

## Tesis de Posgrado

# Estudio químico de venenos de sapos sudamericanos

Duprat, Enrique

1941

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Duprat, Enrique. (1941). Estudio químico de venenos de sapos sudamericanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0275\\_Duprat.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0275_Duprat.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Duprat, Enrique. "Estudio químico de venenos de sapos sudamericanos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1941.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0275\\_Duprat.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0275_Duprat.pdf)

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

ESTUDIO QUIMICO DE VENENOS

DE SAPOS SUDAMERICANOS

por

*Tesis: 275*

Enrique Duprat

T E S I S

para optar al grado de Doctor en Química

1 9 4 1

## P R E F A C I O

La primera pregunta que se nos formula a los que nos ocupamos de temas tan especializados como éste de los "venenos de sapos", es acerca de la aplicación práctica que de ellos puede derivarse.

Tan pragmatizados están los espíritus en los tiempos que corren - o acaso lo han estado en todos - que resulta difícil concebir el estudio puramente desinteresado, que encuentra su razón de ser en sí mismo.

Sin embargo, creemos que los presuntos lectores de este trabajo de tesis bien merecen una breve explicación acerca de los motivos que nos indujeron a ocuparnos de semejante cuestión, que está, ciertamente, desprovista de aplicaciones prácticas, pero no de interés.

En 1938, por rara excepción en una carrera de tanta labor material como la nuestra, pudimos disponer de algún tiempo libre y, como deseábamos entrenarnos en la investigación en Química Orgánica o Biológica, nos dirigimos al Dr. Alfredo Sordelli - a la sazón nuestro profesor de esta última materia - con el objeto de requerir una orientación precisa al respecto.

El, en conocimiento de nuestra intención, nos puso en contacto con el Dr. Venancia Deulofeu, bajo cuya dirección comenzamos a trabajar, en el laboratorio de la Sección Organoterapia del Instituto Bacteriológico, el 15 de junio del año mencionado, día que fué para nosotros de gran emoción, porque nos considerábamos desde ya como integrantes - por cierto que los más modestos - de la innumerable legión que, en todo el mundo, trabaja por el progreso del conocimiento humano.

Con algunas intermitencias continuamos concurriendo todo el resto del año al laboratorio citado, así como también al del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas, resumiendo la labor realizada hasta entonces en un opúsculo que, con el título de "Contribución al estudio químico de algunos venenos de sapos sudamericanos" fué presentado a los Con-

cursos Universitarios de la Institución Mitre correspondientes a 1939, acordándosele el 1er. Premio de la Sección Química.

Ese año, así como también el siguiente, en que algunos de los resultados obtenidos fueron dados a conocer (Deulofeu, Duprat y Labriola, 1940), nos fué de todo punto imposible volver a ocuparnos de este tema; hasta que en 1941, libres ya de exámenes, pudimos reiniciar por fin los trabajos interrumpidos, esta vez en el Instituto de Fisiología, exclusivamente.

El plan seguido en la presente monografía, que comprende las experiencias verificadas en ambos períodos, es el siguiente: Una parte general, compuesta de antecedentes históricos y consideraciones acerca de los componentes habituales en los venenos de sapos, y otra especial. En ésta, luego de fijarse los términos en que se plantea el problema en el caso de cada especie, se describen las operaciones efectuadas con prescindencia del orden cronológico (Bufo marinus y Bufo chilensis en 1938, y Bufo arenarum en 1941), prefiriéndose, en cambio, atender a la importancia que ellas han adquirido en la literatura mundial.

Hubiera sido nuestro deseo dar mayor amplitud a este trabajo complementándolo con nuevos estudios acerca de otros bufónidos sudamericanos y con la prosecución de los ya realizados; pero nos vemos en la necesidad de diferir ambos propósitos para mejor oportunidad debido, por una parte, a no poseer las cantidades de muestra que serían necesarias y, por otra, a que las reglamentaciones vigentes exigen la presentación de la tesis para la otorgación del título habilitante.

Según nuestra modesta opinión, este inconveniente podría ser salvado si, como ocurre en otras carreras, la aprobación de la totalidad de las materias autorizase el ejercicio de la profesión, con lo cual se daría libertad para que los que así lo desearan pudieran obtener un diploma superior

y, lo que es más importante, acrecentaría el prestigio universitario al permitir la realización de trabajos de mayor envergadura, impedida ahora, como en nuestro caso, por imperativos económicos ineludibles.

Después de estas breves consideraciones, que estimamos necesarias, sólo nos resta expresar nuestro profundo agradecimiento a todos los que, en mayor o menor grado, coadyuvaron a la realización de nuestros propósitos:

Al Dr. Venancio Deulofeu, a cuya experta dirección corresponde - sin exageración alguna - la mayor parte del mérito que este estudio pueda poseer. Sin su ayuda, que tuvo siempre la delicadeza de disimular los yerros de nuestra inexperiencia, nada nos hubiera sido posible hacer:

A los Dres. Bernardo A. Houssay y Alfredo Surdelli directores, respectivamente, del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas y del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene que, al permitirnos utilizar los laboratorios y elementos de ambas instituciones, no sólo contribuyeron de manera eficaz y decisiva a la realización material de nuestro trabajo, sino también - y ello no es lo menos importante - nos brindaron la oportunidad de ponernos en íntimo contacto con dos ejemplares organizaciones científicas como no se encuentran frecuentemente entre nosotros, de cuyo magnífico espíritu deseáramos habernos contagiado;

Al Dr. Rafael Labriola, a cuya gentileza se deben los análisis complementarios de nuestra experiencia los cuales, por haber sido realizados sobre muestras muy pequeñas, requieren el empleo de técnicas especializadas y minuciosas que él domina ampliamente.



## GENERALIDADES

HISTORIA: Desde mucho tiempo atrás ha sido considerado el sapo como animal ponzoñoso, capaz de ejercer perniciosa acción sobre los organismos a su alcance, pudiendo encontrarse ya en el Talmud referencias en tal sentido.

Y aunque así parece confirmarlo el calificativo de "venenos" que se aplica a las substancias que son objeto de este trabajo, mayor influencia que los hechos constatados ha de haber tenido, en la gestación de la leyenda el aspecto repulsivo del animal, que convierte a éste en una suerte de "paria zoológico".

En efecto, si bien es cierto que los bufónidos poseen una secreción tóxica en su piel, no lo es menos que carecen de medios para introducirla en el organismo de sus presuntos atacantes, razón por la cual no ha de ser muy grande su poder ofensivo.

Desde el punto de vista de la acción terapéutica, podemos decir que estas substancias han sido incorporadas a diversas farmacopeas populares en el correr de los tiempos.

Los curanderos que ejercían su oficio entre nuestros hombres de campo solían tratar el herpes mediante la aplicación del animal sobre la parte enferma.

En Extremo Oriente, en cambio, desde tiempos muy remotos se tenía una noción mucho más exacta de su acción curativa y, habiéndose conocido la existencia del veneno, se había aprendido a extraerlo y a preparar con él un medicamento - llamado Ch'an Su en China y Senso en Japón - que, aplicado exteriormente, resultaba beneficioso en el tratamiento del dolor de muelas, sinusitis y hemorragias gingivales.

En Europa, ya en el siglo XVII<sup>o</sup>, y aun antes, abundan las referencias acerca de la curación de ciertas hidropesías mediante el empleo de la piel

de sapo seca y pulverizada, medicamento que cayó en desuso cuando se introdujo la digitalina, de comportamiento similar pero mucho más enérgico.

Esta semejanza en la acción farmacodinámica no es casual y obedece, según se comprobó mucho más tarde, al hecho de que en ambos venenos hay sustancias cuyas constituciones químicas guardan estrecho parentesco; pues los digitálicos (venenos vegetales) son glucósidos cuyas agluconas pertenecen al ya crecido grupo de derivados del perhidrociclopentanofenantreno, mientras que estos venenos animales son mezclas complejas, cuyos componentes no pueden agruparse en una común denominación, pero en las cuales figuran también diversos derivados de ese mismo hidrocarburo policíclico.

Pero la química de estos productos recién ha progresado decididamente en el transcurso de los últimos treinta años, pues aunque ya en 1893 Phisalix y Bertrand, de París, señalaron la presencia de algunas bases, es recién en 1911 que Abel y Macht, de la John Hopkins University de Baltimore, llegan a un resultado de capital importancia en este tema, como es el aislamiento de un principio puro de acción cardíaca (posteriormente llamado marinobufagina) del veneno de B. marinus.

Luego, según surge del examen de la bibliografía, decae el interés por estos estudios durante un lapso de casi diez años, hasta que en 1920 Handovsky logra cristalizar algunas sales de las bases indicadas por los autores franceses ya citados.

Finalmente, es desde 1930 en adelante que se multiplican los trabajos de Wieland en Alemania - que comenzaron ya en 1913 - y los de Chen, Jensen y Chen en E.E.U.U., todos los cuales han tenido importancia decisiva en la resolución de estos problemas, aclarando bastante la composición de los venenos y la constitución química de los componentes.

En la enumeración de estos estudios no pueden dejar de mencionarse



se los japoneses que, entre otras cosas, han tenido por objeto determinar la especie de sapo con que había sido preparado el Ch'an Su, que Chen y Chen (1933,2) han señalado como proveniente del Bufo bufo gargarizans, variedad que se encuentra corrientemente en China.

OBTENCION: Aparte de estas referencias de índole puramente histórica, diremos que el veneno se obtiene fácilmente del animal vivo por expresión de las glándulas parotoides - que forman dos promontorios cercanos a los ojos y de otras que, en algunas especies, se encuentran en los muslos.

En estado de excitación - mecánica, química o eléctrica - la actividad de las glándulas aumenta enormemente y la secreción rezuma de ellas como un líquido espeso, de color blanco-amarillento, que, secado en placas de vidrio, se presenta bajo la forma de escamas con aspecto de gelatina.

Además, como todo el dorso del sapo está tapizado de pequeñas glándulas que excretan una sustancia de idéntica o parecida composición, pero que no resulta productivo exprimir, se obtiene ésta sacrificando al animal, desollándolo y dejando la piel en alcohol durante varios días.

Pero, a pesar de esta doble extracción, cada ejemplar provee muy poca cantidad de veneno seco, resultando la escasez de material la principal dificultad para el estudio. Se necesitan millares de animales, que no siempre es posible conseguir, para intentar una investigación con posibilidades de éxito, y el menor accidente con pérdida de sustancia puede conducir al fracaso.

No obstante, las especies de gran tamaño suelen rendir cantidades apreciables (Deulofeu y Mendive, 1938, consignan gr. 0,7-1,4 por ejemplar de B. paracnemis), pero esta ventaja es más aparente que real, pues en ese caso la proporción de componentes activos es bastante menor, como se comprueba luego, al realizar la separación.

**COMPOSICION:** Los venenos de los bufónidos forman complejos de diferente constitución para cada especie, pero cuyos componentes pueden agruparse en varias fracciones homogéneas que estudiaremos por separado.

Existe, en primer lugar, un soporte físico de naturaleza proteica que, a pesar de constituir la mayor parte de la secreción, no presenta por ahora interés para nosotros.

El resto, de menor volumen, pero en el cual residen las propiedades farmacológicas que son en realidad las que han inducido al estudio de estos productos, puede ser dividido en dos partes:

1ª) Una fracción neutra constituida por los derivados del perhidrociclopentenofenantreno al estado libre (colecterol y bufaginas) y conjugados con la suberilarginina (bufotoxinas), que son los responsables de la acción cardiotónica de los venenos de sapos;

2ª) Una fracción básica formada por sustancias de fuerte acción vasopresora (adrenalina) y por un grupo homogéneo de derivados de la triptamina (bufotenina, bufotaniína, dehidrobufotenina, bufotionina), que la poseen en grado menor.

Ambas son de tal importancia para nuestro estudio que hemos estimado conveniente asignar a cada una de ellas un capítulo especial donde se mencionan someramente las propiedades de los respectivos componentes y se describen los métodos empleados en su conocimiento.

## F R A C C I O N   N E U T R A

Numerosos productos de gran interés biológico - esteroides, ácidos biliares, hormonas sexuales, vitamina D, agluconas cardíacas - integran el grupo de derivados del perhidrociclopentenofenantreno, al cual pertenecen también los componentes de la fracción que nos ocupa, habitualmente llamada neutra.

En general podemos decir que en cada veneno de sapo ella está constituida por dos sustancias de carácter específico que reciben, respectivamente, el nombre genérico de bufagina y bufotoxina, y por una tercera - el colesterol - que, muy por el contrario, se encuentra en distintos tejidos y órganos de animales pertenecientes a las familias más diversas.

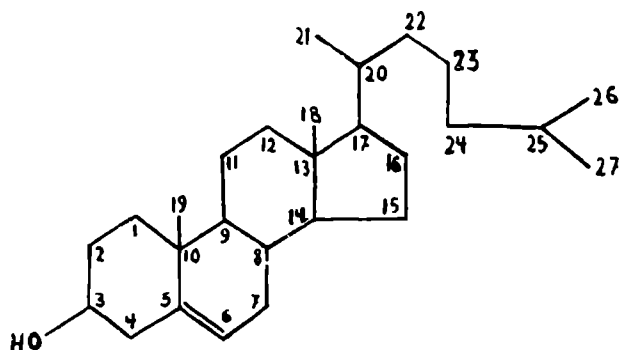
Debido a esa especificidad que apuntamos existe un número relativamente crecido de estos productos, que reciben denominaciones variadas según las especies de donde provienen y cuya estructura es, en muchos casos, bastante poco conocida.

Pasaremos, pues, a describir cada uno de estos dos grupos en general, refiriéndonos en especial a los métodos empleados en el estudio de su constitución, pero previamente haremos algunas breves consideraciones acerca del colesterol que, si bien ha sido descrito en infinidad de oportunidades por haberse encontrado en materiales provenientes de los órganos más diversos, tiene, desde nuestro punto de vista el mérito de ser un elemento que está presente en todos los venenos de sapos.

COLESTEROL: Es ésta una sustancia de enorme importancia biológica, que forma la mayor parte de la fracción insaponificable de las grasas naturales.

Su fórmula, que se considera definitivamente establecida, contiene un esqueleto formado por tres ciclos hexagonales y uno pentagonal condensados, arrancando de este último una cadena lateral ramificada. Posee, además,

una doble ligadura en uno de dichos ciclos y, en otro de ellos, un radical hidroxilo que le comunica carácter alcohólico.



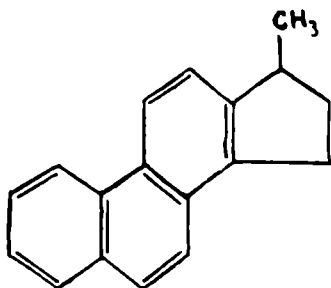
Colesterol

Para reconocerlo se usa su punto de fusión 148-51<sup>o</sup>, una reacción de precipitación que produce con la digitonina y, más frecuentemente, las de coloración de Liebermann-Burchard y de Hager-Salkowski, que consisten en la adición de unas gotas de ácido sulfúrico a soluciones clorofórmicas de colesterol a las cuales se ha agregado o no, respectivamente, una pequeña cantidad de anhídrido acético.

La función que el colesterol puede desempeñar en los venenos de sapos nos es desconocida, pero no sería extraño que, tanto las bufaginas como las bufotoxinas, fueran producto de sus transformaciones mediante procesos de oxidación "in vivo".

• BUFAGINAS: Según queda dicho, también las bufaginas - que en algunas especies reciben los nombres de bufotalina o bufogenina - son derivados del perhidrociclopentenofenantreno y, como tales, presentan ciertas analogías con el colesterol, que se manifiestan por el carácter igualmente positivo de la reacción de Liebermann-Burchard, así como por la obtención, en ambos casos, del hidrocarburo de Diels - o metilciclopentanofenantreno - mediante la reducción con selenio, que demuestra asimismo la relación de uno y otros com-

puestos con el hidrocarburo fundamental.



Metilciclopentanofenantrene

(Hidrocarburo de Diels)

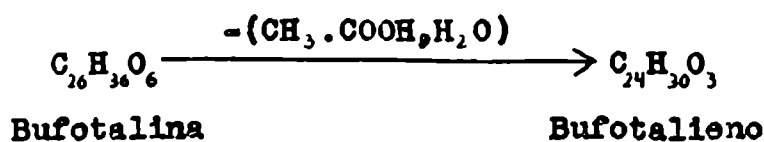
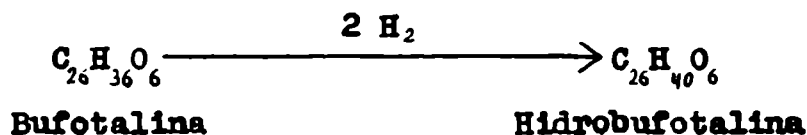
Sin embargo, desde el punto de vista estructural, tales analogías sólo subsisten en los primeros 19 carbonos que forman los cuatro ciclos, mientras que, a partir de allí, nos encontramos con otra agrupación atómica estrechamente vinculada a un grupo de compuestos de origen vegetal: el de las agluconas cardíacas. Dicha agrupación es un anillo lactónico no saturado responsable, según toda evidencia, de la acción cardiotónica que ambas series de sustancias poseen.

Tanto lo relativo al parentesco de estos productos con los esteroides, como lo que se refiere a la posible existencia del grupo lactónico, fueron ya señalados por Wieland en su trabajo inicial acerca de estos temas (Wieland y Weil, 1913) en base al estudio de las reacciones químicas y de la acción fisiológica de la bufotalina, que es la genina del B. vulgaris.

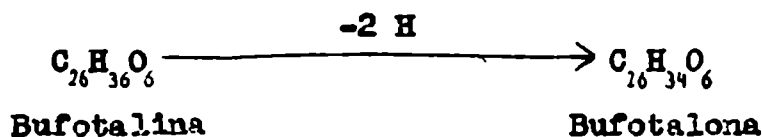
El carácter no saturado de dicho anillo fué descubierto merced a que la actividad cardiotónica experimenta una fuerte disminución cuando se hidrogena el compuesto y, por otra parte, porque el ácido liberado por hidrólisis es tan lábil que no se logra su aislamiento.

Una serie de transformaciones de distinto carácter permite saber algo más sobre la estructura de la bufotalina. Así, la adición de un par de moléculas de hidrógeno con formación de hidrobufotalina fija en dos el nú-

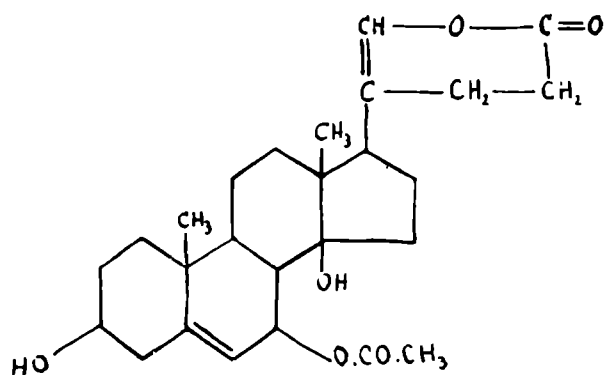
mero de dobles enlaces, mientras que la hidrólisis ácida, en la que pierde ácido acético y produce bufotalieno, demuestra la existencia de un grupo acetoxilo.



La acetilación y la oxidación que conducen, respectivamente, a la formación de acetilbufotalina y de una cetona (bufotalona), revelan la presencia de dos hidroxilos, uno de los cuales es secundario.



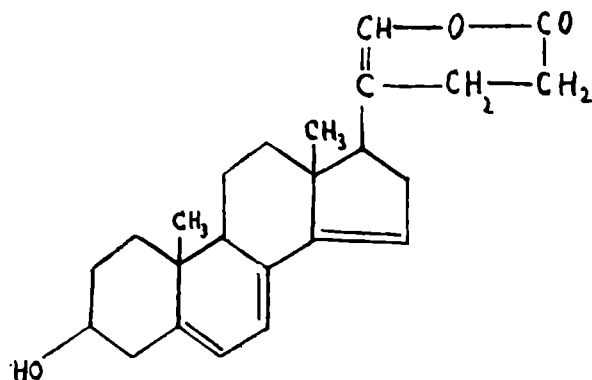
Es en posesión de estos datos que Wieland y Hesse (1935) propusieron para la bufotalina una fórmula - modificada posteriormente - que posea todos esos caracteres, o sea: el esqueleto del hidrocarburo fundamental un ciclo lactónico, dos enlaces etilénicos, un grupo acetoxilo y dos hidroxilos libres, de los cuales hay uno secundario.



**Bufotalina**  
Wieland y Hesse (1935)

En ella este último se colocaba en C<sub>3</sub>, simplemente porque en ese mismo lugar lo poseen el colesterol y otros productos naturales; la doble ligadura se situaba entre C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> porque la hidrólisis de la bufotoxina - que, como veremos más adelante, no es otra cosa que el compuesto que nos ocupa conjugado en el C<sub>5</sub> con la suberilarginina - introduce un enlace etilénico.

En cuanto al otro hidroxilo y al grupo acetoxilo se los ubicaba en C<sub>7</sub> y C<sub>14</sub>, respectivamente, porque ellos, al ser eliminados simultáneamente en la producción de bufotalieno, revelan poseer entre sí una relación de posición 1:3, hipótesis que se veía confirmada porque esta última sustancia es coloreada, lo que indica la presencia de un sistema no saturado conjugado.



Bufotalieno

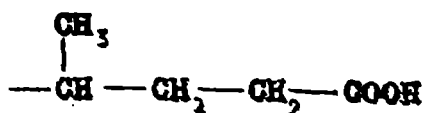
Wieland y Hesse (1935)

En lo que al anillo lactónico respecta, su estudio presenta mayores dificultades, por cuanto resulta bastante difícil abrirlo sin provocar la desnaturalización de su estructura.

Acetilando el bufotalieno para bloquear su hidroxilo, hidrogenándolo e hidrolizando el compuesto formado se obtuvo un isómero del ácido hidroxicolánico, cuya constitución no correspondía, sin embargo, a la de ninguna especie conocida de este grupo.

Como el número de posibles isómeros es grande, tratábase entonces

de disminuirlo, para lo cual fué eliminado el radical hidroxilo, produciéndose un ácido que se denominó isobufocolánico por su similitud con el grupo de los ácidos colánicos, en el que han desaparecido todas las agrupaciones ajenas a la estructura del perhidrociclopentencfenantreno, conservándose tan solo una cadena lateral con un carboxilo en su extremo, que permite suponer cuál ha sido el esqueleto del anillo lactónico.



Cadena lateral del ácido isobufocolánico

Faltaba pues, solamente, fijar la situación del enlace etilénico en dicho grupo y ello se consiguió mediante la ozonización de la bufotalina, que produce ácido fórmico.

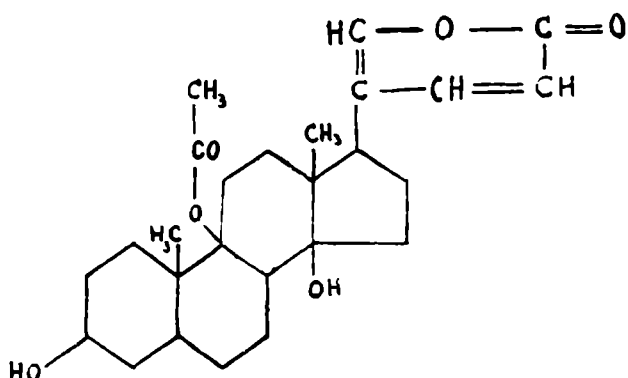
Por otra parte, si bien los productos de hidrólisis son de una labilidad extrema, efectuada ella en presencia de reactivos de aldehidos (hidróxido de plata amoniacal, reactivo de Schiff) acusa la existencia de propiedades reductoras, lo que, de acuerdo a la fórmula enunciada, se interpreta como un equilibrio aldo-ondílico en el producto de la reacción de apertura del anillo lactónico.

Posteriormente, sin embargo, estos mismos investigadores (Wieland, Resse y Hüttel, 1936), basados en el espectro de absorción de la bufotalina, que indica la conjugación de las tres dobles ligaduras, - las dos etilénicas y la unión carbono-oxígeno del ácido lactonizado - y en la producción de ácido glicólico (reacción de Hopkins-Cole) conjuntamente con ácido fórmico, modifican la fórmula de 1935 y concluyen que la bufotalina ha de poseer su par de enlaces no saturados en el heterociclo y que el grupo acetoxilo no puede estar en C<sub>7</sub>, porque, admitiendo la existencia de un hidroxilo en C<sub>4</sub>,



la eliminación de ambos radicales mediante la hidrólisis ácida originaría un nuevo sistema de dobles ligaduras conjugadas, lo que no está de acuerdo con la región ultravioleta del espectro del bufotalieno que, como hemos dicho, es el compuesto así obtenido.

Por lo tanto, proponen para la bufotalina una nueva fórmula en la cual todos los dobles enlaces están ubicados en el ciclo lactónico y el grupo acetoxilo en C<sub>9</sub>, aunque también piensan ellos que podría estar situado en C<sub>5</sub>.



Bufotalina

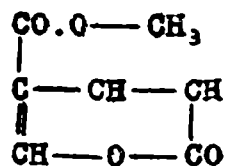
Wieland, Hesse y Hüttel (1936)

Este es, aproximadamente, el método seguido para esclarecer la estructura de la bufotalina, que hemos descripto con cierto detalle por ser ésta una bufagina típica.

Existen, además, algunas otras experiencias basadas en estudios con rayos X y en la comparación del espectro de esta substancia con el de la scillaridina, que es un derivado de uno de los glucósidos de la Scilla maritima, cuya estructura ha sido minuciosamente examinada por A. Stoll y sus colaboradores.

En el caso de la marinobufagina, que veremos en especial en el capítulo correspondiente al B. marinus, el espectro de absorción no sólo resulta idéntico al de la scillaridina, sino también al del cumalinato de metilo

(Tschesche y Offe, 1936), lo cual es tanto más interesante cuanto que esta sustancia, de estructura simple y perfectamente establecida, no posee otros grupos capaces de absorber radiaciones del ultravioleta.

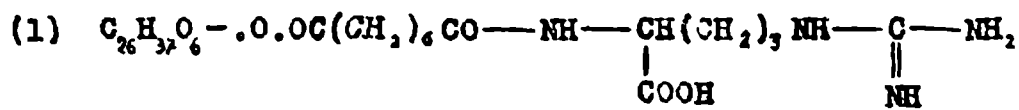


Cumalinato de metilo

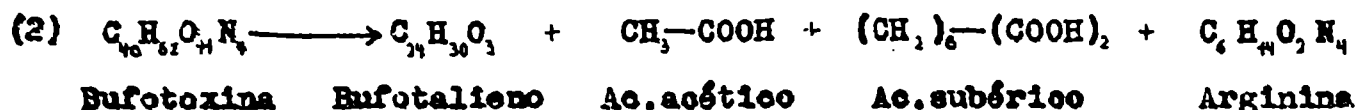
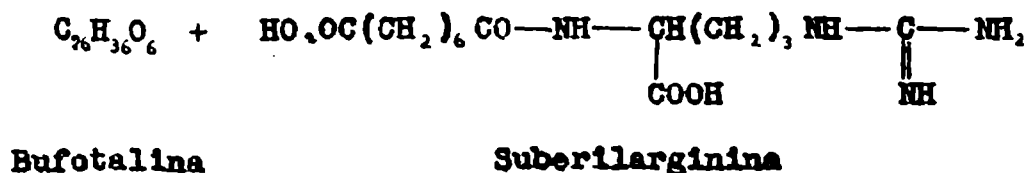
Es interesante observar que el anillo lactónico de dicho éster es también igual al que figura en las fórmulas atribuidas en 1936 a la bufotalina, por Wieland, Hesse y Eüttel, y a la cinobufagina - del B. bufo gargarizans -, por Tschesche y Offe. Nada raro sería, pues, que con ulteriores estudios tal estructura pudiera generalizarse para todas las geninas.

BUFOTOXINAS: Las bufotoxinas son productos más complejos que las bufaginas y, por ese mismo, menos conocidos aunque, según se ha comprobado en el caso de los venenos de algunas especies (B. vulgaris, B. Marinus), su constitución es la de las geninas correspondientes conjugadas con la suberilarginina.

El caso mejor estudiado es el del B. vulgaris, en el cual, como ya lo expresáramos, la suberilarginina parece estar unida en C<sub>5</sub>. Cuando se efectúa la hidrólisis en condiciones muy moderadas se separan realmente bufotalina y suberilarginina, según la reacción (1); mientras que, cuando aquéllas son más severas, hay una descomposición de ambas partes, produciéndose entonces la reacción (2) con formación de bufotalieno, ácido acético y agua, por un lado, y de ácido subérico y arginina por el otro.



Bufotoxina



En el B. gama, la gamabufotoxina, que sólo difiere de la bufotoxina en que no posee el grupo acetoxilo, por hidrólisis produce, además de ácido subérico y arginina, anhidrobufogenina, sustancia que no es idéntica a la bufogenina, pero que puede ser obtenida por tratamiento de ésta con ácido clorhídrico concentrado.

Las bufotoxinas poseen también propiedades cardiotónicas, pero en menor grado que las bufaginas, puesto que la suberilarginina no tiene, en tales casos, más acción que la de diluir la parte activa de la molécula.

Es conveniente expresar aquí que, desde el punto de vista de la aplicación terapéutica, los glucósidos no sólo tienen sobre los productos activos de los venenos de sapos la ventaja de su acción más enérgica, sino también la no menos importante de la persistencia de ésta, lo que probablemente ha de deberse a la existencia de grupos sacáricos.

## F R A C C I O N   B A S I C A

La otra parte de los venenos de sapos cuyo estudio presenta interés es la fracción básica, así llamada porque los productos que la constituyen poseen esa reacción.

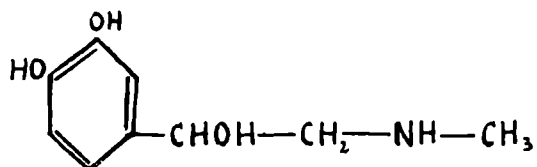
Son ellos, en su mayor parte, derivados de la 5-oxi-triptamina - 5-oxi-indol-2-etilamina -, existiendo además adrenalina, que es el único de los componentes de esta fracción que se encuentra en materiales provenientes de otras clases zoológicas.

Ya hemos señalado el hecho de que las substancias que forman la parte neutra de estos venenos, salvo raras excepciones, son específicas, pudiendo decirse en términos generales que hay una bufagina y una bufotoxina para cada especie de sapo. Las básicas, en cambio no lo son, diferenciándose los diversos bufónidos por la presencia o ausencia de cada una de estas bases.

Por eso su número es pequeño; hasta ahora sólo hay cinco perfectamente identificadas: adrenalina, bufotenina, bufotenidina, dehidrobufotenina y bufotienina, habiéndose señalado también la existencia de otras cuyo cabal conocimiento requerirá un prolongado estudio. Así, Wieland, Konz y Mittasch (1934) obtuvieron, a partir del veneno de B. arenarum, un picrato que funde a 145° y nosotros, del de B. chilensis, hemos preparado otro que lo hace a 127° y que no está citado en la literatura.

Entraremos ahora a tratar en particular cada una de aquéllas bases, reseñando su constitución y propiedades más importantes.

ADRENALINA: La adrenalina, denominada también epinefrina, tiene la fórmula de un derivado de la pirocatequina con una cadena lateral de carácter básico.



Adrenalina

Su presencia, que produce la contracción del sistema vascular periférico, fué descubierta hace ya tiempo en la secreción de la parte medular de las cápsulas suprarrenales de los mamíferos.

En las secreciones de los bufónidos, a los que comunica análogas propiedades, su función nos es desconocida y algo difícil de explicar, pues no sabemos qué papel puede desempeñar en ellas una sustancia semejante a concentración tan elevada. (En las glándulas paratiroideas de un solo ejemplar de B. marinus la cantidad de adrenalina existente es cuatro veces mayor que la que se encuentra en un par de cápsulas suprarrenales humanas).

El mérito de su primer hallazgo en estos venenos corresponde a Abel y Macht que, en los ya clásicos trabajos de 1911, señalaron su presencia en el B. marinus, resultado que posteriormente corroboraron Jensen y Chen (1930, 1936) y Deulofeu y Mendive (1938).

La adrenalina también ha sido encontrada en otras especies de sapos. En el B. arenarum lo fué farmacológicamente por Novaro (1922; 1923), trabajando en el Instituto de Fisiología de Buenos Aires, y, con posterioridad, Deulofeu (1935) y Jensen (1935) realizaron simultáneamente el aislamiento; mientras que en el Ch'an Su fueron Chen, Jensen y Chen (1931; 1932, 1, 2; 1933) quienes, valiéndose de métodos colorimétricos y farmacodinámicos, certificaron su existencia.

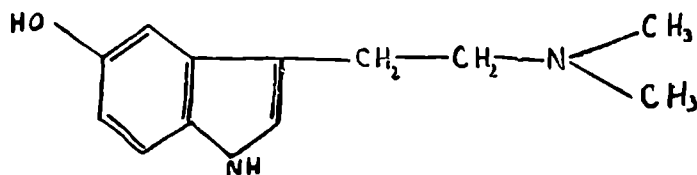
**BUFOTERINA:** Las restantes sustancias de la fracción básica de los venenos de sapos poseen acción vasopresora menos intensa y forman un grupo homogé-

nes de derivados de la triptamina en el cual, como lo expresáramos más arriba, sabemos con certeza de cuatro especies químicas, diferentes pero estrechamente vinculadas entre sí, que reciban el nombre genérico de bufoteninas y que son ya citadas en los trabajos iniciales de Phisalix y Bertrand (1893; 1902).

La bufotenina propiamente dicha es, cualitativa y cuantitativamente, la más importante de estas bases; por una parte ha sido encontrada en todas las especies sudamericanas que han sido objeto de estudio, en gran número de las de los otros continentes y en el Ch'an Su y, por otra, es la más abundante. Partiendo de 50 gr. de veneno de B. marinus, Deulofeu y Mendieta obtuvieron gr. 1,6 de picrato de bufotenina.

Fue aislada primeramente por Handovsky (1920), que logró preparar varias de sus sales cristalizadas, y luego por Wieland, Hesse y Mittasch (1931), que llegaron a asignarle la fórmula  $C_{11}H_{11}O_2N_2$ .

Jensen y Chen (1932), que señalaran la identidad de algunos de los derivados de bases provenientes de diversas especies, demostraron farmacológicamente que la bufotenina guarda cierta relación estructural con la triptamina, lo cual fue ampliamente corroborado por Wieland, Konz y Mittasch (1934) al sintetizarla, estableciendo así definitivamente su fórmula, de la cual la de 1931 parece ser un hidrato.



Bufotenina

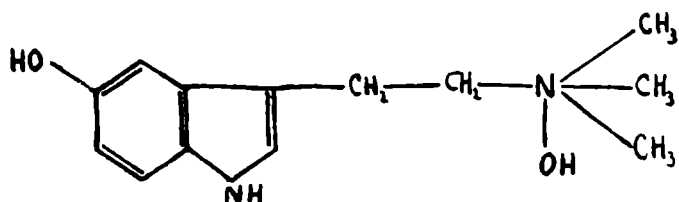
Wieland, Konz y Mittasch (1934)

El método empleado por estos autores para la síntesis de la bufotenina - que es la clave del conocimiento de la fracción básica de estos ve-

nenos - es el que se usa generalmente para la preparación de productos indólicos substituidos, introduciéndose luego la cadena lateral.

Para la caracterización de estas sustancias se suelen emplear numerosos derivados, siendo los más importantes las sales de los ácidos flavianico (2:4 dinitro - 1 naftol - 7 sulfónico) y pícrico, con los cuales la bufotenina: un flavianato de P.F. 130-12, un dipicrato rojo que funde a 177°, un monopicrato amarillo que lo hace a temperatura muy cercana y un monopicrato rojo que, por calentamiento, se transforma en el anterior.

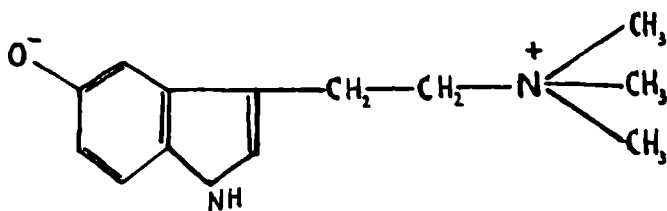
**BUFOTENIDINA:** Paralelamente al estudio de la bufotenina ha progresado el de su base amonio cuaternaria, la bufotenidina, que en 1931 Wieland, Hesse y Mittasch aislaron junto con aquella del veneno de B. vulgaris y cuya estructura ellos (Wieland, Konz y Mittasch, 1934) establecieron por síntesis mediante el tratamiento de la bufotenina con yoduro de metilo y ulterior hidrólisis.



Bufotenidina

Wieland, Konz y Mittasch (1934)

Sin embargo, como este compuesto no es extraíble por éter en medio alcalino y los análisis le asignan una fórmula que se diferencia de la de Wieland en dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno, se interpreta tal hecho como la formación de una betaína entre el hidroxilo de la base cuaternaria y el hidrógeno de la función fenólica y la consiguiente pérdida de agua.



Betaína de la bufotenidina

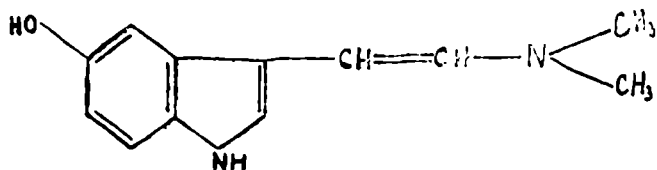
Con el ácido pícrico la bufotenidina sólo da un picrato de color rojo y P.F.1982, siendo posible también obtener un flavianato de la misma coloración que funde a 195-2002.

Esta base sólo presenta relativo interés para nuestro trabajo, pues no ha sido encontrada hasta ahora en el veneno de ninguna de las especies sudamericanas por ninguno de los autores que nos han precedido, habiendo obtenido nosotros idéntico resultado negativo.

**DEHIDROBUFOTENINA:** La dehidrobufotenina es un componente de la fracción básica de los venenos de sapos que sólo se diferencia de la bufotenina en la carencia de dos átomos de hidrógeno, lo que engendra una doble ligadura en la cadena lateral.

Esta estructura se demuestra, en primer lugar, porque una simple hidrogenación catalítica permite obtener bufotenina, cuya constitución es perfectamente conocida, y, además, porque la ozonización produce dimetilamina y ácido fórmico.

A tales resultados se llegó gracias a los trabajos de la escuela de Wieland, pues aunque en 1932 Jensen y Chen obtienen el flavianato de esta base a partir del veneno de B. marinus, es sólo en 1937 que Wieland y Wieland consiguen transformarla en bufotenina y asignarle así la fórmula definitiva.

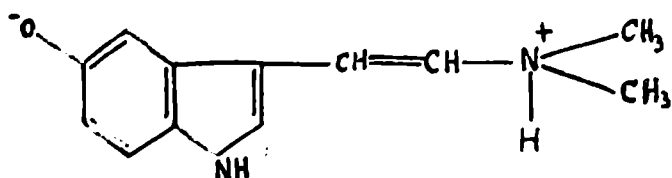


Dehidrobufotenina  
Wieland y Wieland (1937)

Como ocurre con la bufotenidina, la dehidrobufotenina da solamente un derivado con el ácido pícrico, que es una sal de color amarillo y P.F.189; con el flaviánico, en cambio, se obtiene un flavianato rojo que funde a 260-54



Pero la analogía con la base cuaternaria no termina allí; la especie química que nos ocupa no figura tampoco entre las sustancias que el éter extrae en medio alcalina, carácter que obedece, asimismo, a la formación de una betaina entre el nitrógeno amínico y el hidroxilo fenólico.

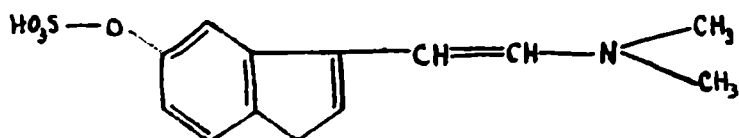


Betaina de la  
dehidrobufotenina

La explicación de este fenómeno debe encontrarse, según toda evidencia, en la disminución de la basicidad de dicho átomo de nitrógeno hasta un grado compatible con la leve acidez de la función fenólica debida, en el caso de la dehidrobufotenina y de la bufotenidina, a la vecindad del enlace etilénico y a la existencia de tres metilos y un hidroxilo, respectivamente, puesto que la bufotenina - que no posee ni uno ni otros - no se betainiza.

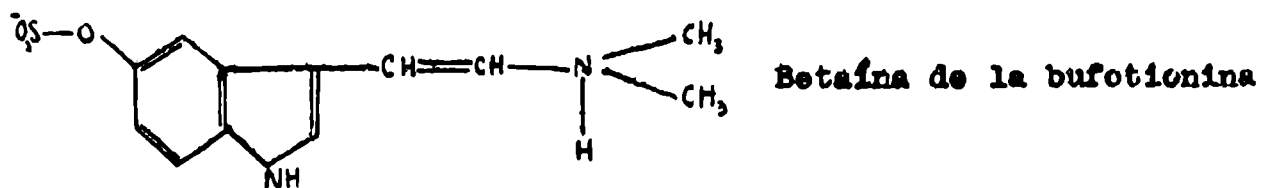
**BUFOTIONINA:** Completa la serie de los derivados de la triptamina esta sustancia, que debe su nombre a la existencia de azufre en su molécula y que, según parece, se encuentra en las pequeñas glándulas de las pieles de los sapos pero no en las paratoides.

Su estructura fué determinada por Wieland y Wieland (1937) merced a la hidrólisis con ácidos diluidos que, al dar ácido sulfúrico y dehidrobufotenina, revela que la bufotionina es el producto de la conjugación de dichas sustancias.



Bufotionina  
Wieland y Wieland (1937)

Como el grupo sulfónico es bastante electronegativo, este compuesto, de igual modo que los dos últimos vistos, se comporta como una betaina por pérdida de agua entre el hidrógeno del grupo citado y el hidroxilo del nitrógeno amínico.

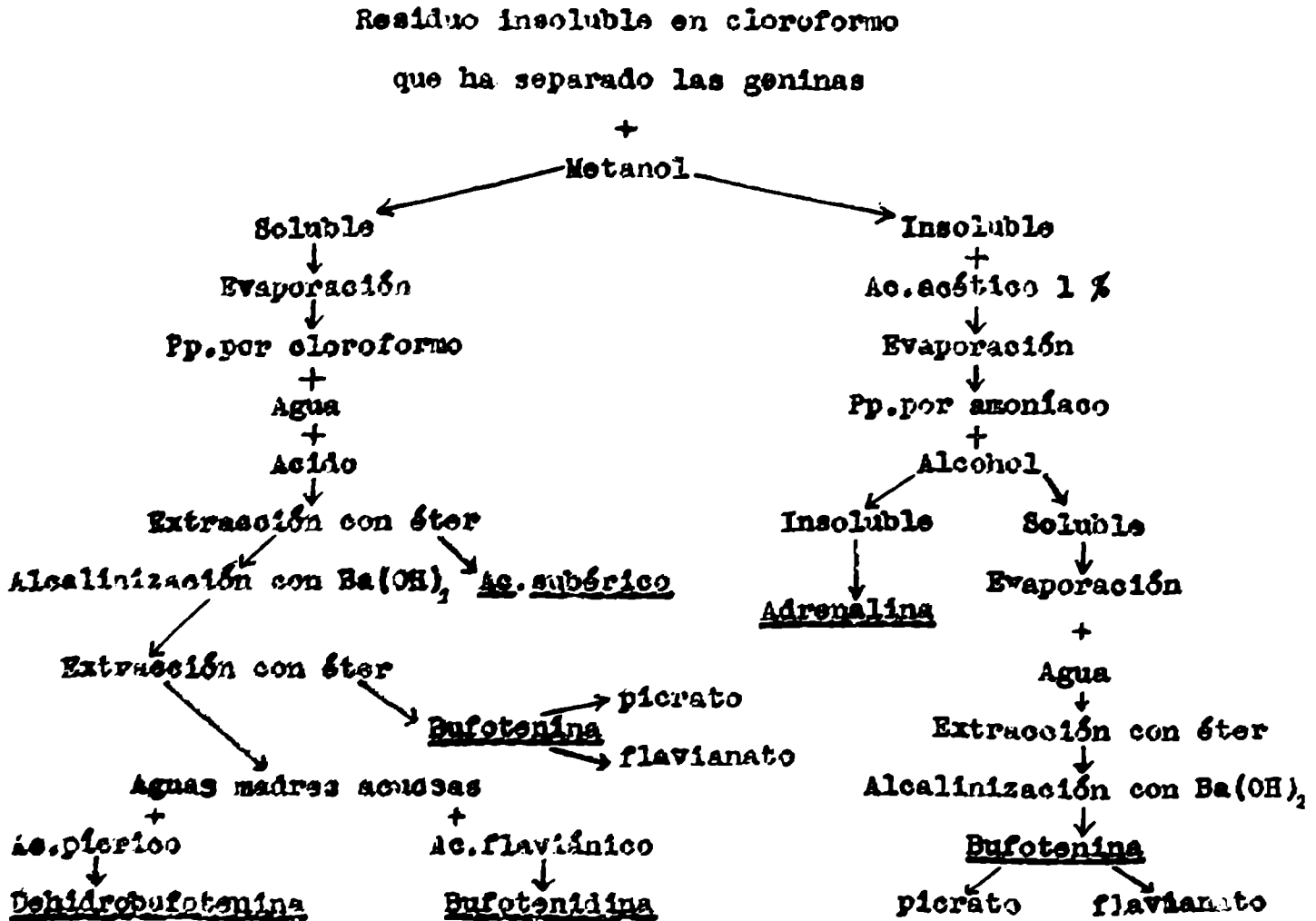


...

Esquema general de separación de la fracción básica de los venenos de sapo:

La separación de los productos básicos enumerados se efectúa mediante una serie de operaciones, que hemos sintetizado en el esquema que figura a continuación a fin de proporcionar una visión de conjunto.

En él, que es de aplicación general a las secreciones de todos los sapos, no figura la bufotionina porque, como ya lo expresáramos, ella se obtiene a partir de los cueros.



Parte especial

-

VENENOS DE SAPOS SUDAMERICANOS

-

## A N T E C E D E N T E S

En América del Sud existen numerosas especies de sapos, pero la falta de estudios sistemáticos completos en muchos países hace difícil su conocimiento exacto.

Sin embargo, sobre los venenos de algunas que aparecen como bien identificadas se han efectuado investigaciones, principalmente en Alemania y Estados Unidos, aunque también se han realizado algunos trabajos en nuestro país y en el Brasil.

Desde el punto de vista que nos interesa, el más estudiado de los sapos sudamericanos es, sin lugar a dudas, el B. marinus - antiguamente llamado B. agua -, especie de gran tamaño que habita principalmente Jamaica y Brasil, de la cual se han ocupado casi todos los autores ya citados, refiriéndose también a ella la primera parte de nuestras experiencias.

En la zona tropical de nuestro país se encuentra el B. paraquenemis - conocido con los nombres de "sapo buey" o "sapo pipa" -, cuyo veneno ha sido estudiado últimamente por Deulofeu y Mendive (1958) en el Instituto Bacteriológico D.N.H. de Buenos Aires, resultando la genina idéntica a la del B. marinus.

Como es éste el primer caso que se conoce de una bufagina no específica, plantéase el problema de establecer debidamente si el B. marinus y el B. paraquenemis son en realidad dos especies diferentes, como lo afirma Lutz, del Instituto Oswaldo Cruz, o si una de ellas es sólo una variedad de la otra, como opinan otros autores y parece indicarlo la composición química de sus venenos.

La especie que más comúnmente se encuentra en la provincia de Buenos Aires, y que es prácticamente la única de esta zona que por su abundancia puede investigarse, es el B. arenarum, cuya secreción fue estudiada farmacológicamente.

gicamente, ya en 1922, por un médico argentino (Novaro).

Pero es recién en 1934 y 1935 que, gracias a los trabajos de Wieland y colaboradores, Jensen y Chen y Deulofeu, se llega a un conocimiento cabal de esta especie, de la cual nos ocupamos también nosotros ahora.

Por último, el que constituye la última parte de nuestras experiencias es un sapo pequeño de Chile, llamado B. chilensis, que la sinonimia zoológica identifica con el B. spinulosus, y que no había sido estudiado hasta el presente.

En resumen, de los venenos de las especies sudamericanas podemos decir que sus fracciones neutras poseen, como era de esperarse, sendas bufoninas específicas, salvo el caso del B. marinus y del B. paracnemis, que tienen ambas una misma. En cuanto a las fracciones básicas, aparte de bases aun no bien identificadas, las respectivas composiciones se expresan en el cuadro adjunto.

EXISTENCIA DE BASES EN VENENOS DE ESPECIES SUDAMERICANAS	Adrenalina	Bufotenina	Bufotenidina	Dehidrobufotenina	Bufetonina
<u>B. marinus</u>	+	+	-	+	-
<u>B. arenarius</u>	+	+	-	+	+
<u>B. chilensis</u>	-	+	-	-	+
<u>B. paracnemis</u>	+	+	-	-	-

## B U F O   M A R I N U S

### Fracción neutra

Como ya lo expresáramos, la parte neutra de los venenos de sapos está compuesta por colesterol que, por ser perfectamente conocido en constitución y propiedades, no presenta mayor interés en este caso, y por bufagina y bufotexina, que son productos específicos de estas secreciones.

El B. marinus no es excepción a tal regla y, como su bufotoxina parece ser la bufagina conjugada con la suberilarginina, el estudio se concentra alrededor de dicha genina, con lo cual se simplifica notablemente.

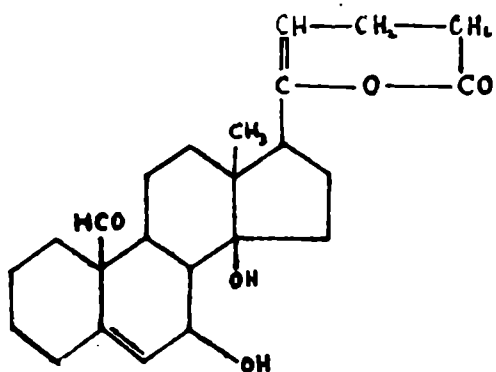
MARINOBUFAGINA: Los primeros investigadores que aíslan la marinobufagina son Abel y Macht, que le asignan un punto de fusión 217-8° y una fórmula mínima  $C_9H_{10}O_2$ .

En 1930 Jensen y Chen toman la cuestión en el estado en que la dejaron estos autores, obtienen nuevamente la sustancia, consiguiendo señalar como posible la fórmula  $C_{28}H_{34}O_6$  mediante repetidos análisis de la misma y de su acetilderivado y consiguiendo un punto de fusión algo más bajo (212-3°).

Dos años después, Jensen, que continuara trabajando en este tema, en base al tratamiento de la bufagina con ácidos y álcalis, que libera una molécula de ácido fórmico, y a la similitud de sus propiedades farmacológicas con las de las agluconas cardíacas en  $C_{23}$ , indica la posibilidad de que se trate del formil-derivado de un compuesto con ese número de carbonos, proponiendo entonces la fórmula  $C_{24}H_{32}O_5$ , que está de acuerdo con los hechos enunciados y con las determinaciones roentgenográficas de estructuras cristalinas efectuadas posteriormente por Miss Crowfoot (1935).

Jensen y Evans (1934) intentan luego fijar la posición de las do-

bles ligaduras en la molécula y proponen como posible la fórmula

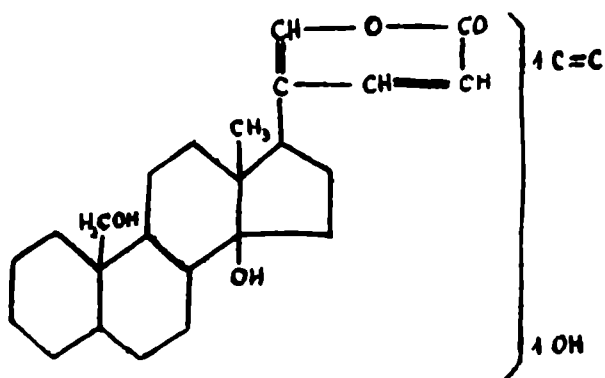


Marinobufagina según

Jensen y Evans (1934)

$C_{24}H_{32}O_5$  (P.M. 400)

Ultimamente, Jensen - según expresa Fieser (1937) en su libro sobre los derivados del fenantreno - considera probable que el grupo del  $C_{10}$  sea  $CH_2OH$  en lugar de  $CHO$ , y que la genina contenga dos hidroxilos terciarios en el  $C_5$  y en el  $C_{14}$ ; y en una corta nota publicada en 1937 el mismo autor, basado una vez más en la hidrogenación de la marinobufagina, admite que esta substancia debe poseer tres dobles ligaduras, de las cuales dos estarían en el ciclo lactónico y una en la parte esteróica de la molécula. Acepta ya como definitiva la existencia de un grupo alcohólico en el  $C_{10}$ , y supone que otro hidroxilo es terciario y está situado sobre el  $C_{14}$ .



Marinobufagina según

Jensen (1937)

$C_{24}H_{32}O_5$  (P.M. 400)

En 1937, Slotte y Neisser, del Instituto Eutanten de San Pablo (Bra

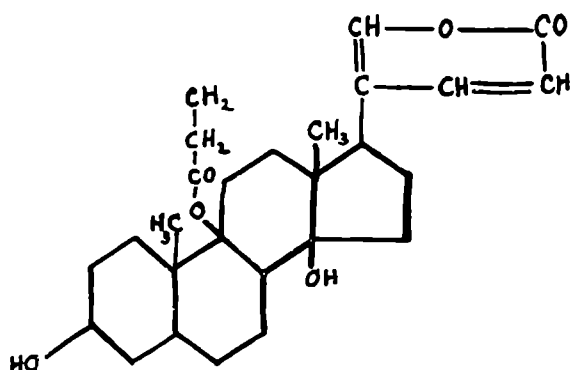


sil), publican un trabajo sobre este veneno cuyas conclusiones difieren en parte de las de quienes se habían ocupado de este tema con anterioridad.

La técnica empleada por dichos investigadores para el aislamiento y purificación de la marinobufagina es similar a la que Wieland utilizó en el estudio del B.vulgaris y va descripta más adelante, en la parte experimental, pues también fué la usada por nosotros en la separación del compuesto que nos ocupa. Consiste, en general, en una serie de recristalizaciones obtenidas de distintos disolventes, complementadas por cromatografías en columnas de óxido de aluminio (Brockmann), método recomendable para la separación de sustancias con propiedades muy cercanas y por eso útil en este caso (Zechmeister y von Cholnoky, 1936).

Por este camino llegaron Slotta y Neisser a obtener la bufagina como una sustancia blanca, bien cristalizada, de P.F. 205,5-208,5<sup>o</sup>, cuya composición centesimal difiere de las consignadas por Abel y Macht y por Jensen y Chen.

Por titulación del grupo lactónico determinaron un peso equivalente de 478, lo que elimina la posibilidad de fórmulas en C<sub>24</sub> cuyos pesos moleculares son cercanos a 400, y atribuyeron a la marinobufagina la siguiente:



Marinobufagina según  
Slotta y Neisser (1937)  
C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub> (P.M. 458)

en la cual un grupo propionilo esterificaría a un hidroxilo terciario, pose-

yendo además otros dos hidroxilos libres, secundario y terciario, respectivamente.

Experiencias personales: Como ya lo anunciáramos (Deulofeu, Duprat y Labriola, 1940), hemos repetido exactamente la técnica de preparación empleada por Slotta y Neisser. Siguiéndola exactamente en la forma que se detalla en la parte experimental, hemos obtenido un producto de P.F. 221-222°, algo superior al señalado en la primitiva memoria de Abel y Macht que, comparado con los otros de la literatura nos da:

Abel y Macht.....	217-218°
Jensen y Chen.....	212-213°
Slotta y Neisser.....	205,5-208,5°
Autor.....	221-222°

Como estas diferencias podían atribuirse a que, durante el tratamiento de purificación, se hubiera eliminado el grupo propionilo supuesto por Slotta y Neisser, solicitamos al Dr. Labriola la determinación de los grupos ácido-volátil empleando el semimicrométodo de Kuhn y Roth, que él ha descrito en la revista del Centro Estudiantes del Doctorado en Química (1937-38), con resultados negativos, siendo negativos asimismo los de una nueva muestra que sólo había sufrido el tratamiento inicial de purificación.

1a. muestra.....	0,99 % de acetilo
2a. muestra.....	0,62 % " " "

Como cada acetilo equivaldría a 8,88 % y cada propionilo a una cifra algo cercana, se ve fácilmente que los datos hallados corresponden a un compuesto que no los posee y, por lo tanto, la marinobufagina tendría libres

todos los hidroxilos de los ciclos.

Acetilmarinobufagina: Jensen y colaboradores acetilaron por vez primera la marinobufagina y obtuvieron un derivado que consideraron como monoacetilado. Slotta y Neiser, por su parte, también admitieron la introducción de un radical acetilo en la molécula de su producto de P.F. 205,5-208,5<sup>2</sup>, cuando trataron a éste con anhídrido acético.

Experiencias personales: Nosotros hemos vuelto a preparar la acetilmarinobufagina, sin dificultad alguna, pero al determinar los acetilos presentes en ella, hemos encontrado con gran sorpresa que las cifras obtenidas acusaban la presencia de dos de dichos radicales.

La operación fué efectuada por calentamiento de la marinobufagina con anhídrido acético, tal como va descripta en la parte experimental, y el producto, tras repetidas recristalizaciones, dió P.F. 229-233<sup>2</sup>.

Los acetilos fueron dosificados por el Dr. Labricla en la misma forma que antes, deduciéndose por diferencia la cantidad esterificada por los hidroxilos libres.

1a. muestra.....	21,15 % de acetilo
2a. muestra.....	18,71 % " " "

Estos datos - especialmente para este método que da cifras algo elevadas y, además, debiendo ser disminuidos en 0,6-1 %, de la substancia original - están muy cercanos a 17,76 %, que corresponde a dos acetilos, no habiendo por lo tanto dudas de que la substancia original presenta dos hidroxilos acetilables, mientras que hasta ahora, tanto Jensen y Evans como Slotta y Neiser, habían considerado como monoacetilado al derivado obtenido, basándose para ello sólo en la determinación de carbono e hidrógeno.

Si en la fórmula  $C_{24}H_{32}O_5$  de la marinobufagina, de Jensen y Evans, introducimos dos acetilos tendremos  $C_{28}H_{36}O_7$  (peso molecular 484), C:69,42 % e H:7,43 %, valores algo más bajos que los hallados por Jensen y Slotka, lo cual hace pensar que quizá tenga razón este último cuando estima que es necesario revisar la fórmula original de la marinobufagina, pero, por otra parte, no puede introducirse grupo acilo alguno en su molécula.

En resumen, podemos decir que la marinobufagina posee el núcleo del perhidrociclopentenofenantreno unido al anillo lactónico de las agluconas cardíacas, existiendo un enlace etilénico en los ciclos y dos hidroxilos acetilables.

Si uno de éstos es el primario que está en el  $C_{10}$  y el otro terciario y, por lo tanto, de difícil acetilación, debemos concluir que el tercer hidroxilo es con seguridad secundario, aunque su posición exacta queda para ser fijada más adelante.

Debemos mencionar también el hecho de que un análisis efectuado sobre una muestra de marinobufagina secada a  $100^{\circ}$  dió C:72,25 % e H:8,07 %, lo cual coincide mejor con la fórmula propuesta por Jensen,  $C_{24}H_{32}O_5$ , que con la de Slotka y Neisser, como lo demuestra el siguiente cuadro:

Jensen: $C_{24}H_{32}O_5$ .....	calculado...	C:72,00 %	H:8,00 %
Slotka y Neisser $C_{27}H_{36}O_7$ "..."	.....	C:70,78 %	H:8,36 %
Encontrado.....	.....	C:72,25 %	H:8,07 %

En cuanto al alto peso molecular calculado por Slotka y Neisser en base a la titulación del grupo lactónico, puede deberse a que la apertura de éste no sea total, lo cual aumentaría el peso equivalente hasta el valor ya indicado.

Parte experimental

MARINOBUFAGINA: En un aparato de Soxhlet se extraen 20 gr. de veneno seco, con cloroformo, hasta completo agotamiento. Se evapora parte del disolvente y se agrega éter de petróleo hasta precipitación total. Evapórase a su vez éste y se recristaliza la bufagina de metanol acuoso. (De aquí se tomó la segunda muestra para dosificar acetilo).

Se disuelve en 40 cc. de acetona y la solución así obtenida se hace pasar por una columna de 22 cm. de óxido de aluminio (Brockmann), en cuya parte superior queda un anillo amarillento, eluyéndose con 40 cc. de cloroformo.

Evapóranse los líquidos que han pasado por la columna (acetona y cloroformo) y los residuos se recristalizan de metanol, con lo cual se obtienen hermosos cristales que funden a 213-5° en ambos casos, por lo cual se juntan, así como también sus aguas madres.

Recristalizase la substancia de alcohol absoluto y se divide en dos porciones: una para la determinación de acetilo y la otra se continúa purificando de acuerdo a la técnica adoptada.

Trátanse las aguas madres con éter absoluto y se agrega éter de petróleo para conseguir mayor precipitado. Como nada de éste se produce, se evapora el disolvente y el residuo se une a la porción de substancia que se va a seguir purificando.

Se disuelve ésta en 10 cc. de acetona y se hace pasar por una columna de 6 cm. de óxido de aluminio (Brockmann) - en la cual reaparece el anillo amarillento - eluyéndose con cloroformo.

Por evaporación de la acetona y del cloroformo quedan abundantes residuos que se disuelven, respectivamente, en 20 cc. y 5 cc. de alcohol absoluto caliente. Luego de filtrar se toma punto de fusión, que resulta ser

218-202.

Se disuelve en 4 cc.de acetona y se hace pasar por un filtro recubierto con óxido de aluminio (Brockmann), en el cual queda una levisima capa amarilla; se lava con 16 cc.de acetona y se vierte con agitación en 60 cc.de agua a 52°, dejando en heladera y finalmente filtrando (P.F.221-222)

<u>Determinación de acetilo:</u>	1a.muestra	2a.muestra
Substancia.....	22,60 mg.....	58,17 mg.
NaOH N/50 gastado.....	0,17 cc.....	0,67 cc.
Acetilo encontrado.....	0,62 %.....	0,99 %

Análisis:

4,827 mg.de substancia dieron: 12,780 mg.de CO<sub>2</sub> y 3,480 mg.de H<sub>2</sub>O.

Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>O<sub>5</sub> .....C:72,00 %.....H:8,00 %

Encontrado.....C:72,25 %.....H:8,07 %

Acetilmarinobufagina: En un tubo de ensayos de 50 cm.de longitud, a cuya boca se adapta otro más delgado que actúa como refrigerante a reflujo, se colocan 250 mg.de marinobufagina (P.F.2122) y 5,5 cc.de anhídrido acético, calentándose dos horas a baño María.

A la solución así obtenida se agregan 50 cc.de agua, agitando para homogeneizar, y se deja 24 horas en heladera, luego de las cuales puede observarse un precipitado blanquecino que se filtra y recristaliza dos veces de alcohol (P.F.220-32). Una tercera lo hace subir a 225-72.

<u>Determinación de acetilo:</u>	1a.muestra	2a.muestra
Substancia.....	20,39 mg.....	9,84 mg.
NaOH N/50 gastado.....	4,44 cc.....	2,42 cc.
Acetilo encontrado.....	18,71 %.....	21,15 %

## B U F O   M A R I N U S

### Fracción básica

En esta fracción ha sido señalada hasta ahora la presencia de tres bases, a saber: adrenalina, bufotenina y dehidrobufotenina.

La de adrenalina fué consignada ya en 1911 por Abel y Macht, en su clásico trabajo sobre la especie que nos ocupa, y corroborada posteriormente por Jensen y Chen en 1930 y 1936 y por Deulofeu y Mendive en 1938.

Son estos mismos autores (Deulofeu y Mendive) los primeros en indicar la existencia de bufotenina en el veneno de B. marinus, pues ni Slotta y Neisser, que poco antes (1937) se ocuparon de él, ni los otros investigadores que anteriormente lo hicieran, la señalaron en ninguna oportunidad.

La dehidrobufotenina, en cambio, había sido aislada de esta especie por Jensen y Chen (1932), que la obtuvieron como flavianato, y por los citados autores brasileños, mientras que Deulofeu y Mendive (1938) no consiguieron encontrarla.

Experiencias personales: De los datos anteriores se deduce que algunos autores habían hallado dehidrobufotenina en el veneno de B. marinus sin encontrar bufotenina (Slotta y Neisser, 1937), mientras que otros, en cambio, habían obtenido esta última pero no la primera (Deulofeu y Mendive, 1938).

Con el deseo de aclarar esta diferencia realizamos un detallado fraccionamiento de la parte básica, habiendo hallado simultáneamente, sobre una nueva muestra, adrenalina, bufotenina y dehidrobufotenina, que fueron debidamente caracterizadas por sus picratos y flavianatos.

La bufotenina y la dehidrobufotenina están tan vinculadas entre sí que no sería difícil que se pudieran transformar una en otra fácilmente y que la preponderancia de una sobre otra o la falta total de alguna de e-

llas se deba a factores fisiológicos que nos son desconocidos.

### Parte experimental

BUFOTENINA: El residuo de la extracción clorofórmica descrita en página 35 se seca, cubre abundantemente con metanol y deja de 6 a 10 días a temperatura ambiente, agitando a menudo.

La extracción se repite una vez más y ambos extractos, evaporados conjuntamente a vacío, dan un residuo que se lleva a sequedad y luego a desecador con ácido sulfúrico, para eliminar totalmente el metanol y toda el agua que éste pudiera contener.

Se redisuelve el residuo en muy poco alcohol absoluto y se le añade cloroformo, dando un precipitado que, redisolto en una pequeña cantidad del primer disolvente se reprecipita con el segundo.

Dicho precipitado vuelve a disolverse, esta vez en agua, y se extrae con éter durante 24 horas en un aparato de Kutscher-Stuedel. La solución acuosa, que es de reacción ácida, se alcaliniza luego con hidróxido de bario, continuándose la extracción durante otras 24 horas.

El éter de la extracción ácida se seca con sulfato sódico y se deja evaporar a temperatura ambiente, dando tan poco residuo que no puede trabajarse.

El de la extracción alcalina, por el contrario, da, por evaporación a presión reducida, un jarabe espeso que se disuelve en 30 cc. de agua ligeramente acidulada con ácido clorhídrico.

Dipicrato: Parte de la solución se trata con 50 cc. de ácido pícrico al 1 %, precipitando dipicrato de bufotenina bajo la forma de hermosos cristales rojos que, recristalizados de agua ligeramente acidulada, funden a 177° (En



la literatura: P.F.174-75<sup>2</sup>).

Monopícrato amarillo: El dipícrato rojo se trata con benzol hirviente que, disolviendo en parte el ácido pícrico, transforma al producto en monopícrato amarillo, el cual, una vez decantado, da un punto de fusión de 175-77<sup>2</sup>. Recristalizado de agua funde a 177<sup>2</sup>. (En la literatura: P.F.178<sup>2</sup>).

Monopícrato rojo: Se recristaliza el dipícrato rojo de una solución de bicarbonato sódico, obteniéndose así monopícrato rojo que, recristalizado, se transforma por calentamiento en el amarillo alrededor de 157<sup>2</sup> y funde a 178<sup>2</sup>.

Flavianato: El resto de la solución al que no se ha agregado ácido pícrico se trata por solución de ácido flaviánico, que da 0,5 gr. de hermosos cristales rojos los cuales, recristalizados varias veces de agua, funden a 132<sup>2</sup>. (En la literatura: P.F.130-31<sup>2</sup>).

DEHIDROBUPOTENINA: La capa acuosa de la extracción etérea alcalina, tratada con solución de ácido pícrico, produce un precipitado obscuro y sucio que se recristaliza de agua y de alcohol de 90<sup>2</sup> y que, una vez seco, toma color amarillo sucio.

Pícrato: Filtrando, dejando secar y recristalizando varias veces de alcohol se obtienen 10 mg. de cristales amarillo-oscuros de pícrato de dehidrobupotenina que funden a 185<sup>2</sup>. (En la literatura: P.F.189<sup>2</sup>).

Flavianato: Se disuelve parte de ese pícrato en agua ligeramente acidulada, se extrae con éter hasta pérdida del color amarillo, se concentra la solución acuosa casi hasta sequedad y se añade ácido flaviánico, que produce la precipitación de cristales rojos de flavianato de dehidrobupotenina, los cuales

funden a 260-65<sup>2</sup> con descomposición. (En la literatura: P.F.260-65<sup>2</sup>).

ADRENALINA: La parte que el metanol no disuelve (véase página 38) se deja secar y se trata con 110 cc. de ácido acético al 1 %, formando una papilla que se deja dos días en reposo y se trata con 500 cc. de alcohol, con lo cual se consigue la precipitación de la parte proteica, que se separa por centrifugación.

El líquido acuoso-alcohólico se evapora a presión reducida hasta eliminar todo el alcohol (hasta unos 50 cc.). Se añade entonces gota a gota una solución de acetato básico de plomo, que produce ligera turbidez, continuando hasta que no se la observe más por nuevos agregados de dicha solución.

Para eliminar el plomo se centrifuga y se hace pasar una corriente de ácido sulfhídrico. Al precipitar el sulfuro de plomo queda una solución muy límpida que se evapora hasta 3-5 cc., se coloca en un tubo de centrífuga y se alcaliniza con amoníaco hasta viraje del azul de timol.

Obtiénese en esta forma un precipitado pastoso que se deja 24 horas en heladera. Se decanta la solución acuosa y se le añade, lentamente y con agitación, alcohol de 96<sup>2</sup> que disuelve la pasta, con lo cual quedan cristales blancos de adrenalina (P.F.215<sup>2</sup>, calentamiento rápido) que, una vez secos, dan un peso de 24 mg.

La adrenalina así obtenida se purifica por disolución en alcohol-ácido acético y reprecipitación con amoníaco (P.F.217<sup>2</sup>, calentamiento rápido).

Evapórase la solución alcohólica de la pasta y se añade un poco de agua acidulada, que la disuelve y de donde se extrae con éter. Alcalinízase con hidróxido de bario y se sigue extrayendo en la forma indicada.

La extracción ácida no deja residuo apreciable, en tanto que la alcalina da una pasta, que se disuelve en agua ácida, y de la cual se pueden preparar, en forma similar a la ya indicada, dipicrato y flavianato de bufotenina, caracterizados por sus puntos de fusión y mezcla con los anteriormente obtenidos.

- - -

## B U F O    A R E N A R U M

### Fracción neutra

ARENobufagina: El estudio químico de la secreción del B.arenarum fué iniciado por Chen, Jensen y Chen (1933) que, además de colesterol y de otros productos que se consignan más adelante, aislaron una genina (arenobufagina) de P.F.220<sup>2</sup> (corregido), a la cual atribuyeron la fórmula  $C_{25}H_{34}O_6$ .

Jensen (1935), que prosiguiera estas investigaciones, confirmó los datos enunciados y los amplió, anunciando la determinación de un grupo acetilo en la molécula de la arenobufagina y la preparación de diversos derivados.

Sin embargo, algunos resultados que Wieland comunicara privadamente a Deulofeu y que éste mencionara en una conferencia pronunciada en Montevideo (1940), difieren bastante de los de Jensen, pues el autor alemán manifiesta haber aislado, de los cueros de B.arenarum, una genina que funde a 250<sup>2</sup>.

Experiencias personales: Con el deseo de aportar nuevos elementos de juicio a la resolución de este problema realizamos algunos ensayos (Deulofeu, Duprat y Labriola, 1940) que nos permitieron obtener una bufagina de P.F.231-33<sup>2</sup> y fórmula  $C_{24}H_{32}O_6$ , que no reveló la presencia de acetilos (menos de 1 %) en su molécula.

Era evidente, pues, que nuestros resultados habían complicado aún más la cuestión, en lugar de aclararla, puesto que los puntos de fusión consignados para la arenobufagina eran ya tres, en lugar de dos, y, en contra de lo manifestado por Jensen, no se había constatado en ella la presencia de acetilo alguno.

Como poseíamos una apreciable cantidad de secreción (60 gr.) y

cerca de 1.000 cueros de B.arenarum resolvimos insistir en el aislamiento y purificación de la genina, usando el método que se describe en la parte experimental y que, salvo pequeños detalles, es idéntico al empleado en el caso de la marinobufagina.

En esa forma conseguimos obtener unos pocos miligramos de una sustancia cristalina e incolora, cuyo punto de fusión (248-50°) coincide prácticamente con el registrado por Wieland. Los análisis realizados sobre ella y sobre una muestra algo más impura parecen atribuirle la fórmula  $C_{26}H_{34}O_6$ .

En resumen, de los diversos puntos de fusión consignados hasta ahora, que son los siguientes:

Chen, Jensen y Chen.....	220°
Wieland.....	250°
Deulofeu, Duprat y Labriola.....	231-33°
Autor.....	248-50°

podemos decir que se deduce la existencia indudable de una arenobufagina que funde a 250°, dado que la diferencia entre nuestro dato y el de Wieland carece de significado y que el consignado anteriormente por nosotros debe obedecer a una deficiente purificación, que no es rara, puesto que elevar la temperatura de fusión por arriba de 232° es tarea bastante difícil, que exige por lo menos una cromatografía y numerosas recristalizaciones, en las que se pierde gran cantidad de material.

En lo que respecta a la marcada divergencia que existe entre estos datos y el de Chen, Jensen y Chen preferimos no abrir juicio por ahora y dejar a trabajos ulteriores el establecer las causas que la motivan.

Debemos agregar que el contenido en acetilo del producto de punto

de fusión 248-50° resultó inferior a 1 %, lo cual indica ausencia de tales radicales en la molécula de la genina.

Acetilarenobufagina: Jensen (1935), tratando la arenobufagina de P.F.220° con anhídrido acético a baño maría preparó un derivado monoacetilado de P.F. 162-63°.

Experiencias personales: Nosotros, empleando el método que va descripto en la parte experimental, hemos acetilado una muestra algo impura de P.F.225°, obteniendo un producto que funde a 246-48° y contiene 18,1 % de acetilo, es decir, dos grupos acetilo por molécula (Calculado para  $C_{28}H_{32}O_6$ : 18,2 % de acetilo), lo que indica la existencia de dos hidroxilos, posiblemente secundarios, en la arenobufagina original.

ARENobufOTOXINA: Chen, Jensen y Chen (1933) encontraron en la secreción del B. arenarum un compuesto de P.F.194-95° y fórmula  $C_{25}H_{34}O_6 \cdot C_{14}H_{26}O_5 N_4$ , que no es otra cosa que la bufotoxina correspondiente a esta especie.

Experiencias personales: De los restos de preparación de la arenobufagina pudimos aislar una pequeña cantidad de una substancia que se presenta bajo el aspecto de pequeñas esferas formadas por finas agujas de P.F.198° y que corresponde a la bufotoxina hallada por los investigadores mencionados, aunque el análisis de su contenido en nitrógeno está más de acuerdo con la fórmula:  $C_{24}H_{32}O_6 \cdot C_{14}H_{24}O_4 N_4$  que con la que le atribuyeron los autores americanos.

### Parte experimental

ARENobufAGINA: Se muelan finamente 55 gr. de secreción seca y se extraen en un aparato de Soxhlet durante 30 horas con cloroformo al cual se ha quitado

el alcohol que pudiera contener mediante 2 o 3 lavados con su propio volumen de agua, desecación con carbonato de potasio anhidro y ulterior destilado, a fin de que los productos básicos del veneno no sean también extraídos. Sin embargo, una pequeña parte de éstos es arrastrada en forma de partículas negruzcas de consistencia alquitranosa.

La muestra se coloca en desecador y vuelve a ser tratada en la misma forma durante 6 horas con una nueva porción de disolvente, con lo cual se la considera totalmente agotada.

Ambas fracciones se unen y, luego de evaporadas y desecadas, se las redissuelve en un pequeño volumen de cloroformo y se les agrega éter de petróleo hasta completa precipitación de una masa pastosa que, luego de unas 24 horas de reposo, vuélvese friable.

El precipitado se disuelve en 55 cc. de acetona exenta de agua, se cromatografía por una columna de 10 cm. de alto y 1 cm. de diámetro de óxido de aluminio (Brockmann) - en la cual queda un anillo parduzco - y se eluye finalmente con cloroformo.

Se evapora la acetona y el residuo seco se disuelve en alcohol, filtra, concentra y deja en heladera, con lo cual precipita la arenobuagina, que se cristaliza de alcohol.

Las aguas madres dan, por evaporación parcial, fracciones más impuras que se purifican disolviéndolas en acetona y cromatografiándolas por el método ya empleado, luego de lo cual se las recrystaliza varias veces de acetona, llegando así a obtener una porción muy pequeña que funde a 248-508.

En las recrystalizaciones hemos preferido emplear acetona en lugar de alcohol - que es el disolvente usado en el caso del E. marinus y del E. chilensis - porque, siendo la genina menos soluble en aquélla que en éste, se pierde menor cantidad de material en las aguas madres.

Análisis:

Calculado para $C_{26}H_{34}O_6$ .....	C:70,59 %	H:7,69 %
Muestra N <sup>o</sup> 1... (P.F.248-50 <sup>o</sup> ).....	C:70,60 %	H:7,86 %
Muestra N <sup>o</sup> 2... (P.F.248-50 <sup>o</sup> ).....	C:70,55 %	H:7,88 %
Muestra N <sup>o</sup> 3... (P.F.247-48 <sup>o</sup> ).....	C:70,57 %	H:8,04 %
Muestra N <sup>o</sup> 4... (P.F.247-48 <sup>o</sup> ).....	C:70,47 %	H:7,91 %

Determinación de aceto:

Substancia.....	25,60 mg.
NaOH N/20 gastado.....	0,10 cc.
Aceto encontrado.....	0,84 %

Acetilarenobufagina: En un tubo de ensayos se colocan 110 mg. de arenobufagina de P.F.225<sup>o</sup> y se les agrega 1,1 cc. de piridina y 1,1 cc. de anhídrido acético, con lo cual se obtiene una solución incolora que se deja 24 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido este plazo se añaden 11 cc. de agua, produciéndose un precipitado blanco, amorfo que, después de tres recristalizaciones de alcohol-agua, acusa P.F.246-8<sup>o</sup>.

Determinación de aceto:

Substancia.....	20,47 mg.
Na OH N/20 gastado.....	1,75 cc.
Aceto encontrado.....	18,1 %

ARENobufOTOXINA: La solución clorofórmica residual de la preparación de las fracciones básicas (véase página 49) fué evaporada, disuelta en alcohol y precipitada con éter; repitiéndose tres veces el tratamiento.

La porción insoluble en éter, que da una intensa reacción de argi-



nina (Reacción de Sakaguchi), fué disuelta en alcohol de 30 % y dejada en heladera, precipitando así un residuo pastoso que se redisolvió en alcohol de 20 % y dejó precipitar nuevamente.

Las operaciones se repitieron varias veces con el añadido de carbón activo hasta que se obtuvo un precipitado incoloro que se continuó reprecipitando de alcohol de 20 %, llegando un momento en que el sólido se presentó bajo la forma de rosetas constituidas por finas agujas que, en una oportunidad en que se depositaron sin agruparse, fueron filtradas y secadas con acetona, dando P.F. 198°.

Análisis:

5,265 mg. de substancia dieron: 0,358 cc. de  $N_2$  a 18° y 766 mm.

Calculado para  $C_{24}H_{32}O_6 \cdot C_{14}H_{24}O_4 N_4$  ..... N: 7,49 %

Encontrado (corregido) ..... N: 8,03 %

- - -

## B U F O    A R E N A R U M

### Fracción básica

Según los resultados obtenidos hasta el presente, de todas las especies sudamericanas, es el B. arenarum el que posee una fracción básica más compleja en su veneno; pues en ella ha sido señalada la existencia de cuatro de las cinco bases que se dan como corrientes en estos materiales, a más de una quinta de constitución desconocida.

Así, Chen, Jensen y Chen ( 1933 ), en su trabajo ya citado, consignan el hallazgo, en la secreción de este sapo, de dos bases caracterizadas por sus flavianatos de P.F. 130-31<sup>2</sup> y 265<sup>2</sup>, a las que denominan arenobufoteninas A y B, tratándose, evidentemente, de bufotenina y dehidrobufotenina.

Poco después, estudiando el material proveniente de cueros, Wieland, Konz y Mittasch (1934), sin ocuparse para nada de la fracción neutra, confirman la presencia de dichas bases, señalan la existencia de otra cuyo picrato funde a 145<sup>2</sup> y consiguen aislar la substancia sulfurada que Wieland y Vocke (1930) descubrieran en el B. gama y denominaran bufotionina.

Por último, en 1935, Deulofeu entre nosotros y Jensen en E.E.U.U., demuestran sin lugar a dudas la presencia de adrenalina en la secreción del B. arenarum, que ya había sido señalada por Novaro (1922) en base a pruebas farmacológicas.

Experiencias personales: Nosotros, usando el método corriente, confirmamos una vez más la presencia de bufotenina; mientras que, de las aguas madres concentradas, obtuvimos en una oportunidad un picrato de P.F. 185-88<sup>2</sup>, caracterizado como de dehidrobufotenina por transformación en un flaviante de punto de fusión 260-62<sup>2</sup>, que suponemos idéntico al aislado por los investigadores que nos precedieran.

Por otra parte, trabajando con cueros, conseguimos obtener una apreciable cantidad de bufotionina.

### Parte experimental

La parte no extraída por el cloroformo se deja secar al aire y se cubre con metanol durante unos 20 días, agitando algunas veces. Se renueva el disolvente y, luego de dejarlo otros 10 días más, se filtra y ambas fracciones se evaporan conjuntamente a sequedad.

Al residuo así obtenido se le agrega alcohol absoluto, que no lo disuelve totalmente; se calienta y, cuando la parte no disuelta se encuentra en suspensión se añade cloroformo, que produce un precipitado amorfo. Se deja reposar y al día siguiente se decanta. (Las aguas madres clorofórmicas se someten al proceso indicado en página 46 para el aislamiento de la arenobufotoxina).

Repetida la operación, se disuelve el precipitado en agua y se lo extrae con éter durante 18 horas en un aparato de Kutscher-Stuedel, obteniéndose así una fracción etérea que no deja prácticamente ningún residuo al ser evaporada.

La solución acuosa se alcaliniza con hidróxido de bario y continúa extrayendo durante otras 18 horas, luego de lo cual se decanta.

Tanto la capa acuosa, cuyo bario se elimina con ácido sulfúrico; como la etérea, que se evapora dejando un residuo que se redisuelve en agua acidulada, son divididas en diversas porciones que se tratan con ácidos pícrico y flaviánico dando, en varios casos, precipitados rojos muy sucios que quizá sean de bufotenina.

BUFOTENINA: Las partículas de consistencia alquitranosa que fueran arrastra-

das en la extracción clorofórmica (véase página 45) se decantan y disuelven en alcohol, obteniéndose así una solución que se evapora a sequedad.

Picrato: El residuo, redissuelto en agua, se divide en dos porciones. A una de ellas se le añade solución saturada de ácido pícrico, produciéndose así un precipitado rojo de picrato de bufotenina que, recristalizado varias veces de agua acidulada, funde a 172°. (En la literatura: P.F.177°).

Flavianato: A la otra porción, en cambio, se le agrega ácido flaviánico, obteniéndose un precipitado rojo de flavianato de bufotenina que se somete a varias recristalizaciones de agua acidulada (P.F.125°). (En la literatura: P.F.130-31°).

DEHIDROBUFOTENINA: En una de las oportunidades en que se realizó el tratamiento de los productos básicos según el método descrito, de la fracción acuosa que había sufrido ambas extracciones etéreas (ácida y alcalina) logróse la precipitación de un picrato de dehidrobufotenina, de color amarillo y punto de fusión 185-88°. (En la literatura: P.F.189°).

BUFOTIONINA: Los cueros de B.arenarum fueron cubiertos con alcohol de 96° durante dos períodos de 15 días cada uno, luego de lo cual juntáronse los extractos, que fueron evaporados a sequedad.

El residuo fué disgregado en el seno de éter de petróleo para disolver las sustancias grasas, decantado y tratado con alcohol, donde se disolvió parcialmente. Quedó así insoluble la bufotionina, que fué filtrada, sometida a la acción de carbón activo y recristalizada varias veces de agua, dando cristales que se descomponen a 242° y funden a 254° con desprendimiento de gases.

## B U F O   C H I L E N S I S

### Fracción neutra

Experiencias personales: Sobre el veneno de B. chilensis que, como ya lo expresáramos, es una especie corriente en algunas regiones de Chile, no había sido realizado hasta ahora trabajo alguno.

El nuestro - efectuado con productos provenientes de las glándulas y de cueros secos - tiene forzosamente el carácter de preliminar, dado que la cantidad de material de que se dispuso era pequeña y la genina en cuestión resultó difícil de purificar y recrystalizar.

CHILENOBUFAGINA: Del veneno exprimido pudimos aislar una substancia cristalina, libre de nitrógeno, de P.F. 223-242, que admitimos sea la bufagina correspondiente (chilenobufagina), a la cual los análisis efectuados asignan una fórmula  $C_{29}H_{34}O_6$ .

Esa misma carencia de material, a que hacemos referencia, hizo fracasar todas las tentativas realizadas para aislar una bufotoxina, aunque pudimos obtener una pequeña cantidad de ácido subérico que, como se sabe, es uno de los habituales componentes de esta clase de productos.

### Parte experimental

CHILENOBUFAGINA: El veneno obtenido por expresión de las glándulas es finalmente pulverizado y secado al vacío, vuelto a pulverizar y extraído con cloroformo en un aparato de Soxhlet durante 24 horas, luego de lo cual se lo saca, pulveriza y extrae nuevamente.

El extracto cloroformico se evapora hasta pequeño volumen y se precipita con éter de petróleo de punto de ebullición bajo, obteniéndose una

substancia amorfa, sólida e incolora. El precipitado, bien seco, se disuelve totalmente en acetona, haciéndose pasar la solución por una columna de óxido de aluminio (Brookmann) y recogándose dos porciones: La acetona que pasa directamente y la empleada para lavar la columna una vez que ha terminado de atravesarla la solución primitiva.

Ambas fracciones se evaporan y dan un residuo incoloro sólido que se disuelve fácilmente en muy poco cloroformo purificado. Se añade éter etílico absoluto y, en ambos casos, precipita un sólido blanco, todavía amorfo.

Se lo vuelve a secar y disolver en cloroformo y se le añade éter, poco a poco, hasta turbidez, obteniéndose de las dos fracciones cristales idénticos que funden a 219-20<sup>o</sup> y que, como tienen las mismas características y no dan depresión en su punto de fusión cuando se los mezcla, se juntan para trabajarlos ulteriormente. Una buena cristalización sólo se logra si la solución cloroformica es algo diluida; las soluciones concentradas dan precipitados incoloros y sólidos, pero amorfos.

Esta operación se repite dos veces, volviéndose la fracción cristalina cada vez más insoluble en cloroformo, por lo cual las últimas recristalizaciones se efectúan de alcohol, al cual se añade luego éter absoluto y, finalmente, éter de petróleo de bajo punto de ebullición, hasta que la turbidez sea permanente. Se obtienen así cristales prismáticos, incoloros, solubles en alcohol y cloroformo, poco en éter e insolubles en éter de petróleo y agua. Funden a 223-24<sup>o</sup> y dan una reacción de Liebermann-Burchard azul, que pasa pronto a verde.

#### Análisis:

La muestra: 5,182 mg. de substancia dieron 13,030 mg. de CO<sub>2</sub> y 3,860 mg. de H<sub>2</sub>O.

2a. muestra: 5,158 mg. de substancia dieron: 12,980 mg. de  $\text{CO}_2$  y 3,790 mg. de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{O}_6$ .....	C:68,92 %	H:8,15 %
Muestra N <sup>o</sup> 1.....	C:68,93 %	H:8,03 %
Muestra N <sup>o</sup> 2.....	C:68,60 %	H:8,47 %

ACIDO SUBERICO: El extracto etéreo ácido de una partida de cueros de la cual se obtuvieron bufotionina y bufotenina (véase página 55) dió, por evaporación, un residuo del que pudo separarse una pequeña cantidad de ácido subérico, que fué identificado porque, después de varias recristalizaciones de agua, acusó P.F.  $140^{\circ}$  y no dió depresión en el mismo por mezcla con una muestra auténtica.

- - -

## BUFO CHILENSIS

### Fracción básica

Experiencias personales: El residuo de la separación de la bufagina (véase página 51) fué cuidadosamente fraccionado por medio de la marcha general que hemos indicado en página 25, pero no se consiguió la caracterización de ningún producto.

En este sentido tuvimos mayor éxito al trabajar los cueros secos, pues en la parte que corresponde a los componentes básicos pudimos establecer sin ninguna duda la existencia de bufotenina, identificada como picrato y flavianato, así como también obtener una considerable cantidad de bufotio-  
nina.

Por otra parte, de las aguas madres de esta preparación, aislamos una nueva base que da una neta reacción indólica de Adamkiewicz-Hopkins y cuyo picrato funde a  $127^{\circ}$ ; pero se la encuentra en tan pequeña cantidad que su caracterización ha de resultar difícil.

### Parte experimental

El residuo de la extracción clorofórmica fué sometido al tratamiento metílico y a todo el fraccionamiento detallado en página 25 y, sin embargo, en ninguna de las fracciones pudo aislarse una base, ni como picrato ni como flavianato.

La extracción de las pieles se realiza dejándolas con alcohol de  $96^{\circ}$  durante unos 15 días y destilando el extracto. El residuo, casi un jarabe, se filtra y da una porción insoluble que, recristalizada de alcohol, produce colesterol.

El jarabe, concentrado nuevamente y tratado con un poco de alcohol



absoluto vuelve a dar dicha substancia. Se evapora de nuevo la solución casi a sequedad y se trata con éter de petróleo, que provoca la formación de un precipitado. El disolvente se renueva a menudo y sus soluciones evaporadas dan colesterol. Todas las fracciones de este producto se caracterizan por punto de fusión y punto de fusión mezcla.

La porción insoluble en éter de petróleo se disuelve en un poco de alcohol y se vuelca en abundante agua helada. Una parte insoluble precipita de inmediato y se produce a veces una suspensión coloidal. Cuando así ocurre se filtra el precipitado grueso y se concentra luego a vacío, con lo cual suele romperse la suspensión coloidal y hacerse filtrable. El filtrado se evapora parcialmente y extrae - previa acidificación, si no estuviera primitivamente ácido - con éter en un aparato continuo.

Evaporado el disolvente, el residuo que queda es prácticamente nulo por lo cual se lo desecha.

**BUFOTENINA:** La solución acuosa se alcaliniza con hidróxido de bario y se extrae de nuevo con éter. De esta porción se aísla bufotenina, que se caracteriza como picrato y flavianato siguiendo la técnica corriente (véase página 38).

**BASE INDOLICA:** De las aguas madres, después de eliminar el bario con ácido sulfúrico y concentrar, no se aisló ningún flavianato, pero sí un picrato de P.F. 127<sup>2</sup>, que es <sup>de</sup> una base indólica, pues da una reacción de Adamkiewicz-Hopkins positiva, pero que está presente en tan pequeña cantidad que no admite por el momento un mayor estudio.

**BUFOTIIONINA:** Una nueva partida de cueros (aproximadamente 600) fué extraída con alcohol de 96<sup>2</sup> en la forma habitual, repitiéndose la operación y eva-

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

Nuestras experiencias y las conclusiones que de ellas se derivan pueden ser resumidas en la siguiente forma:

### BUFO MARINUS:

1<sup>a</sup>).-Hemos sometido a la marinobufagina a un proceso de purificación, habiéndola hallado concordante con la fórmula de Jensen  $C_{21}H_{32}O_5$  y con un punto de fusión 221-22<sup>a</sup>.

2<sup>a</sup>).-Por acetilación de la marinobufagina hemos obtenido un derivado de P.F.225-27<sup>a</sup>, que resulta ser diacetilado, en contra de la opinión hasta ahora admitida que lo da como monoacetilado.

3<sup>a</sup>).-De la fracción básica hemos aislado y caracterizado bufotamina, dehidrobufotenina y adrenalina.

### BUFO ARENARUM:

1<sup>a</sup>).-La ulterior purificación de la arenobufagina de P.F. 231-33<sup>a</sup> y fórmula  $C_{24}H_{36}O_6$ , ha permitido separar una fracción de P.F.248-50<sup>a</sup> que, al igual que aquélla, no contiene grupos acetilo y responde, en cambio, a una fórmula  $C_{26}H_{34}O_6$ .

2<sup>a</sup>).-Por acetilación de la arenobufagina hemos obtenido un derivado de P.F.246-48<sup>a</sup>, que también es diacetilado, lo que indica la presencia de dos hidroxilos, probablemente secundarios, en la molécula de la arenobufagina.

3<sup>a</sup>).-Hemos aislado arenobufotoxina de P.F.198<sup>a</sup>, cuyo contenido en nitrógeno está de acuerdo con el de la fórmula  $C_{24}H_{32}O_6 \cdot C_{14}H_{24}O_4N_4$ , o sea la arenobufagina de P.F.231-33<sup>a</sup> condensada con la suberilarginina.

4<sup>a</sup>).-En la fracción básica hemos caracterizado bufotenina, dehidrobufotenina y bufotionina.

porando conjuntamente ambos extractos a sequedad.

El residuo fué tratado primeramente con éter de petróleo, que disuelve el colesterol, y luego con alcohol, quedando un resto insoluble que se recristalizó varias veces de agua, resultando ser bufotionina, que se descompusó a 235° y fundió a 246° con despreñamiento de gases.

De esta partida pudo aislarse nuevamente bufotenina, procedente de la extracción etérea alcalina, en la forma habitual.

- - -

**BIBLIOGRAFIA**

- ABEL J. J. y MACHT D. I. (1911, 1). - J. Amer. Med. Assoon., 56, 1531.
- ABEL J. J. y MACHT D. I. (1911, 2). - J. Pharmacol., 3, 319.
- CROWFOOT D. (1935). - Chemistry and Industry, 54, 568.
- CHEN K. K. y CHEN A. L. (1933, 1). - J. Pharmacol., 49, 514.
- CHEN K. K. y CHEN A. L. (1933, 2). - J. Pharmacol., 49, 543.
- CHEN K. K., JENSEN H. y CHEN A. L. (1931). - Am. J. Physiol., 97, 511.
- CHEN K. K., JENSEN H. y CHEN A. L. (1932, 1). - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 29, 905, 907.
- CHEN K. K., JENSEN H. y CHEN A. L. (1932, 2). - Am. J. Physiol., 101, 20.
- CHEN K. K., JENSEN H. y CHEN A. L. (1933). - J. Pharmacol., 49, 1, 14, 26.
- DEULOFEU V. (1935). - Z. Physiol. Chem., 237, 171.
- DEULOFEU V. (1940). - An. Asoc. Quim. Farm. Urug., 43, 30.
- DEULOFEU V., DUPRAF E. y LABRIOLA R. (1940). - Nature, 145, 671.
- DEULOFEU V. y MENDIVE J. R. (1938). - Ann., 534, 288.
- FIESER L. F. - The chemistry of natural products related to piperantrene, 302, 422. New York, 1937.
- HANDOVSKY H. (1920). - Arch. Exptl. Path. Pharmacol., 86, 138.
- JENSEN H. (1935). - J. Am. Chem. Soc., 57, 1765.
- JENSEN H. (1937). - J. Am. Chem. Soc., 59, 767.
- JENSEN H. y CHEN K. K. (1930). - J. Biol. Chem., 87, 755.
- JENSEN H. y CHEN K. K. (1932). - Ber., 65, 1310.
- JENSEN H. y CHEN K. K. (1936). - J. Biol. Chem., 116, 87.
- JENSEN H. y EVANS E. A. (1934). - J. Biol. Chem., 104, 307.
- LABRIOLA R. (1937-38). - Chemia, 10, 109.
- NOVARO V. (1922). - Compt. Rend. Soc. Biol., 87, 824.
- NOVARO V. (1923). - Compt. Rend. Soc. Biol., 88, 371.
- PHISALIX C. y BERTRAND G. (1893). - Compt. Rend. Soc. Biol., 45, 477.

BUFO CHILENSIS:

1<sup>a</sup>).-De la fracción neutra de este veneno hemos aislado una bufagina de P.F.223-24<sup>a</sup> y fórmula  $C_{24}H_{34}O_6$  (chilenobufagina).

2<sup>a</sup>).-En dicha fracción hemos comprobado también la presencia de colesterol y de ácido subérico.

3<sup>a</sup>).-El estudio de la fracción básica reveló la existencia de bufotenina y bufotionina y de otra base indólica desconocida que da un picrato de P.F.127<sup>a</sup>.

- - -

# PöPpA

- PHISALIX G. y BERTRAND G. (1902). - Compt. Rend. Soc. Biol., 54, 932.
- SLOTTA C. H. y NEISSER C. (1937). - Mem. Inst. Butantan, 11, 89.
- TSCHESCHE R. y OFFE H. A. (1936). - Ber., 69, 2361.
- WIELAND H. y HESSE G. (1935). - Ann., 517, 22.
- WIELAND H., HESSE G. y HÜTTEL R. (1936). - Ann., 524, 203.
- WIELAND H., HESSE G. y MITTASCH H. (1931). - Ber., 64, 2099.
- WIELAND H., KONZ N. y MITTASCH H. (1934). - Ann., 513, 1.
- WIELAND H. y VOCKE F. (1930). - Ann., 481, 215.
- WIELAND H. y WEIL F. J. (1913). - Ber., 46, 3315.
- WIELAND H. y WIELAND T. (1937). - Ann., 528, 234.
- ZECHMEISTER L. y CHOLNOKY L. VON. - Die chromatographische Adsorptionsmethode.  
Berlin, 1936.

# Índice

	Página
<u>Prefacio</u> .....	1
VENENOS DE SAPOS	
<u>Generalidades</u> .....	5
Historia.....	5
Obtención.....	7
Composición.....	8
<u>Fracción neutra</u> .....	9
Colestercl.....	9
Bufaginas.....	10
Bufotoxinas.....	16
<u>Fracción básica</u> .....	18
Adrenalina.....	18
Bufotenina.....	19
Bufotenidina.....	21
Dehidrobufotenina.....	22
Bufoticonina.....	23
Esquema de separación.....	25
VENENOS DE SAPOS SUDAMERICANOS	
<u>Antecedentes</u> .....	27
<u>Bufo marinus</u>	
Fracción neutra.....	29
Parte experimental.....	35
Fracción básica.....	37
Parte experimental.....	38

Bufo arenarum

Fracción neutra.....42

    Parte experimental.....44

Fracción básica.....48

    \* Parte experimental.....49

Bufo chilensis

Fracción neutra.....51

    Parte experimental.....51

Fracción básica.....54

    Parte experimental.....54

Resumen y conclusiones.....57

Bibliografía.....59

Indice.....61

- - -

*Handwritten signature*