



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Ismene narcissiflora* SOBRE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA”

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: EDUARDO LUIS SEGOVIA NARANJO

DIRECTORA: LCDA. KAREN LISSETH ACOSTA M.Sc.

Riobamba - Ecuador

2019

©2019, Eduardo Luis Segovia Naranjo

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica de documentos, siempre y cuando se reconozca los Derechos de Autor.

Yo Eduardo Luis Segovia Naranjo declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 04 de diciembre 2019



Eduardo Luis Segovia Naranjo

050291618-2

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Trabajo Experimental, **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Ismene narcissiflora* SOBRE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA”**, realizado por el señor: **EDUARDO LUIS SEGOVIA NARANJO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, él mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Verónica Mercedes Cando Brito., M.Sc PRESIDENTA DEL TRIBUNAL		04-12-2019
Lcda. Karen Lisseth Acosta León., M.Sc. DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		04-12-2019
BQF. Diego Renato Vinuesa Tapia., M.Sc. MIEMBRO DEL TRIBUNAL		04-12-2019

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación lo quiero dedicar a mis padres Raúl Solís y Rocío Naranjo, ya que sin su ayuda este logro no habría sido posible, por ser siempre mis amigos y consejeros incondicionales y más leales, por hacer de mí cada día una mejor persona y velar que sea un excelente profesional inculcándome valores de responsabilidad, honestidad y amor.

A mis abuelitos Alberto Naranjo y Beatriz Sandoval por ser ese ejemplo de esfuerzo y sacrificio de lucha constante con la vida, y siempre impulsarme a dar lo mejor de mí para llegar cada vez más lejos.

A mis tíos y hermanas por siempre prestarme de su ayuda para superarme día a día, siendo uno de los pilares más importantes en toda mi vida.

A mis amigos por haber estado en cada etapa de mi vida, mucho más a los que supieron quedarse cuando más los necesitaba.

EDUARDO.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a Dios y la Virgen de Baños, por ser mi fortaleza y guía por darme la fuerza de continuar cuando me sentí derrotado y darme la valentía para superar cada obstáculo que se me presentaba hasta alcanzar mis sueños.

A mis padres Raulito y Rocío, quienes son el motor de mi vida y mayor motivación, por ser siempre esa ancla de apoyo y amor que supo guiarme en cada uno de mis pasos a lo largo de toda mi vida.

A mis abuelitos, tíos, hermanas y una persona especial, quienes supieron impulsarme día a día para que siga adelante, apoyándome, escuchándome y sobre todo siendo la motivación que muchas veces la sentía perdida.

Un agradecimiento muy especial a la Lcda. Karencita Acosta M.Sc. y al Bqf. Diego Vinueza M.Sc , ya que sin ellos nada de esto hubiera sido posible, por compartirme de su tiempo, conocimientos y sobre todo de su amistad, velando siempre que las cosas se realicen correctamente.

Del mismo modo a todo quienes integran el Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia GYPRONAF, por la apertura y el compartir de momentos y experiencias inolvidables.

Del mismo quiero reconocer toda la ayuda prestada por la Dra. Nora Oleas parte del grupo de investigación de la Universidad Tecnológica Indoamérica y a todo el grupo de investigación de la Universitat de Barcelona (España) encabezados por el Dr. Jaume Bastidas, ya que sin su contribución este proyecto no se habría realizado.

Gracias a todas y todos!

EDUARDO.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos.....	4

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Familia Amaryllidaceae.....	5
1.1.1 Género <i>Ismene</i>.....	5
<i>1.1.1.1 Ismene narcissiflora.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.2 Alcaloides de las Amaryllidaceae.....</i>	<i>7</i>
1.2 Enfermedad de Alzheimer.....	8
1.2.1 Hipótesis de la aparición de la Enfermedad de Alzheimer.....	9
<i>1.2.1.1 Hipótesis colinérgica.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.1.2 Hipótesis amiloidea.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.1.3 Hipótesis Tau.....</i>	<i>9</i>
1.2.2 Etapas del Alzheimer.....	10
1.2.3 Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.....	10
<i>1.2.3.1 Terapias aprobadas.....</i>	<i>10</i>
1.2.4 Galantamina y la Enfermedad de Alzheimer.....	12

1.2.4.1	<i>Mecanismos de Acción</i>	12
1.2.5	<i>Neurotransmisores de la respuesta colinérgica</i>	13
1.2.5.1	<i>Acetilcolina</i>	13
1.2.6	<i>Enzimas inhibidoras de la respuesta colinérgica</i>	14
1.2.6.1	<i>Acetilcolinesterasa</i>	14
1.2.6.2	<i>Butirilcolinesterasa</i>	16
1.3	Método Ellman	16
1.4	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	17
1.4.1	<i>Mecanismo de Funcionalidad</i>	17

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	18
2.1	Lugar de la investigación	18
2.2	Recolección del material vegetal	18
2.3	Identificación botánica	18
2.4	Equipos, materiales y reactivos	18
2.4.1	<i>Equipos</i>	18
2.4.2	<i>Materiales</i>	19
2.4.3	<i>Reactivos</i>	20
2.5	Acondicionamiento del material vegetal	20
2.6	Extracción de alcaloides	20
2.7	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	23
2.8	Preparación de muestra de alcaloides y compuesto de referencia	23
2.8.1	<i>Muestra de alcaloides de <i>Ismene narcissiflora</i></i>	23
2.8.2	<i>Compuesto de referencia (<i>Galantamina</i>)</i>	24
2.9	Inhibición in vitro de acetil- y butirilcolinesterasa	24
2.10	Análisis de datos	25
2.10.1	<i>Porcentaje de inhibición</i>	25

2.10.2	<i>Curva de inhibición para la determinación del IC₅₀</i>	25
--------	--	----

CAPITULO III

3.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	26
3.1	Obtención del extracto alcaloidal de <i>Ismene narcissiflora</i>	26
3.2	Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas	26
3.3	Actividad inhibitoria de <i>Ismene narcissiflora</i> sobre AChE.....	29
3.3.1	<i>Primer screening de inhibición de Ismene narcissiflora sobre AChE</i>	29
3.3.2	<i>Segundo screening de inhibición de Ismene narcissiflora sobre AChE</i>	30
3.3.3	<i>Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides del bulbo de Ismene narcissiflora sobre AChE</i>	30
3.4	Actividad inhibitoria de <i>Ismene narcissiflora</i> sobre BuChE.....	31
3.4.1	<i>Primer screening de inhibición de Ismene narcissiflora sobre BuChE</i>	32
3.4.2	<i>Segundo screening de inhibición de Ismene narcissiflora sobre BuChE</i>	32
3.4.3	<i>Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides del bulbo de Ismene narcissiflora sobre BuChE</i>	33
	CONCLUSIONES	35
	RECOMENDACIONES	36
	GLOSARIO	
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Taxonomía <i>Ismene narcissiflora</i>	6
Tabla 1-2:	Equipos utilizados	18
Tabla 2-2:	Materiales utiizados.....	19
Tabla 3-2:	Reactivos utilizados.....	20
Tabla 1-3:	Porcentaje de rendimiento de <i>Ismene narcissiflora</i>	26
Tabla 2-3:	Alcaloides identificados por CG-MS en bulbos de <i>Ismene narcissiflora</i>	27
Tabla 3-3:	Resultados del primer screening de inhibición de <i>Ismene narcissiflora</i> sobre AChE.....	29
Tabla 4-3:	Resultado segundo screening de inhibición de <i>Ismene narcissiflora</i> sobre AChE.....	30
Tabla 5-3:	Inhibición del extracto alcaloidal de <i>I. narcissiflora</i> sobre AChE	30
Tabla 6-3:	Resultado primer screening de inhibición de <i>Ismene narcissiflora</i> sobre BuChE.....	32
Tabla 7-3:	Resultados segundo screening de inhibición de <i>I. narcissiflora</i> sobre BuChE.....	32
Tabla 8-3:	Inhibición del extracto alcaloidal de <i>I. narcissiflora</i> sobre BuChE.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1.	Distribución de la familia Amaryllidaceae.....	5
Figura 2-1.	Ismene narcissiflora.....	6
Figura 3-1.	Tipos de alcaloides de Amaryllidaceae	7
Figura 4-1.	a. Péptidos beta-amiloide (A β) y b. Proteína Tau	8
Figura 5-1.	Inhibidores de la colinesterasa aprobados por la FDA.....	11
Figura 6-1.	A) Diferentes subsitios presentes en la cavidad del sitio activo. B) Disposición de la acetilcolina en el sitio activo de la enzima, en donde ocurre la hidrólisis del neurotransmisor	14
Figura 7-1.	Reacción de tiocolina por el Método de Ellman	16
Figura 1-2:	Esquema para la extracción de alcaloides de Ismene narcissiflora.....	22

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Recolección del material vegetal, *Ismene narcissiflora*
- ANEXO B:** Acondicionamiento del material vegetal
- ANEXO C:** Obtención del extracto de alcaloides de *Ismene narcissiflora*
- ANEXO D:** Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de *Ismene narcissiflora*
- ANEXO E:** Curvas de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) del extracto de alcaloides de *Ismene narcissiflora*, para la obtención del IC₅₀. (Gráfico 1A, Gráfico 2A, Gráfico 3A)
- ANEXO F:** Curvas de inhibición de butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto de alcaloides de *Ismene narcissiflora*, para la obtención del IC₅₀. (Gráfico 1B, Gráfico 2B, Gráfico 3B, Gráfico 4B)
- ANEXO G:** Contrato marco “*Estudio de la biodiversidad en el Ecuador, ecología, conservación y su potencial uso sostenible*”

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal determinar la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *Ismene narcissiflora*, sobre las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE). La familia Amaryllidaceae ha sido ampliamente estudiada debido a que en su composición química presenta alcaloides de tipo isoquinolínicos, con gran actividad farmacológica, siendo la galantamina el alcaloide más relevante debido a su uso en el tratamiento de la Enfermedad del Alzheimer. En primer lugar, se realizó la maceración del bulbo seco de *Ismene narcissiflora* en metanol y posterior uso de solventes orgánicos (éter dietílico y acetato de etilo) con cambios de pH, obteniendo un rendimiento de extracción de 0,248%. Mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) se identificaron un total de cuatro alcaloides en el bulbo de *Ismene narcissiflora* siendo: tazetina (78,29%), licoramina (18,96%), galantamina (10,15%) y O-metileucotamina (9,8507%). Para evaluar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) se utilizó el método de Ellman et al. (1961), con modificaciones realizadas por Ortiz (2016), utilizando galantamina como compuesto de referencia. Como resultado de la inhibición enzimática, para AChE se obtuvo un valor de IC₅₀ de $23,543 \pm 0,316$ ug/mL y para el compuesto de referencia galantamina presentó un IC₅₀ de $0,585 \pm 0,006$ ug/mL. En cuanto a la inhibición mostrada en BuChE se obtuvo un valor de IC₅₀ de $255,953 \pm 3,423$ ug/mL mientras que en galantamina presentó un IC₅₀ de $12,302 \pm 1,974$ ug/mL. Con los resultados obtenidos se evidencio una actividad inhibitoria alta sobre AChE y una actividad nula sobre BuChE, luego de compararlos con el compuesto de referencia galantamina. Se recomienda realizar más estudios fitoquímicos y farmacológicos sobre el género *Ismene* ya que muchas de sus especies podrían tener presentar alcaloides de gran interés.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FITOQUÍMICA>, <EXTRACTO DE ALCALOIDES>, <BULBO (*Ismene narcissiflora*)>, <AMARYLLIDACEAE>, <COLINESTERASAS>, <ACTIVIDAD INHIBITORIA>, <ALZHEIMER (ENFERMEDAD)>.



ABSTRACT

The main objective of this research work was to determine the inhibitory activity of the alkaloid extract of *Ismene narcissiflora*, on the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). The Amaryllidaceae family has been extensively studied because in its chemical composition presents alkaloids of isoquinolinic type, with great pharmacological activity, being galantamine the most relevant alkaloid due to its use in the treatment of Alzheimer's disease. Firstly, the dry bulb of *Ismene narcissiflora* was macerated in methanol and subsequently used organic solvents (diethyl ether and ethyl acetate) with pH changes, obtaining an extraction yield of 0.248%. A total of four alkaloids were identified in the bulb of *Ismene narcissiflora* using Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (CG-EM) being: tazetine (78.29%), lycoramine (18.96%), galantamine (10.15%) and O-methyleukotamine (9.8507%). To evaluate the inhibitory activity of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE), the method of Ellman et al. (1961) was used, with modifications made by Ortiz (2016), using galantamine as reference compound. As a result of the enzymatic inhibition, for AChE an IC_{50} value of $23,543 \pm 0.316$ ug / mL was obtained and for the reference compound galantamine presented an IC_{50} of 0.585 ± 0.006 ug / mL. As regards the inhibition shown in BuChE, an IC_{50} value of $255,953 \pm 3,423$ ug / mL was obtained while in galantamine it presented an IC_{50} of $12,302 \pm 1,974$ ug / mL. The results obtained showed a high inhibitory activity on AChE and a null activity on BuChE, after comparing them with the reference compound galantamine. It is recommended to carry out more phytochemical and pharmacological studies on the genus *Ismene* since many of its species could have alkaloids of great interest.

Key words: <BIOCHEMISTRY>, <PHYTOCHEMISTRY >, ALKALOID EXTRACT>
< (*Ismene narcissiflora*)> BULB, <AMARYLLIDACEAE>, <CHOLINESTERASES>,
< INHIBITORY ACTIVITY >, < ALZHEIMER (DISEASE)>.



INTRODUCCIÓN

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa progresiva e irreversible, representa la causa más común de demencia ya que representa entre un 60 y 70% del total de los casos según datos y cifras de la OMS, siendo también una de las causas más importantes de morbi-mortalidad debido a la falta de un tratamiento definitivo. Esta enfermedad afecta principalmente a la región del cerebro encargada del aprendizaje, la memoria, lenguaje y percepción: provocando en las personas que la padecen una pérdida progresiva de las funciones cognitivas (Nagaraj et al., 2018).

Esta enfermedad tiene una incidencia y prevalencia principalmente en personas mayores de 65 años, que aumenta con la edad (Jiang et al., 2018). La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2017 estimó que en el planeta existen aproximadamente 50 millones de personas que padecen demencia y se espera que para el 2050 esta cifra se triplique ya que cada año se registran 10 millones de casos nuevos (OMS, 2017). En Ecuador uno de cada tres adultos presenta alguna enfermedad crónica, siendo las más frecuente las cardíacas, seguida por las cerebro vasculares, pulmonares, diabetes, hipertensión, cáncer, según la *Agenda de Igualdad para Adultos Mayores* del Ministerio de Inclusión Económica y Social (Doris, 2013), y se estima que en el país existen 59 mil personas que padecen de Alzheimer según “Trascender con Amor Servicio y Excelencia” (TASE), (La Hora, 2017).

En la actualidad, se conocen dos clases de fármacos para el tratamiento de Alzheimer encaminados únicamente a mejorar los síntomas de la demencia. Siendo los inhibidores de la acetilcolinesterasa: donepezilo, galantamina y rivastigmina, y el antagonista del receptor N-metil-D-Aspartato (NMDA) memantina. Los inhibidores de acetilcolinesterasa actúan a nivel del hipocampo al unirse con las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa inhiben la hidrólisis de acetilcolina, aumentando de los niveles de este neurotransmisor y mejorando los síntomas cognitivos propios de la enfermedad de Alzheimer. Por su parte la memantina actúa inhibiendo el efecto patológico de niveles elevados de glutamato, que conllevan a la muerte neuronal y daño celular característicos de la enfermedad. Tres de estos fármacos han mostrado una tasa de respuesta del 27,8% (Zúñiga Santamaría et al., 2018, p. 3). Además, se han reportado en los pacientes reacciones adversas como: náuseas, vómito, mareo, cefalea, pérdida de peso, depresión, insomnio, somnolencia. etc.; con lo que se limita a tratamientos cortos (Terapéutico, 2012).

Las Amaryllidaceae constituyen una familia vegetal perteneciente a las monocotiledóneas del orden Asparagales, que comprende 70 géneros y cerca de 1600 (Acosta, 2012, p. 1) especies que se distribuyen en regiones tropicales, subtropicales y zonas templadas, encontrándose en Sudamérica, Sudáfrica y la Región Mediterránea (Rønsted et al., 2012). Debido a la belleza de sus flores actualmente se las cultiva con fines ornamentales; sin embargo, desde hace más de un siglo ha recibido una atención especial debido a sus propiedades terapéuticas (Bastida, Lavilla y Viladomat, 2006, p. 3).

La familia *Amaryllidaceae* es conocida por su alto contenido de alcaloides, encontrándose en muchos de ellos propiedades farmacológicas interesantes como: antiviral, inmunoestimulante, antitumoral e inhibición de acetilcolinesterasa (AChE), (Pagliosa et al., 2010). Los alcaloides de las *Amaryllidaceae* se agrupan en nueve tipos: norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, haemantamina, narciclasina, tazetina, montanina y galantamina (Bastida et al., 2011, p. 2), reportado en condiciones in-vitro.

En 1877 la licorina fue el primer alcaloide aislado de la familia Amaryllidaceae, a partir de la especie *Narcissus pseudonarcissus* (Bastida, Lavilla y Viladomat, 2006, p. 3-4). Posteriormente en 1952 se aisló por primera vez el alcaloide galantamina del bulbo de *Galanthus woronowii*, luego de descubrirse su actividad farmacológica como inhibidor de la acetilcolinesterasa y potencial uso en el tratamiento para la Enfermedad de Alzheimer, siendo actualmente el activo más utilizado (Colomer, 2005, p. 4).

En el año 2012 Ortiz, realizó un estudio con las especies *Jamesonii Habranthus*, *Phycella herbertiana*, *Rhodophiala mendocina*, y *Filifolia zephyranthes* endémicas de Argentina, buscando crear nuevas fuentes de galantamina debido a que la producción mundial no es suficiente para abastecer las necesidades de las personas que padecen de la Enfermedad de Alzheimer, para lo que utilizó el método espectrofotométrico de Ellman et al (Ellman et al., 1961) realizando un ajuste que le permitió evaluar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa; con lo que encontró que la mayor actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa pertenecía a la especie *Filifolia zephyranthes* por su contenido de galantamina de 17,8 % y la de menor actividad *Rhodophiala mendocina* con un 0,6% de galantamina (Ortiz et al., 2012).

Dentro esta familia botánica se encuentra la especie *Ismene narcissiflora*, presente en Ecuador, la cual no presenta investigaciones fitoquímicas ni farmacológicas, sino que cuenta únicamente con

un estudio de una descripción leve realizada por Hanks y Jones en su artículo “*The growth and flowering of Hymenocallis × festalis* “ (Hanks y Jones, 1987, p. 3).

Además, esta investigación está enmarcada dentro del Proyecto de la Red CYTED 416RT0511 “La Biodiversidad Iberoamericana como Fuente de Recursos Naturales para su Explotación Sostenible (BIFRENES)”, coordinado por la Universitat de Barcelona.

Para ello, la investigación cuenta con los permisos dentro del contrato macro de acceso a los recursos genéticos del programa de investigación científica denominado “Estudio de la Biodiversidad en el Ecuador, ecología, conservación y su potencial uso sostenible”; bajo el código MAE-DNV-CM-2018-0086.

El presente trabajo de investigación, está encaminada a buscar especies nativas del Ecuador que posean un potencial farmacéutico contra la enfermedad del Alzheimer, cuyo propósito es mejorar la calidad de vida de la población, tanto paciente como familiares y contribuir a la comunidad científica.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

- Determinar la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *Ismene narcissiflora* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

Objetivos Específicos

- Obtener el extracto bruto de alcaloides a partir de los bulbos de la especie *Ismene narcissiflora*, mediante un protocolo basado en cambios de pH y uso de solventes orgánicos.
- Identificar los alcaloides que contiene el extracto mediante Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas.
- Evaluar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa mediante el método colorimétrico de Ellman con modificaciones de Ortiz (2016), usando como compuesto de referencia la galantamina.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Familia Amaryllidaceae

Amaryllidaceae es una familia de plantas pertenecientes al orden *Asparagales* dentro del grupo de las Monocotiledónea, siendo plantas herbáceas, perennes, de raíz bulbosa y flores vistosas el fruto se encuentra en una baya. Se conoce que existen 70 géneros y 1600 especies distribuidas principalmente en América del Sur, Sur de África, la región mediterránea y el Cáucaso (Acosta, 2012, p. 1).

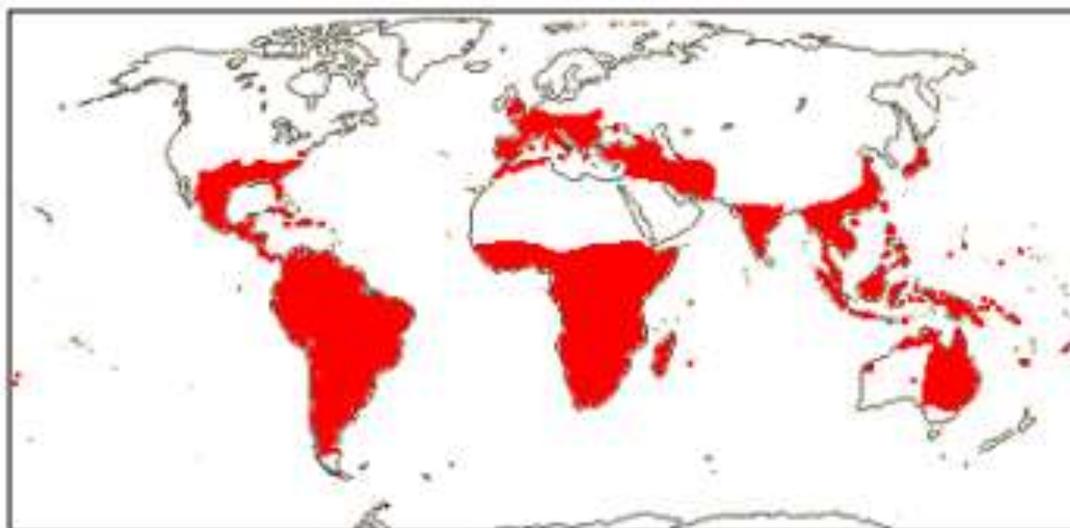


Figura 1-1. Distribución de la familia Amaryllidaceae

Fuente: (Androceo y Planta, 1968)

1.1.1 Género *Ismene*

El género *Ismene* pertenece a la familia Amaryllidaceae, comprende 10 especies. Meerow en 1990 las separó del género *Hymenocallis*. Se caracterizan principalmente por su pseudostema que se forma a partir de vainas de hojas alargadas. Sus flores aparecen colgantes, mismas que contienen rayas verdes en su copa estaminal (Pacific Bulb Society, 2017).

Las especies son endémicas de Asia, Australia, el Caribe, Perú, Bolivia y Estados Unidos, siendo plantas deciduales ya que tienen períodos de descanso en épocas de sequía (Pacific Bulb Society, 2017).

1.1.1.1 Ismene narcissiflora



Figura 2-1. *Ismene narcissiflora*

Fuente: Segovia, Eduardo, 2019

Taxonomía

Tabla 1-1: Taxonomía *Ismene narcissiflora*

Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Tracheophyta.</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Orden	<i>Asparagales</i>
Familia	<i>Amaryllidaceae</i>
Genero	<i>Ismene</i> Salisb. Ex Herb
Especie	<i>Ismene narcissiflora</i>

Fuente:(Integrated Taxonomic., 2000)

Realizado por: Segovia, Eduardo, 2019

Esta especie se caracteriza principalmente por una copa estaminal más larga que los filamentos inflexos. Distribuida en Reino Unido, Perú y Bolivia, crecen al aire libre (Jones, 1987)

1.1.2 Alcaloides de las Amaryllidaceae

La familia *Amaryllidaceae* presenta un alto contenido de alcaloides y se ha logrado aislar alrededor de 300 compuestos. Desde hace muchos años se los ha utilizado como medicina, demostrando que tienen una gran actividad en el sistema nervioso central, para el manejo de la pérdida de la memoria, la ansiedad y trastornos depresivos (Escobar, 2014).

Los alcaloides de *Amaryllidaceae* poseen una amplia gama de actividades biológicas, que incluyen antivirales, antiparasitarias, anticancerígenos y anticolinesterasas. La licorina fue el primer alcaloide extraído de la especie *Narcissus pseudonarcissus* en 1877, mostrando una actividad citotóxica contra *Trichomonas vaginalis* (Torras-Claveria et al., 2014).

El principal alcaloide con uso farmacológico reconocido fue la galantamina, aislada de *Galanthus woronowii* en 1952. Además, fue aprobado por la FDA para ser comercializado como tratamiento paliativo en la Enfermedad de Alzheimer. (Tallini, 2018, p. 2).

En general, los alcaloides de *Amaryllidaceae* están clasificados en nueve grupos: norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, haemanthamina, narciclasina, tazettina, montanina y galantamina. Todos estos alcaloides se originan de la O-metilnorbelladina (Bastida et al., 2011, p. 3).

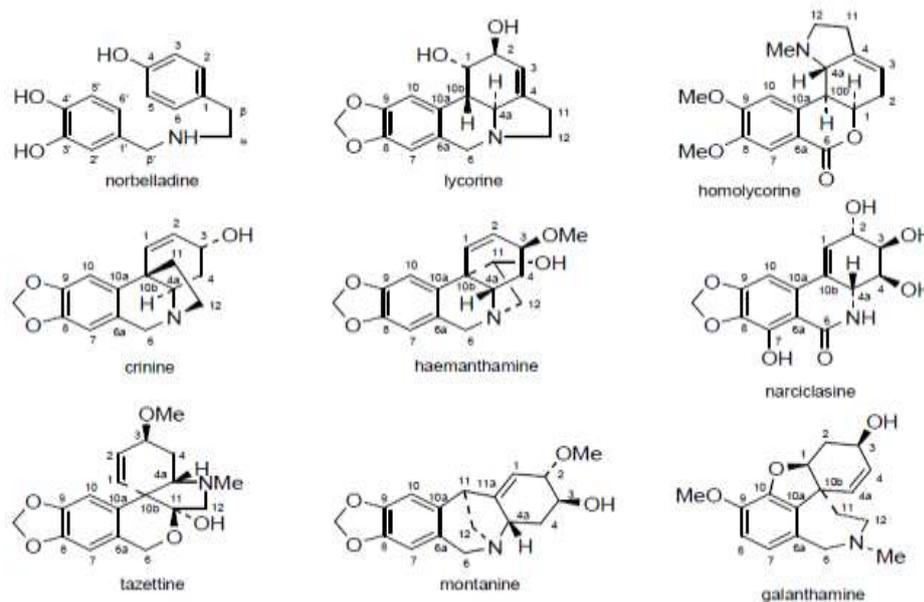


Figura 3-1. Tipos de alcaloides de *Amaryllidaceae*

Fuente: (Bastida et al., 2011)

1.2 Enfermedad de Alzheimer

El Alzheimer es una enfermedad clínico-patológica degenerativa y progresiva, caracterizada principalmente por la pérdida de la memoria; debido a una aparición de ovillos neurofibrilares y placas neuríticas en el cerebro. (Brescané, Morales Delgado y Tomé Carruesco, 2013).

Hay dos características patológicas en el cerebro de individuos con Alzheimer: **a.** placas amiloides extracelulares y **b.** ovillos neurofibrilares intracelulares. Estos fueron reconocidos por primera vez en 1906 por Alois Alzheimer científico al que se le atribuye el nombre de la enfermedad. Ahora se conoce que las placas se componen en gran parte de los péptidos beta-amiloide ($A\beta$) derivados de la proteína precursora de amiloide (APP), mientras que los ovillos neurofibrilares están compuestos de la proteína Tau (microtúbulos asociados a proteína). A medida que avanza la enfermedad, estas patologías progresan junto con la contracción del cerebro debido a la atrofia neuronal (Fish et al., 2018, p. 3).

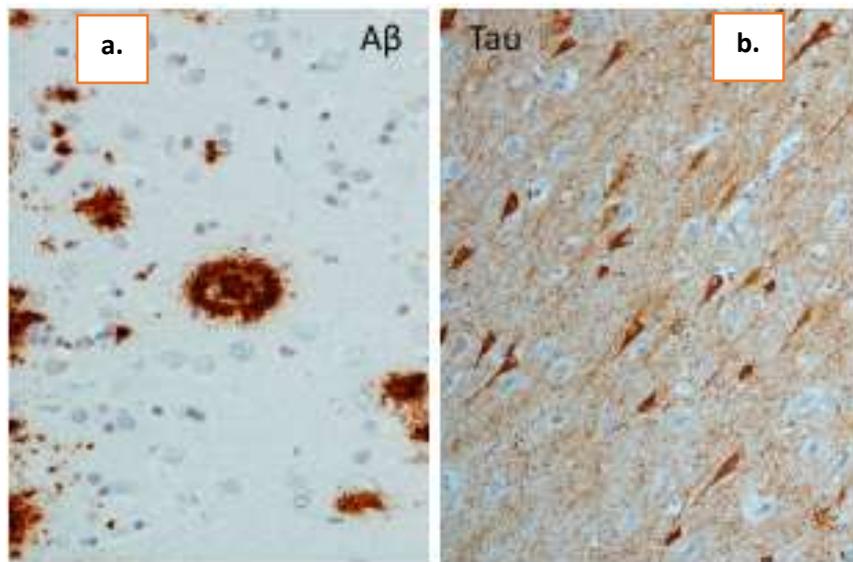


Figura 4-1. a. Péptidos beta-amiloide ($A\beta$) y b. Proteína Tau

Fuente:(Fish et al., 2018, p. 2)

La enfermedad en su etapa temprana muestra pérdida de memoria a corto plazo y conforme avanza los síntomas incluyen problemas de lenguaje, desorientación, cambios de humor y problemas de conducta (agitación, cambios en el sueño, psicosis). Eventualmente, la enfermedad progresa a la pérdida de la función corporal y en última instancia a la muerte (Fish et al., 2018, p. 2).

1.2.1 Hipótesis de la aparición de la Enfermedad de Alzheimer

1.2.1.1 Hipótesis colinérgica

Peter Davies en 1976, descubrió una relación entre los síntomas de la enfermedad y el déficit colinérgico en los cerebros de personas con la Enfermedad de Alzheimer. En su hipótesis observó un déficit de acetilcolina en el hipocampo, debido a una baja producción de este neurotransmisor o a una alta actividad por parte de la enzima acetilcolinesterasa. Esta escasa concentración del neurotransmisor provoca un deterioro de la neurotransmisión colinérgica ocasionando la pérdida de capacidades intelectuales. Es decir que el estado de la memoria en la EA mejorará con un aumento en la sinapsis colinérgica (Singh et al., 2013, p. 166).

1.2.1.2 Hipótesis amiloidea

La proteína beta-amiloide (A β) forma las fibrillas de las placas neuríticas, por ello esta hipótesis considera que la EA es causada por un procesamiento anormal de b-amiloide. Esto se debe a que puede formar especies neurotóxicas (APP, ApoE4, PS1 y PS2, y SORL1), que ocasionan una apoptosis celular e inician una cascada neurotóxica, que conducen a una neurodegeneración propia de la EA. Los primeros pasos de esta enfermedad son: desequilibrio oxidativo, estrés oxidativo y cambios funcionales en la producción de esta proteína. Por lo tanto, los inhibidores de la agregación b-amiloidea muestran gran interés para tratar la EA en sus etapas tempranas (Singh et al., 2013, p. 167).

1.2.1.3 Hipótesis Tau

En 1985, Brion y André Delacourte sugieren por primera vez que la proteína tau podría ser el componente principal de los ovillos neurofibrilares. Ya en 1988, Michel Goedert y colaboradores clonan el ADNc y PHF-tau. Las proteínas tau abundan en el sistema nervioso central y tienen la función de estabilizar los microtúbulos. La hipótesis explica que debido al acoplamiento de una proteína alterada (tau hiperfosforalizada) a otros hilos de tau, conlleva a la formación de nudos neurofibrilares dentro de las neuronas, ocasionando una desintegración de los microtúbulos y colapsando el sistema de transporte de la neurona. Esto puede afectar a la comunicación bioquímica entre células nerviosas y luego a la muerte celular (Singh et al., 2013, p. 167).

1.2.2 Etapas del Alzheimer

- **Etapa inicial**, presenta síntomas leves, como pérdida de la memoria y dificultad para formar pensamientos claros.
- **Etapa intermedia**, en esta etapa la persona no puede reconocer a sus familiares y se olvida de cosas sencillas como vestirse o bañarse.
- **Etapa final**, pérdida completa de la memoria, juicio y razón, etapa en la que la persona necesitará de ayuda permanente para realizar todas sus actividades cotidianas (Laboratorios WYETH S.A, 2010).

1.2.3 Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer

Las terapias aprobadas actualmente son tratamientos sintomáticos que tienen algún efecto sobre la función cognitiva. Las terapias dirigidas al β -amiloide ($A\beta$) han sido el foco de los esfuerzos para desarrollar un tratamiento de modificación de la enfermedad de Alzheimer, pero estos enfoques no han demostrado ningún beneficio clínico hasta el momento. Más allá de la “hipótesis $A\beta$ ”, hay una serie de enfoques más nuevos para tratar la enfermedad de Alzheimer con neuroinflamación que emerge como un área muy activa de investigación basada en el análisis de genes de riesgo (Fish et al., 2018).

1.2.3.1 Terapias aprobadas

Actualmente no hay tratamientos aprobados que se dirigen directamente a la enfermedad de Alzheimer. Los tratamientos existentes son sintomáticos, encaminados a mejorar la función cognitiva a través de dos modos diferentes de acción: agonismo del sistema colinérgico y el antagonismo de la N- metil- D aspartato (NMDA-receptor). Actualmente, existen tres inhibidores de la colinesterasa aprobado por la FDA: rivastigmina, donepezilo, y galantamina (Fish et al., 2018, p. 2-3).

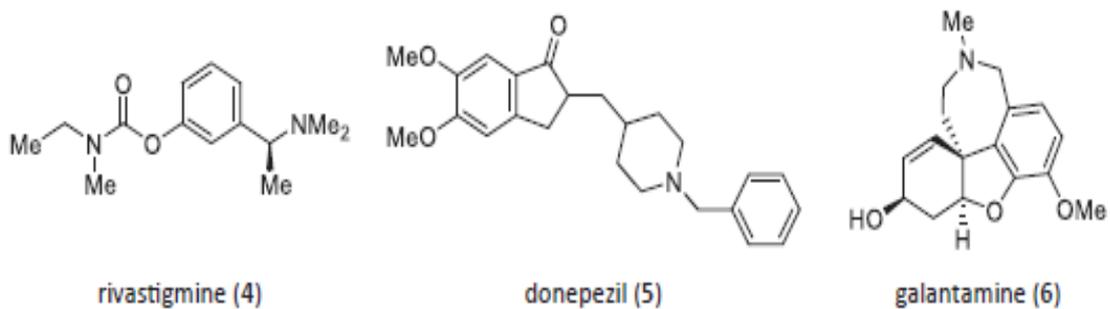


Figura 5-1. Inhibidores de la colinesterasa aprobados por la FDA

Fuente: (Fish et al., 2018)

a. Donepecilo

Es un medicamento aprobado para la enfermedad de Alzheimer. Es un inhibidor selectivo y reversible de la acetilcolinesterasa, presentando menos afinidad con la butirilcolinesterasa. La dosis de administración resulta muy cómoda y posee una vida media plasmática de 70 horas, no produce hepatotoxicidad, se une a proteínas en un 95 % y se metaboliza por vía renal y hepática. Al inicio de tratamiento la dosis es de 5 mg/día, hasta alcanzar una dosis de 10mg/día luego de un mes iniciado el tratamiento (López Locanto, 2015).

b. Galantamina

Medicamento aprobado para el Alzheimer, inhibe la acetilcolinesterasa de forma competitiva, selectiva y reversible, y también mediante modulación alostérica de los receptores nicotínicos, aumentando la actividad de la acetilcolina sobre estos receptores. Posee una unión a proteínas del 18% y su metabolismo es hepático. Su semivida de eliminación es del 7 a 8 horas. La dosis de inicio de tratamiento es de 2 a 4 mg/día, al mes de iniciado el tratamiento y en las presentaciones que no son de liberación prolongada se debe administrar 4 mg 2 veces por día, aumentando progresivamente mes a mes hasta llegar a 12 mg cada 12 horas, siendo éste el objetivo terapéutico. No se le debe asociar a fármacos de tipo succinilcolina durante la anestesia ya que corre el riesgo de aumentar la relajación muscular (López Locanto, 2015).

c. Rivastigmina

Medicamento aprobado para el Alzheimer leve a moderado, es un inhibidor pseduoreversible de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, con acción en el hipocampo y el córtex. Inhibe colinesterasa principalmente del sistema nervioso central, actuando fundamentalmente sobre la forma G1 de interés farmacológico para los pacientes con Alzheimer. Posee una unión a proteínas del 40%, metabolismo hepático y eliminación renal. No se le debe asociar a fármacos de tipo succinilcolina durante la anestesia ya que corre el riesgo de aumentar la relajación muscular. Se debe iniciar con una dosis de 1,5 mg dos veces por día, aumentando la dosis 1,5mg más cada 15 días, hasta llegar a 6 mg cada 12 horas. Actualmente existen los parches transdérmicos que poseen una concentración de activo de 9 a 18 mg (López Locanto, 2015).

1.2.4 Galantamina y la Enfermedad de Alzheimer

La galantamina es un alcaloide terciario aislado del bulbo de *Galanthus woronowii* en 1952. Años más tarde se descubre que posee una actividad anticolinesterásica que ayudaba a revertir los efectos de los anestésicos generales (Colomer, 2005).

La galantamina es un inhibidor de larga acción, selectivo, reversible y competitivo de acetilcolinesterasas. Además, estas enzimas son responsables de la degradación de acetilcolina en la unión neuromuscular periférica y central, así como la sinapsis colinérgica en órganos diana parasimpáticos. La galantamina puede atravesar la barrera hematoencefálica y actuar a nivel de Sistema Nervioso Central (Bastida et al., 2011).

1.2.4.1 Mecanismos de Acción

La galantamina actúa en la sinapsis colinérgica en diferentes niveles:

a. Inhibición de la Acetilcolinesterasa (AChE)

Actúa inhibiendo de manera competitiva y reversible la AChE, ocasionando una elevación en la cantidad de acetilcolina para la respuesta sináptica. La galantamina tiene una alta selectividad por la acetilcolinesterasa (Colomer, 2005, p. 2).

b. Modulación alostérica del receptor nicotínico (APL)

Este mecanismo de acción se basa en potenciar la respuesta de acetilcolina independientemente de una inhibición de acetilcolinesterasa. La galantamina se une al sitio alostérico, distinto al sitio de unión de la acetilcolina. Cuando estas sustancias se unen simultáneamente a sus sitios de unión, el receptor nicotínico presináptico hace más sensible a la acetilcolina amplificando su respuesta al incrementar su liberación en la terminal sináptica. Este mecanismo aumenta la neurotransmisión nicotínica, denominándose regulación alostérica positiva de los receptores nicotínicos (Colomer, 2005).

1.2.5 Neurotransmisores de la respuesta colinérgica

1.2.5.1 Acetilcolina

Neurotransmisor descubierto en 1921 por Otto Loewl y caracterizado en 1929, lleva el nombre de acetilcolina (ACh) debido a que su estructura formado por un éter de ácido acético y la colina. Se le ha asociado a los receptores muscarínicos y nicotínicos responsables de la transmisión colinérgica (Sanabria-castro, 2017).

La ACh puede actuar como excitador o inhibidor según el órgano en el que actúa, a nivel central regula la función central extrapiramidal y posee un efecto en los ganglios basales que contrarresta la acción inhibitoria de la dopamina: en la actividad colinérgica es fundamental por su función a nivel cognitivo (Sanabria-castro, 2017).

1.2.6 Enzimas inhibidoras de la respuesta colinérgica

1.2.6.1 Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima del grupo de las hidrolasas, descubierta en la década de 1930, presente en el sistema nervioso y músculos de vertebrados, encontrándose también en organismos unicelulares, plantas e invertebrados; cuya función es regular la concentración de acetilcolina (ACh) durante la sinapsis colinérgica, ocasionando una repolarización de la membrana basal de modo que prepara al receptor para la llegada del nuevo impulso nervioso en el sistema nervioso central y periférico (Sánchez-Chávez y Salceda, 2008, p. 4).

La acetilcolinesterasa (AChE) ha sido caracterizada en cuanto a su sitio activo, y se ha demostrado que posee zonas activas que participan en la hidrólisis de la acetilcolina (ACh). La zona más activa conocida como sitio esterático, formando por: Ser 200, His 400 y Glu 327. Los residuos de Trp 84, Tyr 121 y Phe 330 del neurotransmisor son los responsables de dar la orientación al neurotransmisor durante la hidrólisis, facilitando que la acetilcolina se divida en colina y acetato durante la sinapsis. Siendo las otras dos zonas la cavidad aromática y el subsitio periférico aniónico (Castellanos, 2014, p. 2).

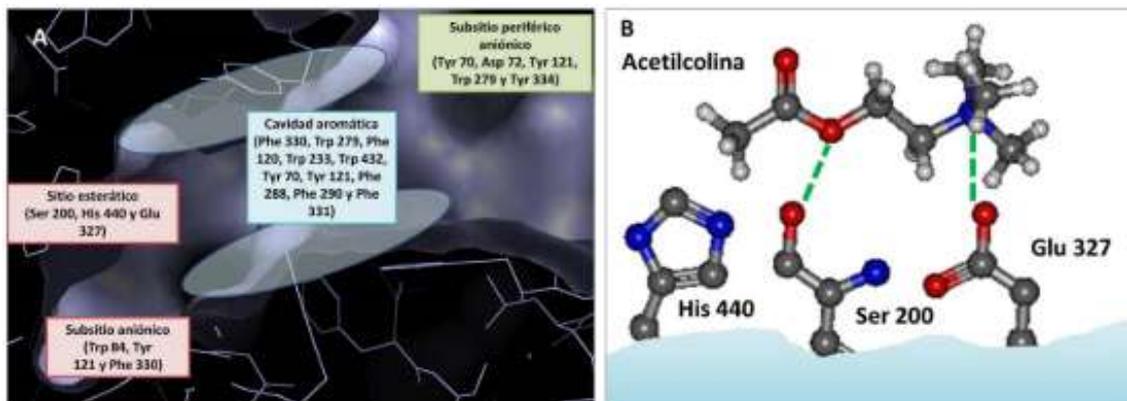


Figura 6-1. A) Diferentes subsitios presentes en la cavidad del sitio activo. B) Disposición de la acetilcolina en el sitio activo de la enzima, en donde ocurre la hidrólisis del neurotransmisor

Fuente: (Castellanos, 2014, p. 2)

1.2.6.1.1 Inhibidores de Acetilcolinesterasa

Son compuestos que interactúan con la cavidad del sitio activo de la enzima dando lugar a una inhibición, con lo que altera la sinapsis colinérgica. Y se los clasifica en tres grupos (Castellanos, 2014).

- a) **Compuestos que interactúan con el sitio activo:** la interacción de este tipo se debe a toxinas, pesticidas y agentes nerviosos: como es el caso de carbamatos y organofosforados (Sanabria-castro, 2017). Un ejemplo atípico de este grupo es la galantamina que interactúa tanto con el sitio activo y la cavidad aromática, de manera reversible, por lo que es usada como medicamento en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Castellanos, 2014, p. 3)

- b) **Compuestos que interactúan con la cavidad aromática,** los compuestos que interactúan en esta zona también lo hacen con el sitio activo. Entre los compuestos más representativos están la galantamina y decametonio, este último usado como anestésico muscular (Castellanos, 2014).

- c) **Compuestos que interactúan con el subsitio periférico aniónico,** es uno de los principales sitios que se han estudiado para encontrar un medicamento para la enfermedad de Alzheimer, gracias a que la formación de placas amiloides en las redes neuronales pueden ser aceleradas por la interacción con el subsitio periférico aniónico, sin embargo, esta aproximación no puede considerarse una cura para la Enfermedad de Alzheimer. Los compuestos que interactúan con este subsitio destacan la huperzina A y donepezilo, medicamentos que son comercializados para tratar el Alzheimer, ya que presentan pocos efectos secundarios (Castellanos, 2014).

Acetilcolinesterasa y la Enfermedad de Alzheimer

La acetilcolinesterasa (AChE) se relaciona con la Enfermedad de Alzheimer (EA), debido a que la enfermedad ocasiona un deterioro de las funciones de los neurotransmisores, en este caso la baja cantidad de Acetilcolina (ACh) que llega a la corteza cerebral, afectando principalmente a los receptores nicotínicos y en menor cantidad a los receptores muscarínicos. Por ello la mayoría de los medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer son compuestos de este tipo, destacando la galantamina, donepezilo y la rivastigmina. Dichos compuestos pueden atravesar la barrera hematoencefálica cuya función es disminuir la actividad de la acetilcolinesterasa para aumentar la concentración de acetilcolina, mejorando la transmisión sináptica y con ellos los procesos cognitivos y estímulos musculares, mejorando así la calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad (Castellanos, 2014).

1.2.6.2 Butirilcolinesterasa

La Butirilcolinesterasa (BuChE) es una enzima sintetizada en el hígado que circula en el plasma sanguíneo, cuya función es hidrolizar ciertos esteres de colina, como la procaína, tetracaína y aspirina. Esta función disminuye cuando existe una alteración hepática a nivel de los hepatocitos (Vásquez, Osorio y Sandoval Vegas, 2000).

Esta enzima cataliza la hidrolisis de la butirilcolina y succinilcolina, y en menor cantidad de la acetilcolina, teniendo gran importancia en el estudio de la sinapsis colinérgica y con ello la búsqueda de un tratamiento para la Enfermedad de Alzheimer (Sánchez-Chávez y Salceda, 2008)

1.3 Método Ellman.

Este método es un ensayo colorimétrico, el cual mide el incremento en el color amarillo producido por tiocolina producto de una hidrolisis de acetilcolina por acción de acetilcolinesterasa o butirilcolinesterasa. Cuando la tiocolina reacciona con el tiol ion 5,5 -ditiobis-2-nitrobenzoto; produciendo un anión de color amarillo el ácido 5-tio-2-nitro-benzoico, mismo que se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm (Ellman et al., 1961).

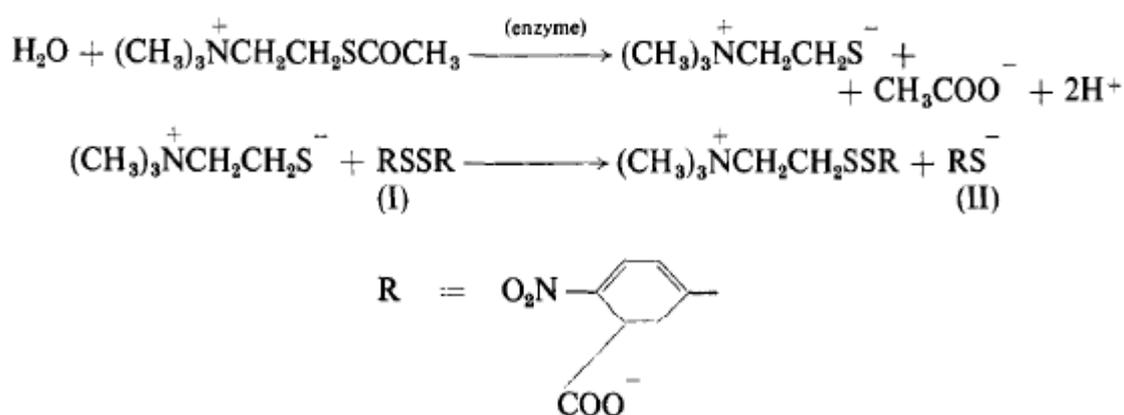


Figura 7-1. Reacción de tiocolina por el Método de Ellman

Fuente: (Ellman et al., 1961)

1.4 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

La cromatografía de gases es una técnica de separación de mezclas complejas volátiles. Pero una vez separados, detectados e incluso cuantificados, todos los componentes de la muestra no pueden ser identificados, debido a que muchos de estos compuestos tienen tiempos de retención similares para cada uno de los picos cromatográficos (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Por otro lado, la espectrometría de masas puede identificar cualquier sustancia pura, pero no lo hace de la misma manera con compuestos individuales de una mezcla sin separación previa, debido a la complejidad del espectro obtenido por la superposición de los espectros de cada componente (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Por lo tanto, la mezcla de cromatografía de gases y espectrometría de masas, permite la separación e identificación de mezclas complejas. Para acoplar estas dos técnicas se necesita de un sistema especial de conexión. Estas técnicas trabajan en fase gaseosa y necesitan poca muestra para el análisis, siendo muy compatibles. El único inconveniente que presenta es el acoplamiento del efluente que emerge de la columna cromatográfica a presión atmosférica que luego debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja al alto vacío (Andrés, 2011).

1.4.1 Mecanismo de Funcionalidad

La mezcla de compuestos que es inyectada en el cromatógrafo de gases y es separada en columna cromatográfica, mediante eluciones sucesivas de los componentes individuales, que luego pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de los componentes corresponde a un pico cromatográfico que posteriormente es identificado mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso, el espectrómetro de masas no solo proporciona los espectros, sino que actúa también como un detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o TIC (total ion current). Cuando se desea identificar uno o varios compuestos específicos, con mayor rapidez o con la mayor sensibilidad posible se utiliza la técnica de detección SIR (selected ion recording), de modo que se aumenta la selectividad del método y se reducen las interferencias (Gutiérrez y Droguet, 2002).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de la investigación

El presente trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y el análisis mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) fue llevado a cabo en colaboración con la Universidad de Barcelona (España).

2.2 Recolección del material vegetal

La especie *Ismene narcissiflora* en estado de floración se recolectó en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en el cantón Riobamba a 2754 metros sobre el nivel del mar en la provincia de Chimborazo.

2.3 Identificación botánica

La identificación botánica de la planta la realizó la Dra. Nora Oleas, botánica responsable del Herbario de la Universidad Tecnológica Indoamérica (Quito- Ecuador).

2.4 Equipos, materiales y reactivos

2.4.1 Equipos

Tabla 1-2: Equipos utilizados

EQUIPOS	PROCEDIMIENTO
Estufa de secado RedLine by Binder	Secado de la droga vegetal. Reducción del volumen de alcaloides.
Molino Arthur H. Thomas C.O	Reducción del tamaño de droga seca
Balanza analítica HDM	Pesaje
Agitador magnético	Preparación de reactivos
Refrigerador	Conservación de reactivos

Congelador	Conservación de reactivos
Sonicador	Obtención de extracto crudo
Rotavapor	Concentración de extractos
pH-metro	Extracción de alcaloides
Espectrofotómetro Elisa BioTek Elx800	Determinación de la actividad inhibitoria de colinesterasa.
Cabina de flujo laminar BIOBASE	
Agitador de tubos	
Agitador de microplacas	
Cronómetro	
Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM)	Identificación de alcaloides

Realizado por: Segovia, Eduardo, 2019

2.4.2 *Materiales*

Tabla 2-2: Materiales utilizados

MATERIALES	PROCEDIMIENTO
Balones de aforo 10, 100 mL	Preparación de reactivos
Pipeta graduada 1, 5 mL	
Pipetas volumétricas 10 mL	
Probeta 25, 100 mL	
Espátula y micro espátula	
Frascos plásticos tipo viales 5 mL	
Frascos ámbar de vidrio 500, 1000 mL	
Probeta 10, 50 mL	Extracción de alcaloides
Papel filtro	
Embudo y trípode	
Balón para rotavapor	
Embudo de separación 500 mL	
Vaso de precipitación 100, 250, 500 mL	
Frasco de vidrio tipo vial 10 mL	
Desecador	
Tubos eppendorf para microcentrífuga 0,5 y 1,5 mL	Determinación de la actividad inhibitoria de colinesterasa
Tubos plásticos graduados con tapa rosca 35 mL	
Puntas amarillas, azules, blancas para Micropipeta	
Microplacas de 96 pocillos	
Dispensador de líquido para pipeta multicanal	
Bloques de hielo reutilizables	
Caja térmica de poliestireno expandido 4, 19 L	
Gradillas para tubos	
Cajas porta-tubos	
Toallas de papel tipo tissue y toalla	

Papel aluminio	
Piseta	

Realizado por: Segovia, Eduardo, 2019

2.4.3 Reactivos

Tabla 3-2: Reactivos utilizados

REACTIVOS	PROCEDIMIENTO	
Metano CH ₄ O	Obtención de extracto crudo	
Ácido sulfúrico H ₂ SO ₄ (2 % V/V)	Extracción de alcaloides	
Éter etílico (C ₂ H ₅) ₂		
Hidróxido de amonio NH ₄ OH 25 % V/V)		
Acetato de etilo C ₄ H ₈ O ₂		
Sulfato de sodio anhídrido Na ₂ SO ₄		
Goma arábiga		
Fosfato dipotásico K ₂ HPO ₄		Determinación de la actividad inhibitoria de colinesterasa
Bifosfato de sodio NaH ₂ PO ₄		
Cloruro de sodio NaCl		
Fosfato de disodio Na ₂ HPO ₄		
Ácido clorhídrico 0.5 N (HCl)		
Acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus electricus</i>		
Butirilcolinesterasa de suero equino		
Acido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)		
Yoduro de acetilcolina		
Yoduro de butirilcolina		
Galantamina pura		
Agua destilada	Preparación de reactivos y lavado de materiales	
Agua grado farmacéutico		

Realizado por: Segovia, Eduardo, 2019

2.5 Acondicionamiento del material vegetal

Se utilizaron como material vegetal los bulbos de *Ismene narcissiflora*, los cuales fueron limpiados y cortados en trozos de un tamaño aproximado de 2 centímetros, y, posteriormente, se secaron a 60 °C en la estufa RedLine by Binder por 48 horas. Transcurrido el tiempo de secado, se utilizó un molino de cuchillas giratorias marca Arthur h Thomas CO., para molerlo.

2.6 Extracción de alcaloides

Una vez seca y triturada la planta, se pesaron 20 g. de bulbo para macerar con 800mL de metanol, dejando en reposo durante 72 horas y, además para conseguir un macerado más óptimo se hicieron baños de ultrasonido de 1 o 2 horas. Posteriormente, se filtró el extracto y se evaporó el solvente

a presión reducida empleando el rotavapor a una temperatura de 50 °C, obteniendo el extracto crudo.

A continuación, se acidificó el extracto crudo con H₂SO₄ (2 % v/v) y se realizó su limpieza con éter etílico cuyo fin fue separar la fase orgánica que contenía materias neutras (clorofilas, ceras, mucílagos) de la fase acuosa, rica en alcaloides (Acosta, 2012).

La fase acuosa ácida obtenida se sometió a un proceso de basificación con NH₄OH (20 % v/v) hasta conseguir un pH 10, para la posterior extracción de los alcaloides se utilizó acetato de etilo, de manera que los alcaloides quedaron retenidos en la fase orgánica (Acosta, 2012, p. 14).

A la fase orgánica obtenida se adicionó, sulfato de sodio anhidro y goma arábiga, para eliminar restos de agua que pudieran haber quedado y se filtró para separar el extracto de los residuos sólidos. Inmediatamente, se evaporó el solvente a presión reducida empleando rotavapor a una temperatura de 50 °C, obteniendo así un extracto rico en alcaloides.

Finalmente, el extracto purificado se disolvió en un pequeño volumen de metanol, colocando la muestra en un envase nuevo, para su evaporación en una estufa de secado RedLine by Binder, durante 24 horas, para luego ser conservado a 24 °C.

El proceso de extracción de alcaloides de *Ismene narcissiflora* se realizó de acuerdo al esquema expuesto en la figura 1-2

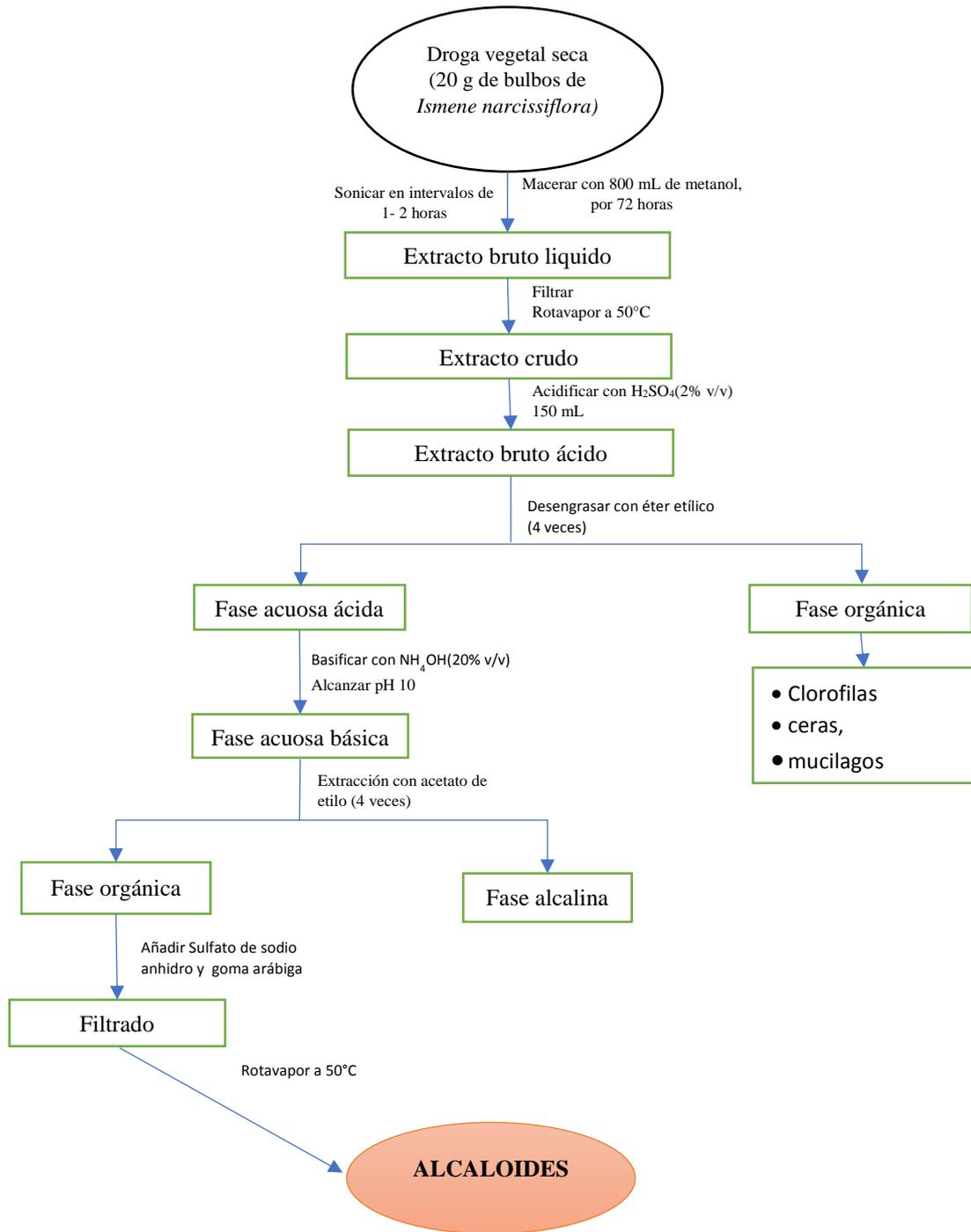


Figura 1-2: Esquema para la extracción de alcaloides de *Ismene narcissiflora*

Fuente: (Acosta, 2012)

Realizado por: Segovia, Eduardo, 2019

2.7 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

Para la identificación de los alcaloides presentes en la especie vegetal *Ismene narcissiflora* se utilizó el método de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. Para ello se utilizó el dispositivo Cromatógrafo de Gases Agilent, modelo 6890, acoplado a un espectrómetro de masas, modelo 5975, el cual funcionó a 70 eV y la fuente iónica a 230 °C.

El aparato de cromatografía utilizado posee una columna SAPIENS-XS_MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), funciona con una fase estacionaria de fenilmetilsilicona al 5%. Los cambios de la temperatura que se utilizó durante el proceso fueron:

- Aumento de la temperatura desde 55 °C hasta 100 °C (60 °C/min)
- Dos minutos a 100 °C
- Aumento de 100 °C hasta 180 °C (15 °C/min)
- Un minuto a 180 °C
- Aumento de 180 °C hasta 300 °C (5 °C/min)

El inyector trabajó a 280 °C, con un flujo de helio de 0,8 mL/min, además, para incrementar la sensibilidad del este método, se usó *splitless*, el cual permite una mayor eficacia en comparación a otras técnicas de inyección.

Se utilizó como referencia a la galantamina (0,05 mg/mL). En el análisis de datos se ocupó el software AMDIS 2,71 (nist), para corroborar la pureza de las señales y establecer los índices de retención.

2.8 Preparación de muestra de alcaloides y compuesto de referencia

2.8.1 Muestra de alcaloides de *Ismene narcissiflora*

Se preparó una solución madre de concentración 10 mg/mL para lo cual se pesaron 10 mg del extracto de alcaloides de *Ismene narcissiflora* y se disolvió con 100 µL de metanol aplicando agitación con el vórtex por 10 minutos. Posteriormente se añadieron 900 µL de PBS, y se homogenizó con ayuda de baño ultrasonido y agitador vórtex, se dejó precipitar las partículas para finalmente tomar las alícuotas necesarias para preparar las diluciones correspondientes.

2.8.2 Compuesto de referencia (Galantamina)

Se preparó una solución madre ($3,48 \times 10^{-3}$ M), a partir de la cual se realizaron las siguientes diluciones: 1×10^{-3} ; 1×10^{-4} ; 1×10^{-5} ; $0,5 \times 10^{-5}$; 1×10^{-6} ; $0,5 \times 10^{-6}$ y 1×10^{-7} M.

2.9 Inhibición in vitro de acetil- y butirilcolinesterasa

El ensayo se llevó a cabo en microplaca de acuerdo al método de Ellman et al.,(1961) modificado (Ortiz et al., 2016). Se adicionó 50 μ L de AChE o BuChE disueltas en buffer (8 mM K_2HPO_4 , 2.3 mM NaH_2PO_4 , 0.15 M NaCl, pH 7.6) y 50 μ L de la muestra disuelta en el mismo buffer. Se incubó la placa a 24 °C durante 30 min y se agregó 100 μ L de solución sustrato (acetiltiocolina o butiriltiocolina, 0.1 M Na_2HPO_4 , 0.5 M DTNB, and 0.6 mM ATCI in Millipore water, pH 7.5).

Luego de 5 min, la absorbancia fue leída en un lector de micro placas Thermo Scientific Multiskan FC a 405 nm. La actividad inhibitoria enzimática fue expresada como la concentración a la cual se inhibe el 50% de la actividad enzimática (IC_{50}), se compararon los datos de lectura de las muestras con la lectura de la enzima en buffer sin inhibidor. Los datos de inhibición enzimática fueron analizados con el software Microsoft Excel o Prism (Graph Pad Inc., San Diego, CA, USA).

Las concentraciones de las muestras evaluadas se expresaron como μ g/mL para los extractos y como μ M en el caso de compuestos puros. Los valores calculados de IC_{50} cuyo valor se encontró por encima de 200 μ g/mL para extractos y por encima de 200 μ M para compuestos puros, se consideraron inactivos. Las muestras se evaluaron por triplicado, en tres ensayos independientes y se calculó la desviación estándar

Las enzimas utilizadas fueron AChE de la anguila eléctrica *Electrophorus electricus*, C3389 y BuChE de suero equino (C7512), mientras que los sustratos utilizados en cada caso fueron ioduro de acetiltiocolina (A5751) y ioduro de butiriltiocolina (20820). Para generar la reacción de color se utilizó ácido ditionitrobenzoico (DTNB, D-8130) todos adquiridos a la empresa Sigma-Aldrich.

2.10 Análisis de datos

2.10.1 Porcentaje de inhibición

Las absorbancias obtenidas fueron procesadas en el software Microsoft Excel para obtener el porcentaje de inhibición, aplicando la fórmula:

$$\% I = 100 - \frac{M - MB}{C - BC} \times 100$$

Donde:

M: Lectura de la muestra

C: Lectura del control

BM: Lectura del blanco muestra

BC: Lectura del blanco control

2.10.2 Curva de inhibición para la determinación del IC₅₀

Para obtener el IC₅₀, se realizó una gráfica de la ecuación de la recta, utilizando la concentración del extracto de alcaloides en el eje de las abscisas y el porcentaje de inhibición en el eje de las ordenadas. A continuación, se agregó una línea de tendencia logarítmica para obtener la ecuación de la recta, misma que sirvió para el cálculo del IC₅₀.

El IC₅₀ representa la concentración del extracto que inhibe la enzima en un 50 %. Para determinar este valor se realizó el promedio \pm la desviación estándar de tres repeticiones individuales.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

3.1 Obtención del extracto alcaloidal de *Ismene narcissiflora*

Se pesaron 20 gramos de bulbo seco de *Ismene narcissiflora*, para obtener un extracto rico en alcaloides cuyo peso fue de 49,6 mg., obteniendo un rendimiento de 0,248 %.

El porcentaje de rendimiento permite evaluar cuan efectivo fue el proceso de síntesis, es decir mientras más alto sea el valor, más eficiente es la transformación (Calvo-Flores, 2009, p. 2). Al comparar el porcentaje obtenido de *Ismene narcissiflora* con otras especies endémicas del Ecuador del género *Phaedranassa*: *P. cinérea* 0,11 %; *P. dubia* 0,2 %; *P. cuencana* 0,137 % (Salazar y Acosta, 2017; Inca, 2017; Jaramillo, 2019), y *Crinum amabile* 0,69 % (Carrasco Ruiz, 2017, p. 33). Se puede observar que el rendimiento de las especies del género *Phaedranassa* no supera el 0,2%, a relación de la especie *C. amabile* que posee un rendimiento elevado, siendo este último relativamente similar al obtenido de la especie *Ismene narcissiflora*.

Tabla 1-3: Porcentaje de rendimiento de *Ismene narcissiflora*

Parte utilizada	Muestra seca (g)	Volumen de metanol (mL)	Extracto rico en Alcaloides (mg)	% Rendimiento de Alcaloides
Bulbos <i>Ismene narcissiflora</i>	20	800	49,6	0,248

Realizado por: Segovia, Eduardo, 2019

3.2 Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas

Los resultados obtenidos luego del análisis realizado en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del extracto alcaloidal del bulbo de *Ismene narcissiflora*, se muestra a continuación en la tabla 2-3:

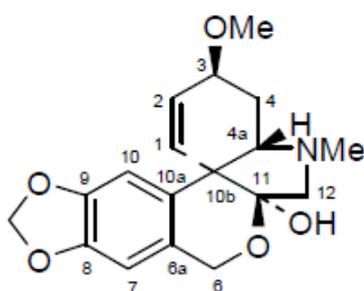
Tabla 2-3: Alcaloides identificados por CG-MS en bulbos de *Ismene narcissiflora*

ALCALOIDES	Rt	RI	TOTAL (µg gal/100mg PS)
Galantamina	22,8158	2424,8	10,1575
Licoramina	23,1728	2448,1	18,9684
Tazetina	26,7476	2685,3	78,2993
O- Metileucotamina	29,9691	2916,8	9,8507

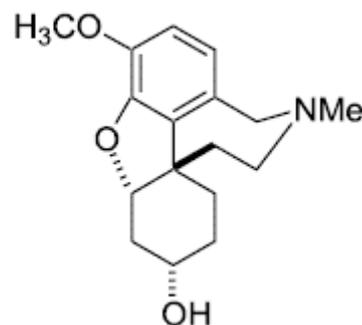
* Rt(tiempo de retención), RI (Índice de retención), %Total (Porcentaje de abundancia respecto a la mezcla total)

Fuente: Universitat de Barcelona

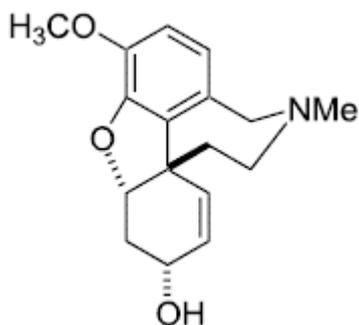
Realizado por: Tallini, Luciana, 2019



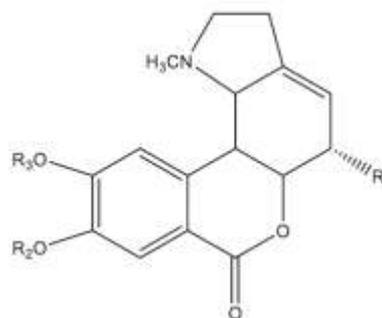
Tazetina



Licoramina



Galantamina



O-metileucotamina

Figura 1-3 Alcaloides identificados por CG-MS en bulbos de *Ismene narcissiflora*

Fuente: (Bastida, Lavilla y Viladomat, 2006; Sarikaya et al., 2013; Iannello et al., 2014)

Los alcaloides identificados por CG-MS del extracto alcaloidal del bulbo de *Ismene narcissiflora*, fueron un total de 4 alcaloides, siendo tazetina el alcaloide más representativo con un 78,29 µg gal/100mg PS, seguido de licoramina con un 18,96 µg gal/100mg PS, galantamina 10,15 µg gal/100mg PS y O- metileucotamina 9,85 µg gal/100mg PS respectivamente.

Tazetina es uno de los alcaloides más ampliamente reportados de la familia de las Amaryllidaceae (Bastida et al., 2011, p. 15), los compuestos de tipo tazetina han sido estudiados para detectar efectos antiplasmodiales (Nair y van Staden, 2019, p. 2). Además presenta una ligera actividad contra ciertas líneas de células tumorales, mostrando actividades hipotensivas y antipalúdicas débiles (Torras-Claveria et al., 2014, p. 3).

Por otro lado un precursor químicamente lábil, la pretazetina resulta más interesante ya que posee actividades antivirales y anticancerígenas, principalmente en enfermedades como: Leucemia de Rauscher, Leucemia linfocítica, carcinoma de pulmón de Lewis, Herpes simple tipo 1 (Bastida et al., 2011, p. 33). Del mismo modo este alcaloide ha sido utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Pagliosa et al., 2010).

En otros estudios realizados se destaca el alto contenido de este alcaloide así por ejemplo, en la especie *Rhodolirium montanum* llega a contener 63,29 % (Del y Lizama, 2017, p. 4); así mismo, en un estudio hecho por Ortiz muestra que la especie *Zephyranthes filifolia* contiene este alcaloide en un 69,7 % (Ortiz et al., 2012, p. 6).

La licoramina y O- metileucotamina son esqueletos simplificado de la galantamina. Como ya se ha mencionado galantamina es un inhibidor de la acetilcolinesterasa, que se usa principalmente para tratar a Enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular (Nagaraj et al., 2018, p. 3).

Nuevos estudios muestran que galantamina posee un efecto sobre la acetilcolinesterasa, que mejoran o inhiben los receptores de acetilcolina nicotínicos cerebrales, logrando un aumento o disminución en su eficacia terapéutica (Moraga-Nicolás et al., 2019), actuando principalmente en áreas de cognición, atención y actividad antineurodegenerativa (Müller et al., 2018).

Acerca de la licoramina y su efecto inhibidor de AChE, viene siendo muy discutida ya que pese a ser un derivado de la galantamina posee baja o nula actividad frente a AChE (Ortiz et al., 2016), esto puede deberse a la aparición de un doble enlace en el anillo C (Bastida et al., 2011, p. 8).

En un estudio realizado por Laura Torras se destaca la presencia de la galantamina en el bulbo con un 40,23 % (Torras-Claveria et al., 2014), así mismo también está presente en especies del género *Phaedranassa*: *P. dubia*(4,54 %), *P. cuencana* (18,90 %), *P. cinerea* (10,24 %), *P. tunguraguae* (0,36 %), (Inca, 2017; Jaramillo, 2019; Salazar y Acosta, 2017; Montero, 2018). Con estos resultados se puede observar que el contenido de galantamina varía de una especie a otra, presentando *P. cinerea* una concentración en galantamina parecida a *I. narcissiflora*.

Además, en un estudio se observó que O- metileucotamina tenía actividad anticolinérgica asociada con la inhibición tanto de AChE como de BuChE (Iannello et al., 2014; Sarikaya et al., 2013, p. 5), destacando que este alcaloide tiene mayor acción sobre BuChE a diferencia de tazetina y sanguinina (Bozkurt et al., 2017, p. 12).

3.3 Actividad inhibitoria de *Ismene narcissiflora* sobre AChE

3.3.1 Primer screening de inhibición de *Ismene narcissiflora* sobre AChE

Como establece Ortiz, el estudio de extractos de plantas debe iniciarse con la evaluación de la especie frente a las enzimas empleando las concentraciones 1, 10, 50, 100 µg/mL. (Ortiz et al., 2016). A partir de estas concentraciones se obtuvieron los porcentajes de inhibición respectivos, que se muestran en la tabla 3-3 a continuación:

Tabla 3-3: Resultados del primer screening de inhibición de *Ismene narcissiflora* sobre AChE

Concentración extracto de alcaloides (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de AChE* (%)
1	11,6827 ± 0,497
10	41,8974 ± 0,881
50	70,1967 ± 0,838
100	82,9524 ± 0,603

* El resultado es la media de tres repeticiones
Realizado por: Segovia, Eduardo, 2019

En la tabla 3-3 se muestran las cuatro concentraciones y los porcentajes de inhibición junto con su desviación estándar respectivos, obtenidos luego del primer screening. Como se observa la concentración máxima del extracto de alcaloides de *Ismene narcissiflora* fue de 100 µg/mL, misma que tuvo un porcentaje de inhibición de 82,9524 ± 0,603 %; mientras que la concentración más baja utilizada fue de 1 µg/mL, cuyo porcentaje de inhibición fue de 11,6827 ± 0,497 %.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se establecieron nuevas concentraciones para un segundo screening, debido que para el cálculo del IC₅₀, la mitad de los valores del porcentaje de inhibición deben estar por encima del 50 %, y la otra mitad por debajo, de modo que permitan garantizar que los resultados obtenidos sean correctos.

Por otro lado, con los resultados obtenidos se establecieron nuevas concentraciones entre los valores de 10 a 50 µg/mL, debido a que en este rango posiblemente se encuentra el valor de IC₅₀.

3.3.2 Segundo screening de inhibición de *Ismene narcissiflora* sobre AChE

Luego del primer screening, se determinaron 7 nuevas concentraciones de: 5; 10; 15; 25; 50; 100; 125 µg/mL. A partir de las cuales se obtuvieron los resultados siguientes.

Tabla 4-3: Resultado segundo screening de inhibición de *Ismene narcissiflora* sobre AChE

Concentración extracto de alcaloides (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de AChE* (%)
5	15,718 ± 0,652
10	33,944 ± 0,359
15	41,781 ± 401
25	53,418 ± 0,984
50	65,979 ± 1,21
100	77,946 ± 0,729
125	83,022 ± 1,784

* El resultado es la media de tres repeticiones

Realizado por: Segovia, Eduardo, 2019

Como se indica en la tabla 4-3, es posible inhibir la actividad de acetilcolinesterasa en un 83,022 ± 1,784 % a una concentración máxima de 125 µg/mL. Como se mencionó anteriormente existe una condición para el cálculo del IC₅₀, por ello al evaluar los porcentajes de inhibición obtenidos demuestran que tres de sus concentraciones se encuentran por debajo (5, 10, 15 µg/mL), del 50%, y las 4 concentraciones restantes se ubican por encima de este (25, 50, 100, 125 µg/mL), dando así cumplimiento a lo establecido para el cálculo óptimo de IC₅₀.

3.3.3 Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides del bulbo de *Ismene narcissiflora* sobre AChE.

Tabla 5-3: Inhibición del extracto alcaloidal de *I. narcissiflora* sobre AChE

COMPUESTO	IC ₅₀ AChE (µg/mL)
Galantamina*	0,585 ± 0,006
Extracto alcaloidal de <i>Ismene narcissiflora</i>	23,543 ± 0,316

*Compuesto de referencia

El resultado es la media de tres repeticiones

Realizado por: Segovia, Eduardo, 2019

El extracto alcaloidal de *Ismene narcissiflora* presentó una actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa expresada en IC₅₀ de 23,543 ± 0,316 µg/mL, mostrando una alta actividad

frente a esta enzima. El resultado del compuesto de referencia galantamina fue de IC_{50} de $0,585 \pm 0,006 \mu\text{g/mL}$.

Al no existir datos bibliográficos sobre el género *Ismene* no se pueden comparar sus resultados con sus similares, pero, si se los puede relacionar con otros de la misma familia así por ejemplo podemos encontrar especies que poseen gran actividad inhibitoria de AChE *Phaedranassa cuencana* $IC_{50} = 1,12 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ (Jaramillo, 2019, p. 49); *Crinum x amabile* $IC_{50} = 2,24 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ (Carrasco Ruiz, 2017, p. 44); *Pancratium illyricum L.* $IC_{50} = 3,5 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ (Iannello et al., 2014); *Habranthus Jamesonii* $IC_{50} = 2,0 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$ (Ortiz et al., 2012).

Así mismo, podemos encontrar otras especies que poseen una actividad alta como sucede con: *Phaedranassa tunguraguae* $IC_{50} = 11,12 \pm 1,87 \mu\text{g/mL}$ (Montero, 2018, p. 33) y otras bajas como es el caso de *Narcissus pseudonarcissus* $IC_{50} = 64 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ (Sarıkaya et al., 2013); *Phaedranassa lehmannii* $IC_{50} = 67,73 \mu\text{g/mL}$ (Trujillo-Chacón et al., 2019, p. 7) .

La actividad mostrada por *I. narcissiflora* sobre AChE puede deberse principalmente al perfil de alcaloides obtenidos por CG-EM, en el cual destacan galantamina (10,15%) y su derivado licoramina (18,96 %), puesto que estos alcaloides muestra gran afinidad sobre AChE (Nagaraj et al., 2018, p. 3), teniendo una alta actividad inhibitoria sobre esta enzima. Los otros dos alcaloides identificados tazetina (78,29 %) y O-metileucotamina (9,85 %), muestran no ser tan afines a esta enzima. Debido a que, en el caso de tazetina únicamente su precursor pretazetina posee actividad inhibitoria frente a AChE (Torras-Claveria et al., 2014), caso que no sucede con el O-metileucotamina ya que este alcaloide es más específico para BuChE (Bozkurt et al., 2017).

3.4 Actividad inhibitoria de *Ismene narcissiflora* sobre BuChE

Como se señaló anteriormente en el cálculo de AChE, se debe seguir un proceso similar para el estudio de BuChE en extractos de plantas cuyas concentraciones iniciales son: 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ (Ortiz et al., 2016).

A partir de estas concentraciones se obtuvieron los porcentajes de inhibición respectivos, que se observan en la tabla 6-3:

3.4.1 Primer screening de inhibición de *Ismene narcissiflora* sobre BuChE

Tabla 6-3: Resultado primer screening de inhibición de *Ismene narcissiflora* sobre BuChE

Concentración extracto de alcaloides (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de BuChE* (%)
1	-12,442±1,033
10	-8,867±0,552
50	4,513 ±0,951
100	6,505±2,02

* El resultado es la media de tres repeticiones

Realizado por: Segovia, Eduardo, 2019

Los valores que se muestran en la tabla 6-3 muestran que a una concentración de 100 µg/mL se logra inhibir apenas un 6,505 ± 2,02 %.

Basados en los resultados mostrados por las concentraciones iniciales y puesto a que ninguna de estas logró inhibir el 50% de la enzima, se optó por determinar nuevas concentraciones de 10, 50, 100, 200, 250 y 300 µg/mL; permitiendo con ello garantizar que los resultados obtenidos sean correctos al momento de la obtención del valor real de IC₅₀.

3.4.2 Segundo screening de inhibición de *Ismene narcissiflora* sobre BuChE

Luego del primer screening, se determinaron 6 nuevas concentraciones, con las cuales se realizó un segundo ensayo in-vitro. En este ensayo, no hubo una mejoría significativa ya que el extracto mostró bajo solubilidad. Por lo tanto, se realizó una nueva preparación utilizando DMSO al 0,1 %, un solvente que mejora la solubilidad (Calatayud, Barreno y Valle-tascón, 1995, p. 163). A partir de las cuales se obtuvieron los resultados siguientes.

Tabla 7-3: Resultados segundo screening de inhibición de *I. narcissiflora* sobre BuChE

Concentración extracto de alcaloides (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de BuChE (%) sin DMSO	Porcentaje de Inhibición de BuChE (%) con DMSO
10	-9,134± 1,52	17,276 ± 0,283
50	2,422 ± 1,221	32,649 ± 0,280
100	22,047± 1,45	39,750 ± 0,061
200	37,860 ± 1,154	47,318 ± 0,282
250	41,365± 0,891	49,329 ± 0,233
300	61,172± 2,516	52,777 ± 0,255

* El resultado es la media de tres repeticiones

Realizado por: Segovia, Eduardo, 2019

Como se indica en la tabla 7-3, es posible inhibir la actividad de butirilcolinesterasa en un 61,172± 2,516% a una concentración de 300 µg/mL; mientras que el extracto preparado con

DMSO, logró inhibir la actividad de la enzima en un $52,777 \pm 1,784$ % a la misma concentración. Como se mencionó anteriormente existe una condición para el cálculo del IC_{50} , por ello al evaluar los porcentajes de inhibición obtenidos en ambos casos demuestran que cinco de sus concentraciones se encuentran por debajo (10, 50, 100, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$), del 50 %, y tan solo una concentración levemente se ubica por encima de este (300 $\mu\text{g/mL}$). Pese a haber utilizado el DMSO al 0,1 % no hubo una mejoría notable, ya que para el valor de IC_{50} tan solo la concentración más alta superó ligeramente a este.

Debido a la falta de extracto y al valor de IC_{50} obtenidos, se determinó que la actividad inhibitoria por parte del extracto frente a BuChE es prácticamente nula. Por ello se optó en no aumentar más las concentraciones puesto que no serviría de nada.

3.4.3 Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides del bulbo de *Ismene narcissiflora* sobre BuChE.

Tabla 8-3: Inhibición del extracto alcaloidal de *I. narcissiflora* sobre BuChE

COMPUESTO	IC_{50} BuChE ($\mu\text{g/mL}$)
Galantamina*	$12,302 \pm 1,974$
Extracto alcaloidal de <i>Ismene narcissiflora</i> sin DMSO	$336,427 \pm 14,513$
Extracto alcaloidal de <i>Ismene narcissiflora</i> con DMSO	$255,953 \pm 3,423$

*Compuesto de referencia

El resultado es la media de tres repeticiones

Realizado por: Segovia, Eduardo, 2019

El extracto alcaloidal de *Ismene narcissiflora* presentó una actividad inhibitoria sobre butirilcolinesterasa expresada en IC_{50} de $336,427 \pm 14,513$ $\mu\text{g/mL}$ y $255,953 \pm 0,316$ $\mu\text{g/mL}$ para el extracto preparado sin DMSO y para el extracto con DMSO, respectivamente. Mostrando en ambos casos una actividad nula frente a esta enzima, debido que un valor de IC_{50} superior a 200 $\mu\text{g/mL}$ se considera inactivo (Ortiz et al., 2018). El resultado del compuesto usado como referencia galantamina muestra un IC_{50} de $12,302 \pm 1,974$ $\mu\text{g/mL}$.

Pese a la falta de estudios realizados en el género *Ismene* el resultado obtenido se los relacionó con otros de la misma familia así por ejemplo se pudo encontrar que la especie *Galanthus cilicicus* presentó un $IC_{50} = 8,14$ $\mu\text{g/mL}$ (Kaya et al., 2017, p. 5) posee una buena actividad. Pero existen otras especies que poseen una baja o nula actividad como es el caso de: *Phaedranassa tunguraguae* $IC_{50} = 64,49 \pm 1,34$ $\mu\text{g/mL}$ (Montero, 2018, p. 55); *Phaedranassa cinerea* $IC_{50} = 105,50 \pm 8,978$, $\mu\text{g/mL}$ (Salazar y Acosta, 2017, p. 66); *Crinum x amabile* $IC_{50} = 116,59 \pm 2,85$ $\mu\text{g/mL}$ (Carrasco Ruiz, 2017, p. 60).

La actividad mostrada por *I. narcissiflora* frente a BuChE se debe principalmente al perfil de alcaloides que posee, ya que únicamente O-metileucotamina (9,85 %), presenta afinidad por BuChE (Bozkurt et al., 2017, p. 4). De los otros tres alcaloides identificados, tazetina (78,29 %) galantamina (10,15 %) y licoramina (18,96 %) ninguno de ellos muestra afinidad hacia la enzima (Bozkurt et al., 2017, p. 4; Torras-Claveria et al., 2014, p. 5).

CONCLUSIONES

- Mediante un método de extracción basado en cambios de pH y uso de solventes orgánicos, se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 0,248 %, de la fracción alcaloidal del bulbo de *Ismene narcissiflora*.
- Mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas se identificaron 4 alcaloides del bulbo de *Ismene narcissiflora*, siendo tazetina (78,29 %) la que se encontró en mayor abundancia, seguida por licoramina (18,96 %), galantamina (10,15%) y O-metileucotamina (9,8507%).
- Se determinó la actividad inhibitoria del extracto *Ismene narcissiflora* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, obteniendo valores de IC₅₀ 23,543 ± 0,316 µg/mL y 255,953 ± 3,423 µg/mL, respectivamente. Los valores de IC₅₀ para galantamina fueron de 0,585 ± 0,006 µg/mL y 12,302 ± 1,974 µg/mL para AChE y BuChE, respectivamente. El extracto estudiado posee una actividad alta frente a AChE y actividad nula frente a BuChE debido a que su valor de IC₅₀ supera los 200 µg/mL.

RECOMENDACIONES

- Desarrollar futuros trabajos de investigación en especies de la familia Amaryllidaceae debido a que muchas de estas se las conoce solo por su valor ornamental, mas no como plantas de interés farmacológico.
- Efectuar estudios más profundos que involucren a alcaloides como la tazetina ya que a partir de esta se puede obtener la pretazetina, misma que tiene un interés farmacológico elevado por su relación con la Enfermedad de Alzheimer.
- Durante los ensayos de inhibición mantenerse atentos a la temperatura ambiental y tiempos de lectura ya que ello puede provocar en los resultados obtenidos.
- Al momento de preparar los reactivos, tener especial cuidado con el DTNB, ya que de este reactivo depende mucho que el estudio pueda realizarse.

GLOSARIO

EA	Enfermedad de Alzheimer
AChE	Acetilcolinesterasa
BuChE	Butirilcolinesterasa
CYTED	Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo
OMS	Organización Mundial de la Salud
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
Ach	Acetilcolina
AChEI	Inhibidor de acetilcolinesterasa
ATC	Yoduro de acetilcolina
BTC	Yoduro de butirilcolina
DTNB	5,5'-Ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)
PBS	Buffer fosfato salino
APP	Proteína precursora de amiloide
Ser	Serina
His	Histidina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Phe	Fenilalanina
Glu	Ácido glutámico
CG_EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, K. "Identificación de los alcaloides de *Stenomesson aurantiacum* (Kunth) Herb." , 2012, (S.l.)

ANDRÉS, R. "Estandarización de la técnica gc-ms para análisis de cocaína y caracterización de sus principales adulterantes en el eje cafetero". [en línea], 2011, (S.l.) Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/2266/66028423R173.pdf?sequence=1>.

ANDROCEO, E. y PLANTA, F. "Clivia). ¾". , 1968, (S.l.) pp. 89-93.

BASTIDA, J., et.al. *Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids [en línea]*. S.l.: s.n., 2011. ISBN 9788178955285. pp. 65-100 . Disponible en: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/21374>.

BASTIDA, J., LAVILLA, R. y VILADOMAT, F. "Chapter 3 Chemical and Biological Aspects of Narcissus Alkaloids". *The Alkaloids: Chemistry and Biology* [en línea], 2006, (S.l.) 63pp. 87-179. [Consulta: 20 diciembre 2018]. ISSN 1099-4831. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1099483106630034>.

BOZKURT, B., et. al. "Alkaloid profiling, anticholinesterase activity and molecular modeling study of *Galanthus elwesii*". *South African Journal of Botany* [en línea], 2017, (S.l.) 113pp. 119-127. ISSN 02546299. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2017.08.004>.

BRESCANÉ, R., MORALES DELGADO, C. y TOMÉ CARRUESCO, G. "Alzheimer, una enfermedad compartida". [en línea], 2013, (S.l.) Disponible en: https://knowalzheimer.com/wp-content/uploads/2017/01/Curso_Cuidadores_Alzheimer_completo.pdf.

CALATAYUD, A., BARRENO, E. y VALLE-TASCÓN, S.D.E.L. "Ventajas de la utilización del dimetilsulfóxido en la determinación de clorofilas y feofitinas en líquenes". *Studia Botanica*, 1995, (S.l.) 13(0), pp. 123-128. ISSN 0211-9714.

CALVO-FLORES, F.G. "Parámetros para el análisis de las reacciones en química So-2931310". , 2009, (S.l.) 105(Figura 1), pp. 42-49.

CARRASCO RUIZ, A.F., 2017. Determinacion de la actividad inhibitoria de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Cinnum x amabile*. S.l.: s.n. [en línea] (Tesis). Escuela Bioquímica y Farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Disponible en: <http://dspace.esepoch.edu.ec/handle/123456789/81/browse?type=author&order=ASC&rpp=20&value=Carrasco+Ruiz%2C+Angelo+Fernando>

CASTELLANOS, F. "Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura -

actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano". , 2014, (S.l.) pp. 1-133.

COLOMER, M.C. "Galantamina". Actualidad científica Medicamentos de vanguardia, 2005, (S.l.) 24pp. 106-108.

DEL, I. y LIZAMA, R. "Tesis_Quimiotaxonomia_de_Amaryllidaceae 2017". , 2017, (S.l.)

DORIS, S.C.M. *Agenda de las personas adultas mayores [en línea]*. S.l.: s.n., 2013. pp. 96 . Disponible en: https://fiapam.org/wp-content/uploads/2013/06/Agendas_ADULTOS.pdf.

ELLMAN, G.L., et. al. "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". *Biochemical Pharmacology [en línea]*, 1961, (S.l.) 7(2), pp. 88-95. ISSN 00062952. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>.

ESCOBAR, A. "Caracterización química de alcaloides del genero *Zephyranthes* sp Proyecto de trabajo de grado Programa de Química Farmaceutica Facultad de ciencias Naturales Universidad ICESI Cali-Colombia". [en línea], 2014, (S.l.) ISSN 1098-6596. Disponible en: https://bibliotecadigital.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/76979/1/caracterizacion_quimica_alcaloides.pdf.

FISH, P. V., et. al. "New Approaches for the Treatment of Alzheimer's Disease". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters [en línea]*, 2018, (S.l.) 29(2), pp. 125-133. ISSN 0960894X. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X18309016>.

GUTIÉRREZ, M.C. y DROGUET, M. "Gas Chromatography and Mass Spectrometry: Identification of Off-Odours Compounds". *Boletín Intexter (UPC)*, 2002, (S.l.) 122pp. 35-41. ISSN 11316756 (ISSN).

HANKS, G.R. y JONES, S.K. "The growth and flowering of *Hymenocallis × festalis*". *Scientia Horticulturae [en línea]*, 1987, (S.l.) 30(4), pp. 301-313. [Consulta: 5 diciembre 2018]. ISSN 0304-4238. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304423887900045>.

IANNELLO, C., et. al.. "A potent acetylcholinesterase inhibitor from *Pancreaticum illyricum* L.". *Fitoterapia [en línea]*, 2014, (S.l.) 92pp. 163-167. ISSN 0367326X. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2013.11.005>.

INCA, S., 2017. Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia & quot;*. S.l.: [en línea] (Tesis). Escuela Bioquímica y Farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/handle/123456789/81/browse?type=author&order=ASC&rpp=20&value=Inca+Ben%C3%ADtez%2C+Silvia+Alexandra>

INTEGRATED TAXONOMIC. *Ismene narcissiflora* [en línea]. S.l.: Species 2000, 2000. Disponible en: <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2015/details/species/id/d05df3b15548af276e3dd5f33b10ab24>.

JARAMILLO, T.K., 2019. "Determinación de la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de *Phaedranassa cuencana*, sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa." S.l.: s.n. [en línea] (Tesis). Escuela Bioquímica y Farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/81/browse?type=author&order=ASC&rpp=20&value=Jaramillo+D%C3%ADaz%2C+Tatiana+Katherine>

JIANG, L., et. al. "The TRPM2 channel nexus from oxidative damage to Alzheimer's pathologies : An emerging novel intervention target for age-related dementia". Ageing Research Reviews [en línea], 2018, (S.l.) 47(May), pp. 67-79. ISSN 1568-1637. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.07.002>.

JONES, S.K. "The Growth and Flowering of Hymenocallis festucoides"., 1987, (S.l.) 30pp. 301-313.

KAYA, G.I., et. al. "Chemical characterization and biological activity of an endemic Amaryllidaceae species: Galanthus cilicicus". South African Journal of Botany [en línea], 2017, (S.l.) 108(1341), pp. 256-260. ISSN 02546299. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2016.11.008>.

LA HORA, 2017. "El Alzheimer afecta a 59 mil personas en Ecuador : Variedades : La Hora Noticias de Ecuador, sus provincias y el mundo". [en línea]. Quito, 4 septiembre 2017. [Consulta: 4 diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.lahora.com.ec/noticia/1102097274/el-alzheimer-afecta-a-59-mil-personas-en-ecuador>.

LABORATORIOS WYETH S.A. "Alzheimer". Enfermedad Del Alzheimer [en línea], 2010, (S.l.) pp. 1-16. Disponible en: http://www.alzheimerferrolterra.com/images/pdf/enfermedad_de_alzheimer.pdf.

LÓPEZ LOCANTO, O. "Pharmacological therapy of Alzheimer's disease and other dementias". Arch Med Interna, 2015, (S.l.) 37(1), pp. 61-67. ISSN 1688-423X.

MONTERO, E., 2018. Evaluación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae*. [en línea] (Tesis). Escuela Bioquímica y Farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/81/browse?type=author&order=>

ASC&rpp=20&value=Montero+Valencia%2C+Evelin+Joely

MORAGA-NICOLÁS, F., et. al. "Galanthamine and other Amaryllidaceae related alkaloids are inhibitors of α_7 , $\alpha_4\beta_2$ and $\alpha_3\beta_4$ nicotinic acetylcholine receptors". *Brazilian Journal of Pharmacognosy* [en línea], 2019, (S.l.) 29(4), pp. 495-499. ISSN 0102695X. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.04.003>.

MÜLLER, S., et. al. "Relationship between physical activity, cognition, and Alzheimer pathology in autosomal dominant Alzheimer's disease". *Alzheimer's & Dementia* [en línea], 2018, (S.l.) 14(11), pp. 1427-1437. [Consulta: 4 diciembre 2018]. ISSN 1552-5260. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1552526018332485>.

NAGARAJ, S., et. al. "microRNA diagnostic panel for Alzheimer's disease and epigenetic trade-off between neurodegeneration and cancer". *Ageing Research Reviews* [en línea], 2018, (S.l.) (August), pp. 1-19. ISSN 1568-1637. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.10.008>.

NAIR, J.J. y VAN STADEN, J. "Antiplasmodial constituents in the minor alkaloid groups of the Amaryllidaceae". *South African Journal of Botany* [en línea], 2019, (S.l.) ISSN 02546299. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.06.012>.

OMS, 2017. "Demencia". [en línea]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.

ORTIZ, J.E., et. al. "Wild argentinian amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids". *Molecules*, 2012, (S.l.) 17(11), pp. 13473-13482. ISSN 14203049.

ORTIZ, J.E., et. al. "Cholinesterase-inhibitory effect and in silico analysis of alkaloids from bulbs of *Hieronymiella* species". *Phytomedicine* [en línea], 2018, (S.l.) 39pp. 66-74. ISSN 1618095X. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.12.020>.

ORTIZ, J.E., et. al. "Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and Their Cholinesterase-Inhibitory Activities: An in Vitro and in Silico Study". *Journal of Natural Products*, 2016, (S.l.) 79(5), pp. 1241-1248. ISSN 15206025.

PAGLIOSA, L.B., et. al. "Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity". *Phytomedicine* [en línea], 2010, (S.l.) 17(8-9), pp. 698-701. ISSN 09447113. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.10.003>.

RØNSTED, N., et. al. "Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of amaryllidaceae". *BMC Evolutionary Biology*, 2012, (S.l.) 12(1), pp. 24-29. ISSN 14712148.

SALAZAR, C. y ACOSTA, K. 2017. "Determinación de actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Phaedranassa cinerea*". (S.I.). [en línea] (Tesis). Escuela Bioquímica y Farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/81/browse?type=author&order=ASC&rpp=20&value=Salazar+Santamar%C3%ADa%2C+Cristina+Macarena>

SANABRIA-CASTRO, A. "Revisión Neurotransmisión Colinérgica Central: Aspectos Resumen Introducción". , 2017, (S.I.) 18(2), pp. 76-87.

SÁNCHEZ-CHÁVEZ, G. y SALCEDA, R. "Enzimas Polifuncionales: El Caso De La Acetilcolinesterasa*". Revista de Educación Bioquímica (REB) [en línea], 2008, (S.I.) 27(2)(2), pp. 44-51. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/publicaciones/ampb/numeros/2008/02/e_1erArticulo.pdf.

SARIKAYA, B.B., et.al. "Phytochemical investigation of *Galanthus woronowii*". Biochemical Systematics and Ecology [en línea], 2013, (S.I.) 51(January), pp. 276-279. ISSN 03051978. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2013.09.015>.

SINGH, M., et. al. "Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection". European Journal of Medicinal Chemistry [en línea], 2013, (S.I.) 70pp. 165-188. ISSN 17683254. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.050>.

TALLINI, L.R. "Como fuente de nuevas moléculas bioactivas". , 2018, (S.I.)

TERAPÉUTICO, G. "GALANTAMINA". , 2012, (S.I.)

TORRAS-CLAVERIA, L., et.al. "Metabolomic analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloids of ornamental varieties of *Narcissus* by GC-MS combined with k-means cluster analysis". Industrial Crops and Products [en línea], 2014, (S.I.) 56pp. 211-222. ISSN 09266690. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.008>.

TRUJILLO-CHACÓN, et.al. "Neuroprotective activity of isoquinoline alkaloids from of Chilean Amaryllidaceae plants against oxidative stress-induced cytotoxicity on human neuroblastoma SH-SY5Y cells and mouse hippocampal slice culture". Food and Chemical Toxicology [en línea], 2019, (S.I.) 132(July), pp. 110665. ISSN 18736351. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110665>.

VÁSQUEZ, L., OSORIO, J. y SANDOVAL VEGAS, M., 2000. "Variación de la Actividad de la Enzima Butirilcolinesterasa en Usuaris de Anticonceptivos Hormonales*". Anales de la Facultad de Medicina [en línea]. S.I.: [Consulta: 14 enero 2019]. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/anales/v61_n4/pdf/a03v61n4.pdf.

ZÚÑIGA SANTAMARÍA, T., et.al."Pharmacogenetic studies in Alzheimer disease".
Neurología, 2018, (S.I.) ISSN 15781968.

ANEXOS

ANEXO A: Recolección del material vegetal, *Ismene narcissiflora*



Flor de *Ismene narcissiflora*



Recolección de la planta

ANEXO B: Acondicionamiento del material vegetal



Corte del bulbo



Muestra seca procedente de la estufa

ANEXO C: Obtención del extracto de alcaloides de *Ismene narcissiflora*



Maceración del extracto.



Concentración a Rotavapor



Desengrasado con éter dietílico



Extracto de alcaloides

ANEXO D: Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de *Ismene narcissiflora*



Reactivos para el ensayo



Placa coloreada antes de la lectura



Espectrofotómetro Elisa BioTek Elx800

ANEXO E: Curvas de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) del extracto de alcaloides de *Ismene narcissiflora*, para la obtención del IC₅₀. (Gráfico 1A, Gráfico 2A, Gráfico 3A)

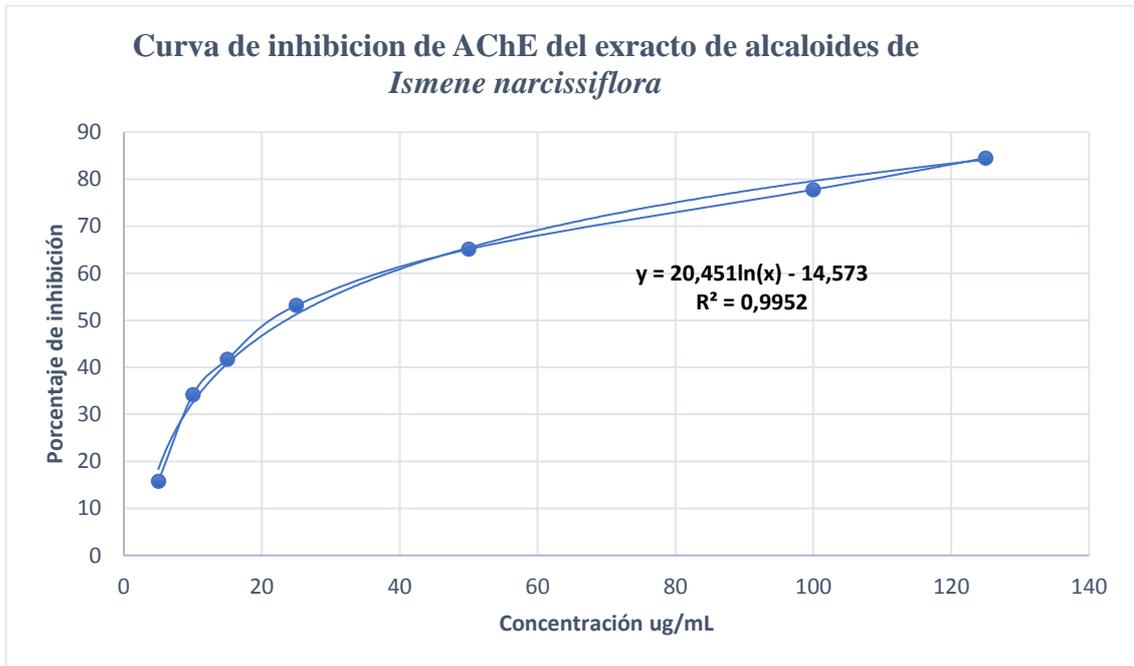


Gráfico 1A: Ensayo de inhibición de AChE del extracto de alcaloides. Primera repetición

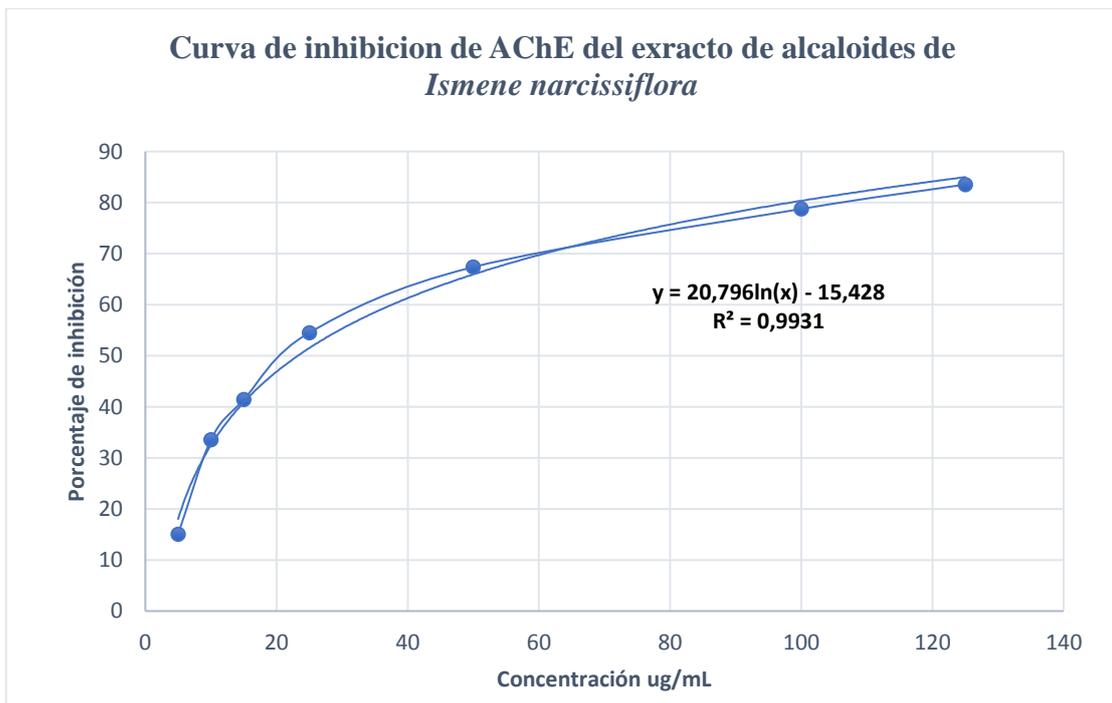


Gráfico 1B: Ensayo de inhibición de AChE del extracto de alcaloides. Segunda repetición.

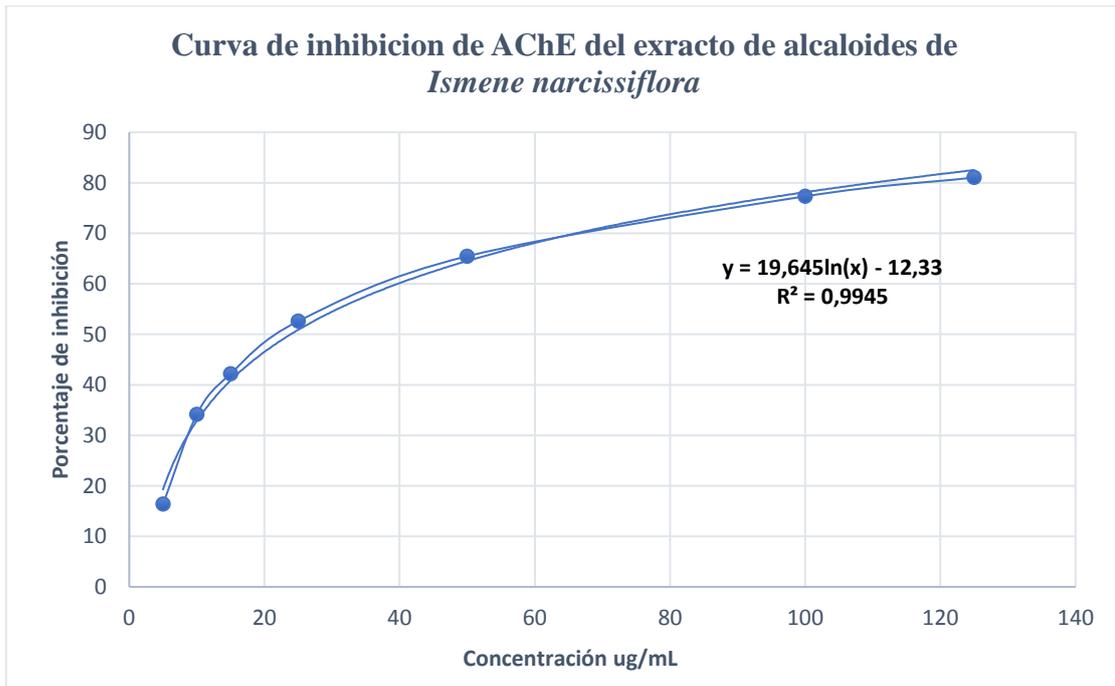


Gráfico 3A: Ensayo de inhibición de AChE del extracto de alcaloides. Tercera repetición

ANEXO F: Curvas de inhibición de butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto de alcaloides de *Ismene narcissiflora*, para la obtención del IC_{50} . (Gráfico 1B, Gráfico 2B, Gráfico 3B, Gráfico 4B)

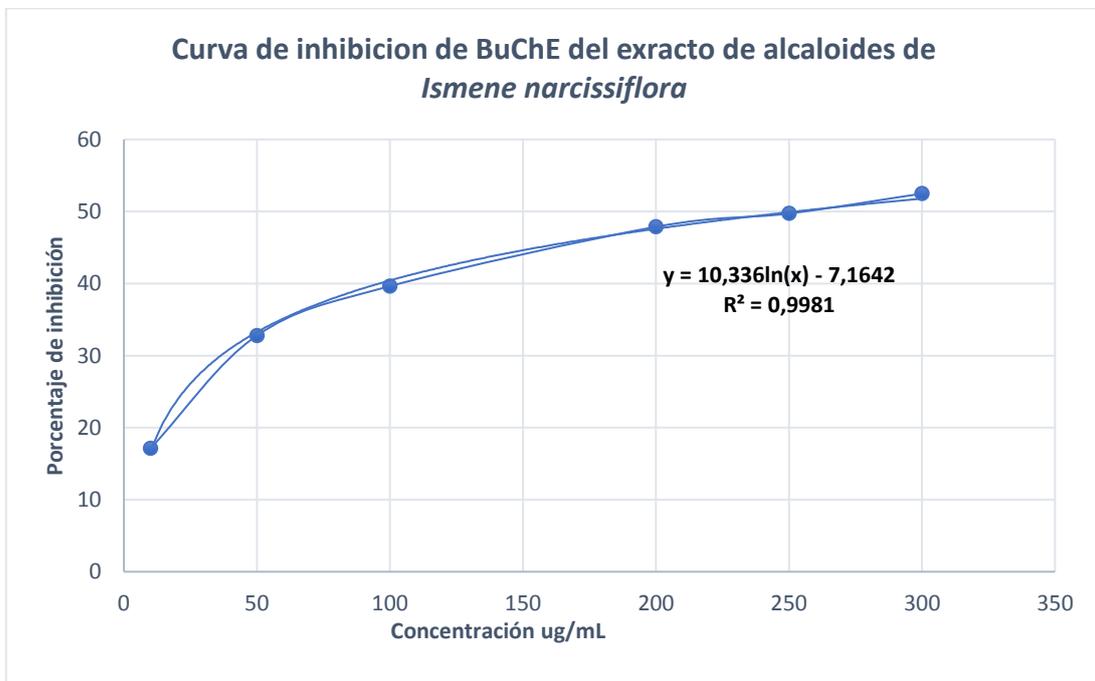


Gráfico 1B: Ensayo de inhibición de BuChE del extracto de alcaloides. Primera repetición

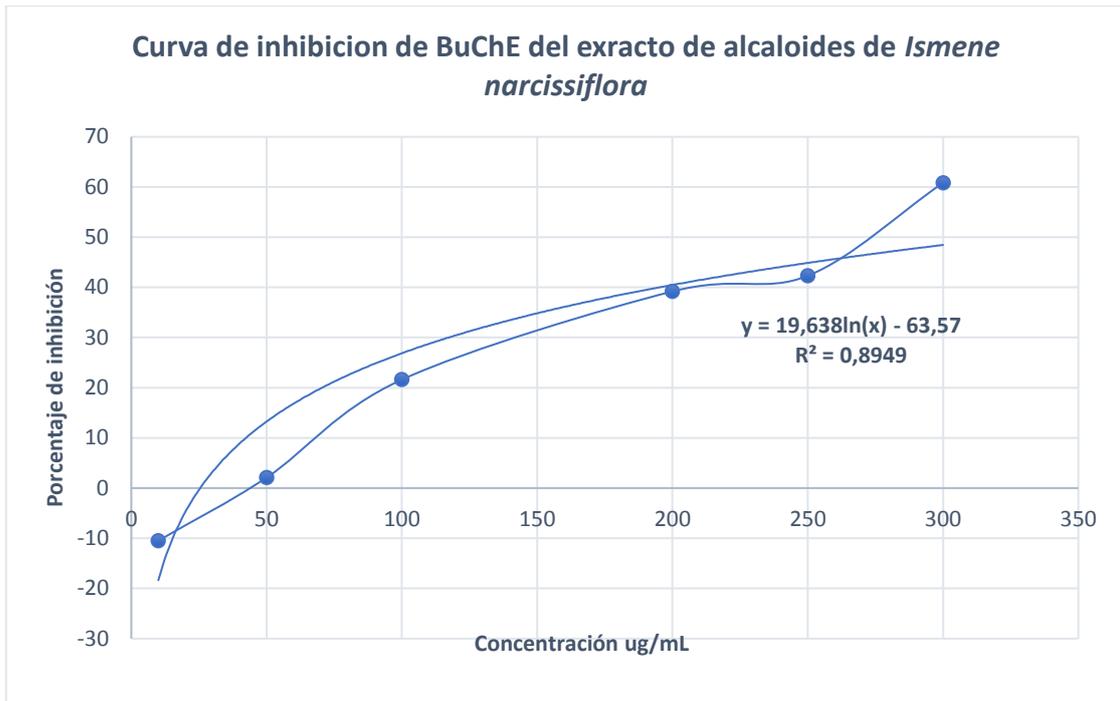


Gráfico 2B: Ensayo de inhibición de BuChE del extracto de alcaloides. Segunda repetición sin DMSO

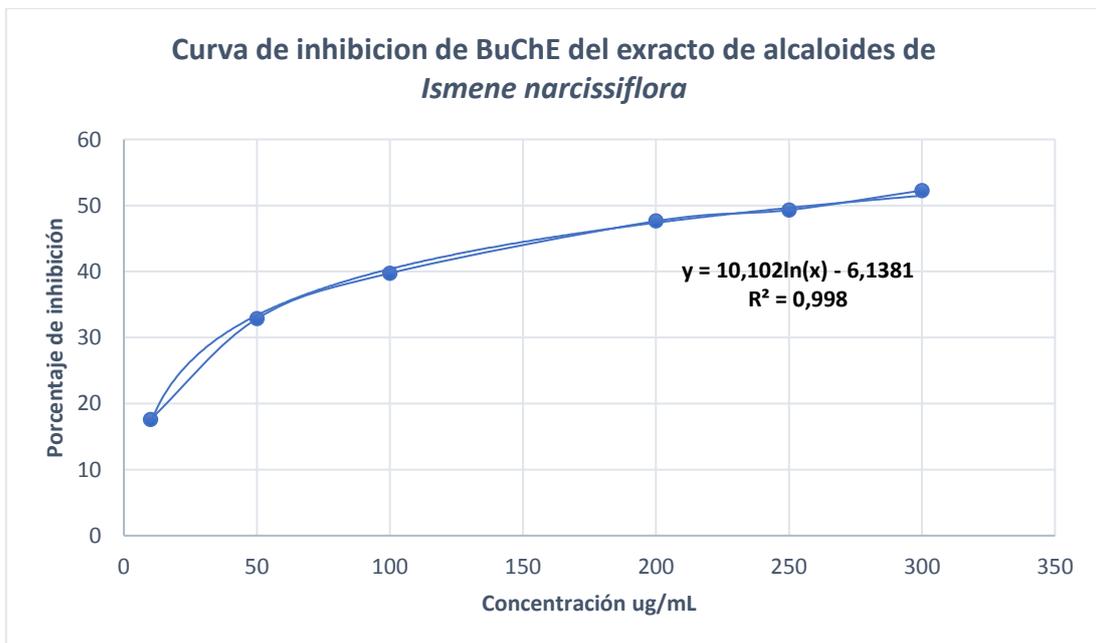


Gráfico 3B: Ensayo de inhibición de BuChE del extracto de alcaloides. Segunda repetición con DMSO

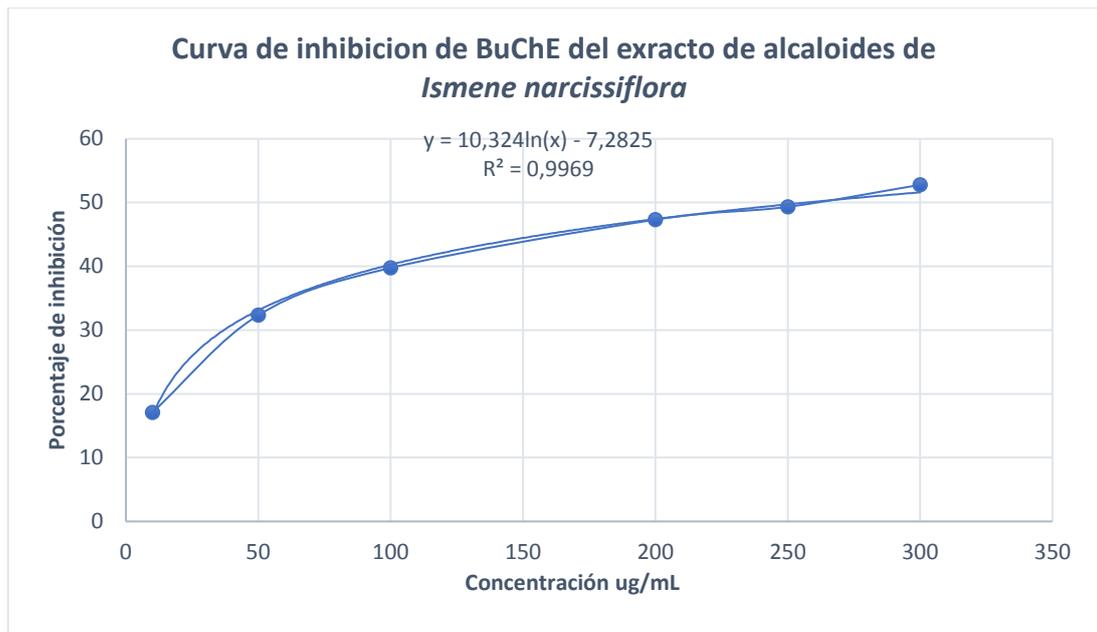
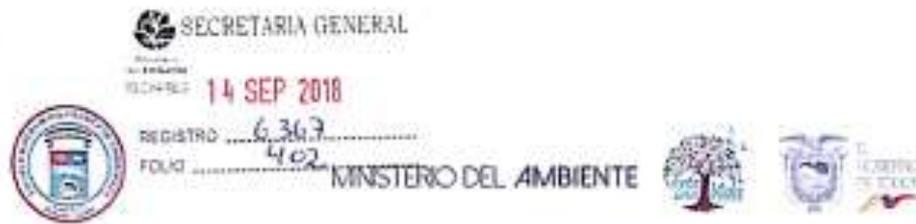


Gráfico 4B: Ensayo de inhibición de BuChE del extracto de alcaloides. Tercera repetición

ANEXO G: Contrato marco “Estudio de la biodiversidad en el Ecuador, ecología, conservación y su potencial uso sostenible”



CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DENOMINADO: “ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE” CELEBRADO ENTRE EL MINISTERIO DEL AMBIENTE, A TRAVÉS DE LA SUBSECRETARÍA DE PATRIMONIO NATURAL Y LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

MAE-DNB-CM-2018-0086

COMPARECIENTES:

A la suscripción del presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos del Programa de Investigación Científica Denominado: “ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE” comparecen, por una parte el MINISTERIO DEL AMBIENTE, a través de la Subsecretaría de Patrimonio Natural, legalmente representado por el LCDO. LÓPEZ MORA ALFREDO DANILO, en su calidad de Subsecretario de Patrimonio Natural, conforme se desprende de la Acción de Personal Nro. 0945 de 02 de mayo de 2018, delegado de la máxima autoridad mediante Acuerdo Ministerial Nro. 024 de 09 de marzo de 2016, publicado en el Registro Oficial Nro. 725 de 04 de abril de 2016, a quien en adelante se le denominará “MAE”; y, por otra parte, la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, debidamente representada por el Ing. BYRON ERNESTO VACA BARAHONA PhD., en su calidad de Rector, conforme consta del certificado emitido por el Ab. Carlos de la Cadena, Secretario General, documento que se agrega como habilitante y a quien en adelante se denomina “ESPOCH”.

Las partes convienen en celebrar, el presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos respecto de la solicitud del programa de investigación científica denominado “ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE” contenido y estipulado en las siguientes cláusulas:

PRIMERA. ANTECEDENTES.-

1. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 3 numeral 7 establece que son deberes primordiales del Estado “(...)7. Proteger el patrimonio natural y cultural del país. (...)” y 83 numerales 6 y 13 establece como deberes y responsabilidades de las ecuatorianas y los ecuatorianos “(...) 6. Respetar los derechos de la naturaleza, preservar un ambiente sano y utilizar los recursos naturales de modo racional, sustentable y sostenible (...) 13. Conservar el patrimonio cultural y natural del país, y cuidar y mantener los bienes públicos (...)”;
2. El artículo 14 de la Norma Suprema determina que: “...Se reconoce el derecho de la