MITTASCH, H. — *Ann. Chem.*, **513**, 1 (1934).
- (6) DEULOFEU, V. — *Zeit. physiol. Chem.*, **237**, 171 (1935).
- (7) CHEN, K. K.; JENSEN, H., y CHEN, A. L. — *J. Pharmacol. experim. Therap.*, **49**, 1 (1933).
- (8) JENSEN, H. — *J. Am. Chem. Soc.*, **57**, 1765 (1935).
- (9) ABEL, J. J., y MACHT, D. I. — *J. Pharmacol. experim. Therap.*, **3**, 319 (1911).
- (10) CHEN, K. K., y CHEN, A. L. — *J. Pharmacol. experim. Therap.*, **49**, 514 (1933).