

Comparison of Diet and Alkaloids Composition of *Dendrobates truncatus* (Dendrobatidae) Between Two Zones with Different Degrees of Disturbance in a Dry Forest

Juan Pablo Erazo Londoño
Universidad del Valle

Luisa Alejandra Ruano Meneses
Universidad del Valle

Andrea López Peña
Universidad del Valle

Received: March 2, 2016

Accepted: May 31, 2016

Pag. 95-107

Abstract

Frogs of genus *Dendrobates* retain alkaloids in their skins that are probably related to their diets, so alkaloids composition can be affected by the offer on food resources. This study assessed the differences in diet and alkaloid composition between two populations of *D. truncatus* that inhabit habitats with different degree of perturbation. Consequently, pitfall traps were installed, and gastric washings were applied to all individuals. Finally, alkaloid composition by thin-layer chromatography and identification by GC-MS was determined. The chromatography revealed substances that were present only for the population in the less disturbed zone. On the other hand, mass spectrometry indicated that alkaloids as indolizidine, decahydroquinoline and histrionicotoxin are present in both populations, but that the zones differ in the presence of alkaloids from the quinilones family. However, no differences between populations were found in diet or food availability, which suggest that composition of alkaloids is not influenced by dietary differences. Therefore, results indicate that habitat perturbation can probably affect alkaloid composition in *D. truncatus*, but differences between zones are not related to differences in diet.

Keywords: alkaloids, *Dendrobatidae*, diet, extraction, pitfall traps, operated area, secondary forest, mass spectrometry, chromatography.

Comparación entre dieta y composición de alcaloides de *Dendrobates truncatus* (Dendrobatidae) entre dos zonas con diferentes grados de perturbación en un bosque seco

Resumen

Las ranas del género *Dendrobates* retienen alcaloides en su piel que se sabe están relacionados con su dieta, por lo cual la composición de alcaloides puede estar ligada con la oferta de recursos alimenticios. El presente estudio evaluó las diferencias en dieta y presencia de alcaloides entre dos poblaciones de *D. truncatus* cuyos hábitats difieren en el grado de intervención. Se instalaron trampas de caída, se realizaron lavados gástricos y extracción de alcaloides con revelado en cromatografía de capa delgada e identificación mediante GC-MS. La cromatografía en capa delgada reveló sustancias presentes sólo para la población de la zona menos intervenida. Por otra parte la espectrometría de masas indicó que en ambas poblaciones hay presencia de alcaloides como indolizidina, decahidroquinolina e histrionicotoxina; mientras que difieren en la presencia de

alcaloides de la familia de las quinolinas. Por otra parte, no se encontraron diferencias evidentes en los lavados gástricos y el recurso alimenticio que indique una influencia de la dieta en la composición de los alcaloides. Los resultados sugieren evidencia de los efectos de la intervención sobre la composición de alcaloides en *D. truncatus*, los cuales aparentemente no están relacionados con diferencias en dieta.

Palabras clave: alcaloides, *Dendrobatidae*, dieta, trampas de caída, extracción, zona intervenida, bosque secundario, espectrometría de masas, Cromatografía.

1 Introducción

Las presiones impuestas por los depredadores a los anfibios en especial a los Anuros, han generado en estos animales mecanismos de defensa como los venenos siendo estos de carácter endógeno o exógeno [1]. Entre los venenos de los anfibios se encuentran más de 800 alcaloides presentes en las pieles de ciertas especies, los cuales, en su mayoría, son de origen exógeno ya que se obtienen a partir de la dieta. Se ha sugerido que estos agentes son extraídos a partir del consumo de hormigas, ácaros, coleópteros y otros artrópodos [2]. Entre los alcaloides más estudiados en los anfibios se encuentran las batracotoxinas, pumiliotoxinas, histrionicotoxinas y decahidroquinolinas, además se ha descubierto una estrecha relación entre éstas y el consumo de hormigas (subfamilias Myrmicinae y Formicinae), ácaros (Oribatidae), coleópteros (Coccinellidae) y de algunas especies de miriápodos [2, 3, 4]. Por lo tanto, la perturbación antrópica de los hábitats, al alterar la composición de la fauna edáfica puede afectar la producción de alcaloides derivados de las dietas en especies de anfibios.

El bosque seco tropical es uno de los más amenazados a nivel global debido a que las actividades humanas que se realizan en estos ponen en riesgo la estabilidad y el equilibrio ecológico de este ecosistema, lo que genera una amenaza para la biodiversidad y la supervivencia de las comunidades que lo habitan [8]. En particular, la ganadería extensiva y la minería generan una vasta destrucción de la vegetación y la fauna presente [5,6] e influyen en el deterioro del agua y el suelo siendo la minería y este tipo de ganadería las que se realizan en el lugar donde se desarrolló esta investigación [7].

Los efectos de las alteraciones de hábitat sobre la composición de insectos del suelo pueden derivar en cambios en el almacenamiento de alcaloides por especies de anfibios de la familia Dendrobatidae. Por lo tanto el propósito del presente estudio fue comparar (1) la composición de alcaloides, (2) la diversidad del recurso alimentario y (3) la dieta de *D. truncatus* entre dos sitios que difieren en el grado de perturbación. Finalmente para cumplir el objetivo de estudio y con base en muestreos de *D. truncatus* y de artrópodos edáficos, se realizó la extracción e identificación de alcaloides presentes en cada zona y se relacionó con la composición de artrópodos y con la dieta de los individuos de *D. truncatus*.

2 Materiales y métodos

2.1 Área de estudio

El estudio se realizó en los bosques de la hacienda “La Española” (5°93’22” N-74°40’W), la cual se encuentra en el corregimiento de Guarinocito al sur de la cabecera municipal de la Dorada (departamento de Caldas, Colombia). La vegetación del área de

estudio corresponde a la zona de vida bosque seco tropical. La hacienda se encuentra a una altura de 178 msnm con una variación en temperatura entre 28°C y 35°C, una humedad relativa de 60-70% y un régimen de lluvias bimodal que se caracteriza por dos épocas de alta precipitación (60-120mm/mes entre marzo-mayo y septiembre-noviembre) y dos épocas de baja precipitación (20-60 mm/mes entre diciembre-febrero y junio-agosto) [9]. La hacienda presenta diferentes grados de intervención con áreas destinadas a la ganadería, minería y áreas de bosque secundario en avanzado estado de recuperación.

2.2 Especie de estudio

El género *Dendrobates* incluye especies de ranas venenosas de tamaño pequeño (13,5 - 50mm) que se encuentran principalmente en bosques húmedos de tierras bajas, aunque algunas pueden ser observadas por encima de los 1000 msnm [10]. El género se distribuye desde el suroeste de Nicaragua, el oeste de los Andes, en las cuencas Amazonas, Orinoco, Magdalena, incluyendo las Guyanas y Ecuador [10]. *Dendrobates truncatus* se encuentra distribuida en Colombia desde los 100-1130 m a lo largo del valle del Magdalena desde el norte del chaparral hasta la costa Caribe y las tierras bajas alrededor de los extremos norte de las cordilleras Central y Occidental, al oeste con el golfo de Urabá principalmente en zonas de bosque húmedo tropical y algunos registros de la zona de bosque seco tropical [11]. Es una especie terrestre de hábito diurno que se alimenta de artrópodos y se encuentra con frecuencia en hábitats intervenidos, usualmente en plantaciones de banano y según su clasificación en la IUCN es de preocupación menor y los principales alcaloides presentes en la piel son las histrionicotoxinas (HTX) [12, 13].

2.3 Disponibilidad de alimento y dieta de *D. truncatus*

El muestreo se realizó en dos zonas, una correspondiente a un bosque secundario y la otra a un área con poca vegetación arbustiva en la cual se realizan actividades de minería. En las dos zonas se muestreó a los artrópodos de suelo con el fin de evaluar si la perturbación antrópica afectó la disponibilidad de alimento para *D. truncatus*. Para la captura de artrópodos se instalaron trampas de caída, las cuales consistieron en recipientes de plástico (vaso de 7 onzas) enterrados con su borde a nivel del suelo, los cuales se llenaron con agua jabón [14]. En cada zona se estableció un trayecto de 480m, dividido cada 160m con trampas separadas 10m entre sí, para un total de 16 trampas por. Las trampas se instalaron y posteriormente se recogieron después de 24 horas de funcionamiento. Las capturas de cada trampa fueron depositadas en bolsas plásticas con alcohol al 70% para su conservación hasta la posterior identificación de los individuos en el laboratorio. Para todos los artrópodos capturados se realizó la identificación taxonómica hasta el nivel de orden o familia.

Se realizó la recolecta manual de cinco ranas en cada zona, las cuales fueron transportadas en bolsas (con hojarasca y agua para conservar la humedad) hasta llegar al sitio donde se realizó el lavado gástrico. Sin embargo, a las ranas de la zona de bosque se les realizó el procedimiento en el lugar de captura debido a que la distancia hasta el sitio de procesamiento era muy extensa. El lavado gástrico consistió en introducir un catéter unido a una jeringa a través de la boca y el esófago e inyectar agua a presión, haciendo movimientos circulares para forzar la salida del contenido estomacal [15]. El contenido estomacal se depositó en

frascos plásticos con alcohol al 70% para la posterior identificación en el laboratorio. Para todos los fragmentos de artrópodos obtenidos en los lavados, se realizó la identificación taxonómica hasta el nivel de orden o familia.

2.4 Extracción, visualización e identificación de alcaloides de *D. truncatus*

Las diez ranas recolectadas fueron conservadas y transportadas refrigeradas hasta el laboratorio de Biología de la Universidad del Valle. Aquí se realizó la extracción de la piel completa a través de una incisión en el vientre para posteriormente llevarlas al laboratorio de Química Industrial de la Universidad del Valle y realizar la extracción de alcaloides. El protocolo de extracción de los alcaloides se basó en el método descrito por Daly [16]. El protocolo consistió en conservar las pieles de las ranas en metanol durante dos semanas, para luego filtrarlas y agitarlas fuertemente durante cinco minutos, en cuatro ocasiones, en un embudo de separación con cloroformo. La mezcla se vertió en un recipiente tapado con papel filtro y sulfato de sodio (Na_2SO_4), lo cual inició el proceso de secado, y luego se pasó a una campana de extracción, en la cual permaneció hasta que la mezcla cloroformo-metanol se evaporó hasta el volumen más reducido posible. Debido a las modificaciones que sufrió el procedimiento, no se realizaron los pasos con n-hexano, con HCl y con amonio acuoso descritos por Daly [16] lo cual pudo generar menor pureza de la extracción o una reducida extracción de los alcaloides presentes en la muestra porque no se emplearon los reactivos indicados para este tipo de extracciones. Lo cual fue debido en gran parte a la falta de disponibilidad de los reactivos y el acceso a otro tipo de herramientas para un mejor análisis.

Los reportes anteriores en dendrobátidos [4,16, 17, 18] evidencian que esta especie *Dendrobates truncatus* presenta sustancias de defensa, por ende no se consideraron pruebas colorimétricas para la identificación de alcaloides. La separación de alcaloides se realizó a través de cromatografía de capa delgada en placa para TLC de gel de sílice con indicador de fluorescencia. La proporción de la mezcla para la cromatografía fue de 9:1 cloroformo-metanol; sin embargo, se emplearon proporciones adicionales de 6:4 y 1:9 cloroformo-metanol para generar la separación de familias de alcaloides de acuerdo a sus polaridades y de esa manera, evaluar si se presentaba variación en el revelado a diferentes proporciones de la mezcla. El cromatograma fue revelado en una cámara de fluorescencia a dos longitudes de onda, 254 nm y 365 nm (UV), con el fin de observar la fluorescencia del arrastre y de las marcas dejadas por los compuestos en la fase estacionaria.

Para el análisis efectivo de los extractos obtenidos a partir de las pieles, se utilizó la combinación de cromatografía de gases con espectrometría de masas GC-MS. Lo cual se realizó con un equipo GCMS-QP2010 Ultra con un modo de ionización de impacto electrónico, el voltaje de ionización fue de 70eV, el diámetro y largo de la columna fueron de 0,25 mm y 30 m respectivamente, con duración de 77 minutos. La temperatura inicial fue de 40°C y se aumentó 10°C cada minuto, posteriormente se mantuvo a 280°C durante 10 minutos y finalizó a 300°C durante 15 minutos. El resultado de esta espectro-cromatografía, la cual arroja compuestos con probabilidad de acierto hasta del 95%, fue comparado con los espectros de la descomposición molecular para alcaloides reportada por Daly [4] para confirmar la presencia de alcaloides en las muestras.

2.5 Análisis de datos

Con el fin de evaluar la representatividad del muestreo de artrópodos, se construyeron curvas de acumulación de taxa para las trampas de caída de las dos zonas y se observó si estas alcanzaron la asíntota. Para determinar el grado de diferencia en la composición del ensamblaje de artrópodos de hojarasca y de la dieta de *D. truncatus* entre las zonas, se realizó un análisis de Escalamiento No-Métrico Multidimensional (NMDS), utilizando el índice de Bray-Curtis como medida de similitud, en el lenguaje de programación R versión 3.2.2. (R Development Core Team 2015) [19].

3 Resultados y discusión

3.1 Composición de artrópodos y la dieta de *D. truncatus*

La curva de acumulación sugiere que el muestreo fue representativo, pues se alcanza una asíntota con el esfuerzo de muestreo realizado (16 trampas/zona durante 24h), y que se presenta un mayor número de taxa en la zona intervenida en comparación con la zona de bosque (Figura 1). El análisis de la composición de artrópodos en las zonas y en los lavados gástricos no evidencia diferencias considerables entre las zonas (Figuras 2 y 3), lo cual sugiere que no existen diferencias en la oferta alimenticia potencial de las dos zonas ni en la dieta de los individuos de ambas zonas. El orden Acari y la familia Formicidae fueron los más representativos para ambas zonas, sin embargo, la riqueza de taxa varió en Formicidae (en la zona intervenida se encontraron dos subfamilias y en bosque cuatro). En las trampas de caída de la zona de bosque se encontró mayor riqueza del orden Araneae y abundancia de la familia Formicidae (subfamilia Myrmicinae), mientras que en la zona intervenida la mayor riqueza y abundancia fue para la familia Formicidae (subfamilia Myrmicinae).

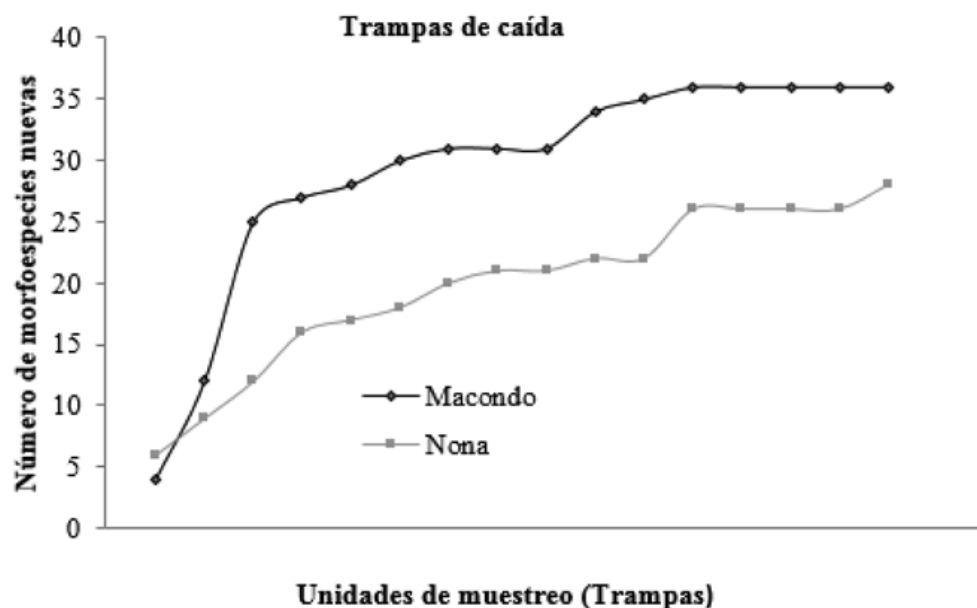


Figura 1. Curva de acumulación de taxa para las trampas de caída de la zona de bosque (Nona) y la zona intervenida (Macondo).

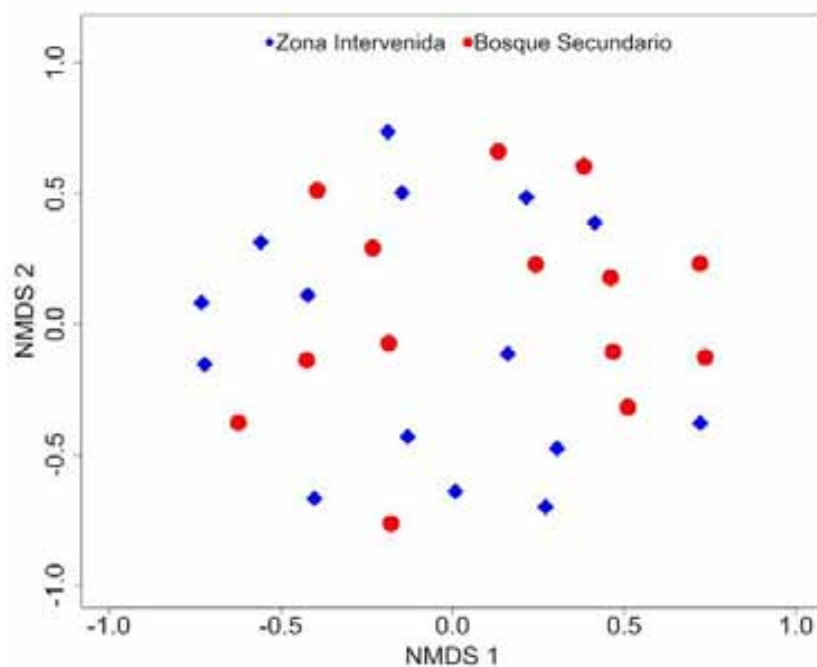


Figura 2. *Análisis de Escalamiento No-Métrico Multidimensional (NMDS), con el índice de Bray-Curtis como medida de similitud, para la composición de artrópodos en la zona intervenida y de bosque secundario.*

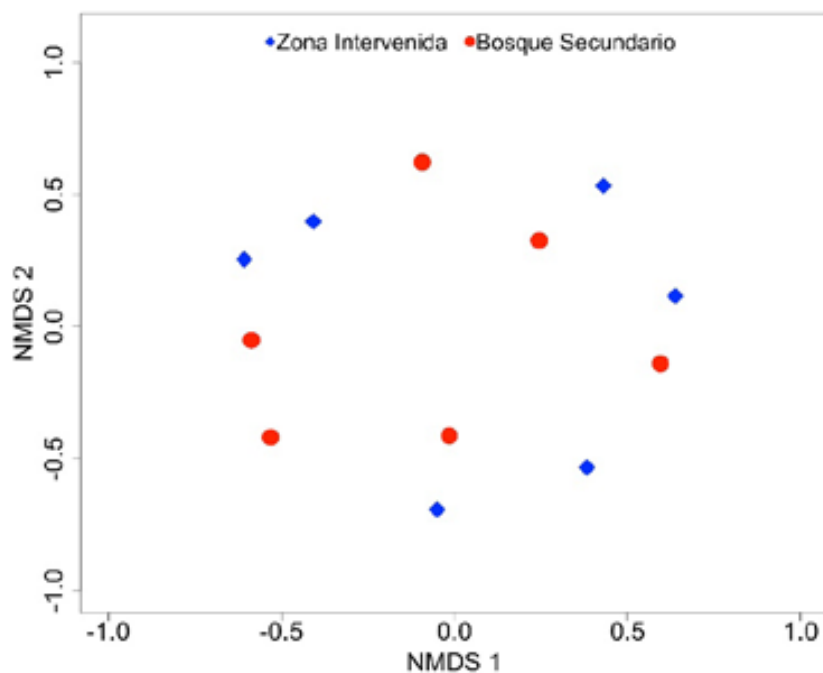


Figura 3. *Análisis de Escalamiento No-Métrico Multidimensional (NMDS), con el índice de Bray-Curtis como medida de similitud, para los lavados gástricos en la zona intervenida y de bosque secundario.*

En el caso de los lavados gástricos, los individuos de la zona de bosque ingieren mayor número de individuos y de taxa de la familia Formicidae (subfamilia Myrmicinae), seguido por el orden Acari y en la zona intervenida se ingiere en mayor número el orden Acari, seguido de la familia Formicidae (subfamilia Myrmicinae) y con mayor riqueza del orden Colembolla (familia Dycirtomidae) y la clase Gasteropoda (orden Pulmonata). La morfoespecie Myrmicinae en trampas de caída y lavado gástrico presenta la mayor abundancia y para el caso particular de las trampas de caída la mayor abundancia la presenta el orden Acari.

3.2 Cromatografía de capa delgada (TLC)

La cromatografía se observó en una cámara de fluorescencia con dos longitudes de onda y se observaron bandas y rastros fluorescentes (Figuras 4 y 5); lo cual sugiere la presencia de alcaloides [20]. El patrón de bandas y rastros fue diferente entre las muestras de las dos zonas, lo encontrado sugiere diferencias en la composición de alcaloides entre estas (Figuras 4 y 5, Tabla 1). Estas diferencias, aunque cualitativas, fueron claras debido a la aparición de un mayor número de bandas en la muestra correspondiente a la zona de bosque que en la zona intervenida (Figuras 4 y 5, Tabla 1). Los tres cromatofolios observados presentaron diferentes bandas y rastros debido a los cambios en la polaridad de la mezcla. (Figuras 4 y 5, Tabla 1). Adicionalmente, en el lugar de la aplicación de la muestra quedaron retenidas unas machas con gran intensidad, lo que estuvo probablemente determinado por una mayor afinidad de algunos compuestos por la fase estacionaria que por la fase móvil [21]. Por otro lado, se puede apreciar que la intensidad de las bandas y los rastros presentó variación, lo cual puede deberse a que la intensidad de la banda está directamente relacionada con la concentración de los compuestos presentes en la muestra [22]. Por lo tanto, en la zona de bosque no solo aparecieron más compuestos, sino que se observaron con mayor intensidad. Estas diferencias en el número de bandas y en la intensidad de estas entre las muestras de las zonas pueden estar relacionadas con la presencia de ítems alimenticios en la red trófica de la zona de bosque, que son ausentes o en menor abundancia en la zona intervenida.

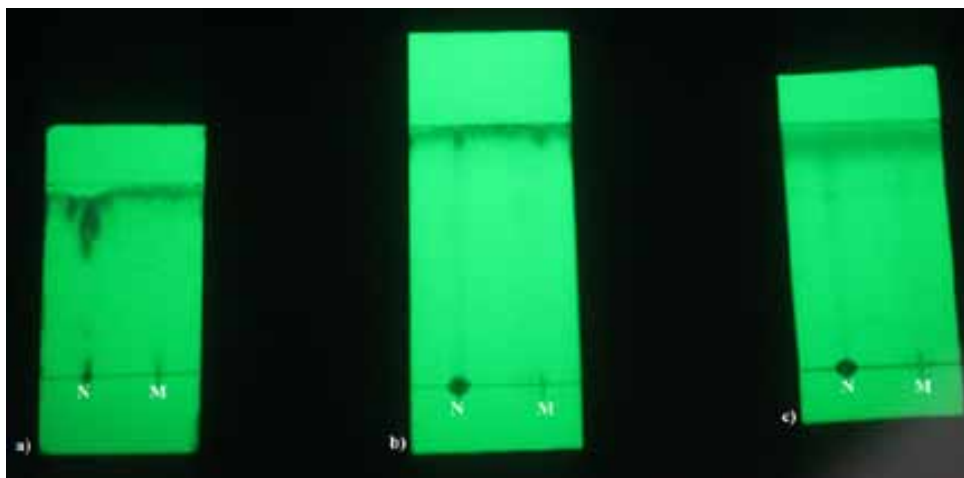


Figura 4. Cromatograma revelado en luz a una longitud de onda de 254nm. Zona de bosque (N), zona intervenida (M), proporción cloroformo-metanol del eluyente; a) 9:1. b) 6:4. c) 1:9.

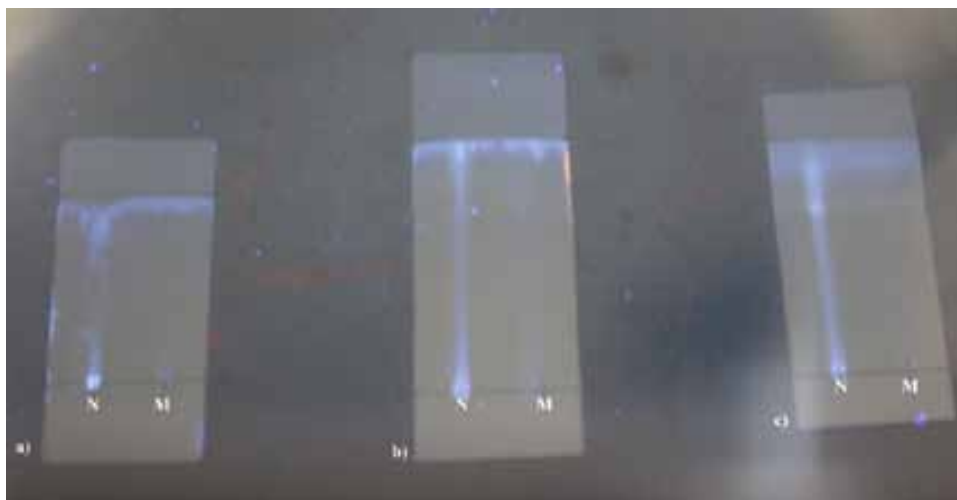


Figura 5. Cromatograma revelado en luz a una longitud de onda de 365nm. Zona de bosque (N), zona intervenida (M), proporción cloroformo-metanol del eluyente; a) 9:1. b) 6:4. c) 1:9.

Tabla 1. Cantidad de bandas observadas en los cromatogramas de los extractos de piel de *D. truncatus* en las dos zonas evaluadas.

Eluyente	Zona bosque (254nm)	Zona intervenida (254nm)	Zona bosque (365nm)	Zona intervenida (365nm)
Cloroformo-metanol 9:1	2	1	3	1
Cloroformo-metanol 6:4	2	1	2	1
Cloroformo-metanol 1:9	1	0	3	0

3.3 Espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS)

Para una determinación más precisa de los alcaloides se realizó una GC-MS a los extractos de las dos zonas. Los resultados de esta prueba sugieren que hay diferencias en cuanto a la cantidad de alcaloides y en la composición de alcaloides en cada zona (Tabla 2). En la zona de bosque, se lograron confirmar nueve alcaloides de cuatro familias diferentes (95% de certeza), entre ellas la Histrionicotoxina o HTX, reconocida por su acción fisiológica [23]. Por otro lado, para la zona intervenida se obtuvieron siete alcaloides ubicados en tres familias, pero no se encontraron representantes de la familia de las Quinolinas a diferencia de los extractos de la zona de bosque.

Tabla 2. Alcaloides encontrados en los extractos de piel de *D. truncatus* de las dos zonas por medio de GC-MS

Familias de alcaloides	Zona de bosque	Zona intervenida
Indolizidina	205A - 223A - 231B	203A - 195B
Decahidroquinolina	219A - 223F - 243A - 269AB	267L - 269AB - 223F - 219A
Quinolina	251Y	-
Histrionicotoxina	259A	285A
Total	9	7

A pesar de que las familias de alcaloides se repiten en las dos locaciones, los resultados mostraron que solo las Decahidroquinolinas 219A y 269AB se comparten entre las zonas. Esto puede ser debido a que sin importar que sean la misma especie, la disponibilidad del alimento es tan variada que solo una pequeña proporción de la oferta dietaria se repite en las dos localidades, por lo cual las sustancias acumuladas por medio de la ingesta difieren entre las zonas, como ha sido descrito por Daly [24]. Para el caso de las demás familias, por ejemplo, la HTX encontrada en la muestra de la zona intervenida no es la misma que en la zona de bosque, diferenciándose en su peso molecular y dejando duda acerca de cuáles son los artrópodos fuente de estos químicos. Por otro lado dentro de los alcaloides descritos para *D. truncatus* [13], sólo se pudieron observar cuatro de ellos (todos presentes en la zona de bosque y sólo uno en la zona intervenida), lo que posiblemente podría representar un aumento del espectro químico de defensa de esta especie. Los resultados sugieren que falta información sobre la bioquímica, fisiología y ecología de las sustancias de defensa acumuladas en la piel de los anfibios y que sin este conocimiento las cadenas ecológicas e interacciones depredador-presa aún están lejos de ser comprendidas en este grupo de vertebrados. Desde el punto de vista metodológico, al obviar el tratamiento de la mezcla con n-hexano, se pudo haber incurrido en la no captura de alcaloides hidrofóbicos (sales hidroclicoradas) como sucedía hasta antes de Daly [25]; lo cual sugiere que la cantidad de alcaloides difiere entre las dos zonas estudiadas al menos para los alcaloides insolubles en cloroformo.

3.4 Efecto del grado de perturbación sobre la dieta y la composición de alcaloides de *D. truncatus*

Los anuros de la familia Dendrobatidae obtienen sus toxinas de manera exógena y cada taxón de artrópodos puede proveer sustancias tóxicas diferentes: las hormigas producen pirrolidinas, indolizidinas, decahidroquinolinas, quinolinas; los ácaros de la familia Oribatidae se ven involucrados en las indolizidinas, las pirrolidinas y las quinolinas y las HTX al parecer tienen su origen en las hormigas de la subfamilia Myrmicinae [3, 28, 29]. A pesar de esto no se puede concluir que la dieta sea la fuente exclusiva de variación, dado

a que no se encontró diferencia en la dieta y no se realizaron análisis bioquímicos a los artrópodos. Por lo tanto, se desconoce sus potenciales precursores; tampoco se conoce cuál es el origen de estos precursores en los artrópodos, los cuales podrían provenir de plantas que estén presentes en una zona y no en la otra. Adicionalmente, los lavados gástricos obtenidos en el presente trabajo (cinco por zona) pueden no ser representativos de las poblaciones. Consecuentemente, se requieren estudios detallados acerca de la variación temporal en las dietas con un mayor número de réplicas. El conjunto de todas estas variables podría otorgar un conocimiento más profundo acerca de lo que está sucediendo en las interacciones ecológicas, fisiológicas y toxicológicas de estas dos poblaciones.

Los resultados obtenidos sugieren que se presentan diferencias en la cantidad y composición de los alcaloides de las poblaciones de *Dendrobates truncatus* de las zonas evaluadas. Sin embargo, no se encontró evidencia de que esta diferencia se deba a variaciones en la oferta de alimento o en la dieta de los individuos de esta especie entre las dos zonas. Adicionalmente, este estudio sugiere la presencia de alcaloides no reportados para las poblaciones de *D. truncatus* evaluadas, lo cual puede incrementar el conocimiento que se tiene de los dendrobátidos en Colombia y realizar estudios más detallados de la dieta, para evaluar si lo reportado puede ser producto de nuevos ítems alimenticios y/o cambios en la disponibilidad de alimento. Además de realizar la extracción y revelado de los alcaloides mediante procedimientos y herramientas de mayor alcance.

Agradecimientos

A Mario F. Velásco por permitir el ingreso a la Hacienda La Española. A Oscar E. Murillo, por su orientación académica en el desarrollo de esta investigación. A Wilmar Bolívar, Diego Córdoba y Andrés Gómez por su valiosa colaboración durante las jornadas de muestreo. A Cristian Hernández por el apoyo brindado en la preparación del material biológico para el análisis. A Rubén Sánchez y Segio Mosquera por su valiosa colaboración en el desarrollo del análisis químico. A Helberg Asencio por su apoyo para la interpretación de los resultados de la cromatografía. Al Laboratorio de Biología, en especial a Luis Eduardo Hurtado “Lucho” y Carlos Alberto Rodríguez, y al Laboratorio de Química Industrial de la Facultad de Ciencias y exactas de la Universidad del Valle por proporcionar los reactivos, materiales y equipos requeridos para el desarrollo de los procedimientos. Este trabajo se realizó con autorización de la Corporación Autónoma Regional de Caldas, CorpoCaldas, en el marco de la práctica docente del curso de Laboratorio de Ecología (Programa Académico de Biología). Los análisis químicos fueron cofinanciados por el Grupo de Ecología Animal en el marco del proyecto de investigación “Implementación de indicadores biológicos como herramienta para evaluar cambios en la integridad ecológica de los fragmentos de bosque seco tropical presentes en Victoria y La Dorada, Caldas” CI7945 (Convenio de colaboración No 5212085/2013).

Referencias bibliográficas

- [1] Darst, Catherine. Menéñez-Guerrero, Pablo. Coloma, Luis. Cannatella, David. (2005). Evolution of Dietary Specialization and Chemical Defense in Poison Frogs (Dendrobatidae): A Comparative Analysis. *The American Naturalist*, Vol. 165: 56-69.

- [2] Mebs, Dietrich. Jansen, Martin. Köhler, Gunther. Pogoda, Werner. Kauert, Gerold. (2010). Myrmecophagy and alkaloid sequestration in amphibians: a study on *Ameerega picta* (Dendrobatidae) and *Elachistocleis* sp. (Microhylidae) frogs. *Salamandra-Journal*, Vol. 46: 11-15.
- [3] Clark, Valerie. Raxworthy, Christopher. Rakotomalala, Valérie. Sierwald, Petra. Fisher, Brian. (2005). Convergent Evolution of Chemical Defense in Poison Frogs and Arthropod Prey between Madagascar and the Neotropics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 102: 11617-11622.
- [4] Daly, John W., Spande, Thomas F., Garraffo, H. Martin. (2005). Alkaloids from amphibian skin: A tabulation of over eight-hundred compounds. *J. Nat. Prod.* Vol. 68:1556-1575.
- [5] Fraume, Nestor. (2007), *Diccionario ambiental*, ECOE ediciones.
- [6] Aguilar, Ariel José. (2007), *El modelo de la ganadería extensiva y la destrucción de los bosques en la República de Panamá*, Ciudad de Panamá, Panamá.
- [7] Amoros, M^a Jesús. (1999). *Guía ambiental de la minería en la Región de Murcia*. Universidad de Murcia, servicios editoriales, Murcia, España. 76-77.
- [8] Ochoa, Doris. Guio, Camilo. (2004) *Control social y coordinación: un camino hacia la sostenibilidad amazónica*. Universidad Nacional de Colombia, Sede Leticia. Pp 13.
- [9] Duque, G., Ramirez, A., Ortiz, D., y Dunoyer, M. (2010). *Plan de Acción-PAI Municipio de La Dorada (Reporte Técnico)*. (pp. 7-8). Corporación Autónoma Regional de Caldas – Corpocaldas & Corporación Aldea Global, La Dorada, Caldas.
- [10] Savage, Jay. (2002). *The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna Between Two Continents between two seas*. The University of Chicago press. Londres, Reino Unido. 382.
- [11] Silverstone, Philip. (1975). A revision of the poison-arrow frogs of the genus *Dendrobates* wagler. *Natural History Museum of Los Angeles County, Science*. Vol 21:1-55.
- [12] Castro, Fernando y Jhon Lynch. (2014). *Dendrobates truncatus* .The IUCN red list of threatened species. (11, Noviembre, 2014) <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55205A11265721.en>.
- [13] Southon, Ian W. & Buckingham John. (1989). *Dictionary of alkaloids*. Chapman and Hall. Cambridge, Gran Bretaña. 37-46, 505-506.
- [14] Manson, Robert. Hernández, Vicente. Sonia, Gallina. Klaus, Mehlreter. (2008). *Agroecosistemas cafetaleros de Veracruz: Biodiversidad, manejo y conservación*. INECOL & INE-SEMARNAT. Mexico. D, F, Mexico.

- [15] Dodd, Kenneth. (2009). *Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques*. University of Oxford Press Oxford, New York, U.S.A. 169 p.
- [16] Daly, John W., Secunda, Sherrie., Garrafo, H. Martin., Spande, Thomas F., Wisniesky, Anthony., & Cover Jr, Jack. (1994). An uptake system for dietary alkaloids in poison frogs (DENDROBATIDAE). *Toxicon*, 32(6): 657-663.
- [17] Campbell, James. (1987). *Coleoptera. Canada and its Insects Fauna*. H. Dranks (Ed.). En *Memoirs of the Entomological Society of Canada*. 106-108.
- [18] Daly, John W. & Myers, Charles W. (1967). Toxicity of Panamanian Poison Frogs (*Dendrobates*): Some Biological and Chemical Aspects. *Sciences*, 156: 970-973.
- [19] R Development Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- [20] Hernández, Miguel. (2014). *Toxicología ambiental y salud pública*. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- [21] Durst, Duppont. H & Gockel, George W. (1985). *Química Orgánica Experimental*. Barcelona: Reverté, S. A.
- [22] Reppeto-Jiménez, Manuel & Repetto-Kuhn, Guillermo. (2009). *Toxicología fundamental* (Cuarta ed.). Sevilla: Ediciones Díaz de Santos.
- [23] Daly, John W., Karle, Isabella., Myers, Charles W., Tokuyama, Takashi., Waters, James., Witkop, Bernhard (1971). Histrionicotoxins: Roentgen-Ray Analysis of the Novel Allenic and Acetylenic Spiroalkaloids Isolated from a Colombian Frog, *Dendrobates histrionicus*. *PNAS*, 68(8), 1870-1875.
- [24] Daly, John.W. (1995), "The chemistry of poisons in amphibian skin", *PNAS*, 92 (1):10-12 pp.
- [25] Daly, John W., Secunda, Sherrie., Garrafo, H. Martin., Spande, Thomas F., Wisniesky, Anthony., Nishihira, Charles & Cover Jr, Jack. (1992). Variability in alkaloids profiles in neotropical poison frogs (Dendrobatidae): Genetic vs environmental determinants. *Toxicon*, 30 (8): 887- 898.
- [26] Connell, Joseph. (1978). *Diversity in Tropical Rain Forests and Coral Reefs*. *Sciences*. 199:1302-1310.
- [27] Granados, C. (1996). *Ecología de peces*. 1era ed. Universidad de Sevilla. Sevilla, España. 259 p.
- [28] Saporito, Ralph., Donnelly, Maureen., Norton, Roy., Garraffo, Martin., Spande, Thomas., and Daly, John. (2007). *Oribatid*.

- [29] Mebs, D., Jansen, M., Köhler, G., Pogoda, W., Kauert, G. (2010). Myrmecophagy and alkaloid sequestration in amphibians: a study on *Ameerega picta* (Dendrobatidae) and *Elachistocleis* sp. (Microhylidae) frogs. *Salamandra-Journal*, 46: 11-15.

Dirección de los autores

Juan Pablo Erazo Londoño

Estudiante, Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali - Colombia

juan.erazo@correounivalle.edu.co

Luisa Alejandra Ruano Meneses

Estudiante, Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali - Colombia

luisaruanom@gmail.com

Andrea López Peña

Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali - Colombia

andrea.l.p0108@gmail.com