



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA  
FRACCIÓN ALCALOIDAL DE *Hymenocallis* sp. SOBRE LAS  
ENZIMAS ACETILCOLINESTERASA Y  
BUTIRILCOLINESTERASA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA:** EDITH MARIELA VERGARA ZURITA

**TUTORA:** Lcda. KAREN LISSETH ACOSTA LEÓN M.Sc.

Riobamba-Ecuador

2020

© 2020, Edith Mariela Vergara Zurita

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho del Autor.

Yo, Edith Mariela Vergara Zurita, 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 autora 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, 23 de enero de 2020



**Edith Mariela Vergara Zurita**

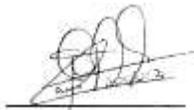
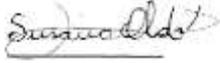
**060345164-2**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Trabajo Experimental, “**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA FRACCIÓN ALCALOIDAL DE *Hymenocallis sp.* SOBRE LAS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA**”, realizado por la señorita: **EDITH MARIELA VERGARA ZURITA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
BQF. Norma Cecilia Toaquiza Aguagallo <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>		23-01-2020
Lcda. Karen Lisseth Acosta León <b>DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>		23-01-2020
Dra. Susana del Pilar Abdo Lopez <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>		23-01-2020

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo de titulación a mis padres Luis Alfredo Vergara Sevilla y Elvia Piedad Zurita Zurita en este arduo camino, quienes han sido un motor fundamental en mi vida, por estar siempre a mi lado apoyándome con sus consejos, ánimo, confianza, amor y por ser mi ejemplo de vida.

A mis hermanos Heidy Vergara y Alex Vergara por su apoyo incondicional.

A mi esposo Carlos Carrillo y a mi Hija Arianna Carrillo, que me han impulsado para seguir siempre adelante.

Edith.

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la Virgen María por cada bendición derramada en mi vida y guiarme en cada paso para alcanzar y cumplir con una meta más en mi vida.

A mis padres por nunca dejarme sola, todo este logro se los debo a ellos quienes, con sus palabras de aliento, su apoyo incondicional y su infinito amor me ayudaron a cumplir con esta meta.

A mis hermanos les agradezco infinitamente por su apoyo incondicional y por ser mi ejemplo de superación.

Mi sincero agradecimiento a la Lcda. Karen Acosta León M.Sc. por su tiempo, conocimientos compartidos y sobre todo por su apoyo incondicional para realizar este trabajo de titulación.

Agradezco a la Dra. Susana Abdo y al BQF. Diego Vinueza M.Sc., por brindarme sus conocimientos, ya que han sido parte importante en el trabajo de titulación.

A la Dra. Nora Oleas de la Universidad Tecnológica Indoamérica y al Dr. Jaume Bastidas de la Universidad de Barcelona por su aporte en este trabajo de titulación.

A mis amigos con quienes compartimos momentos de felicidad y dolor, gracias por regalarme años maravillosos que recordare toda mi vida y los guardare en mi corazón.

Edith.

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiv
RESUMEN .....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN .....	1

## CAPÍTULO I

1.	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1.	Alzheimer .....	4
1.1.1.	<i>Descripción</i> .....	4
1.1.2.	<i>Factores de riesgo</i> .....	4
1.1.3.	<i>Estadios en la enfermedad de Alzheimer</i> .....	5
1.1.4.	<i>Fisiopatología en la enfermedad de Alzheimer</i> .....	6
1.2.	Tratamiento del Alzheimer .....	6
1.2.1.	<i>Tratamiento farmacológico</i> .....	6
1.2.1.1.	<i>Galantamina</i> .....	7
1.2.2.	<i>Tratamiento no farmacológico</i> .....	8
1.2.2.1.	<i>Etiología de la enfermedad del Alzheimer</i> .....	8
1.2.2.1.1.	<i>Hipótesis Colinérgica</i> .....	8
1.2.2.1.1.2.	<i>Acetilcolinesterasa</i> .....	9
1.2.2.1.1.3.	<i>Butirilcolinesterasa</i> .....	10
1.2.2.1.2.	<i>Hipótesis de la cascada Amiloide</i> .....	11

1.2.2.1.3.	<i>Hipótesis de la proteína Tau</i> .....	11
1.2.2.1.4.	<i>Hipótesis Viral</i> .....	11
<b>1.3.</b>	<b>Familia Amaryllidaceae</b> .....	<b>12</b>
1.3.1.	<i>Amaryllidaceae en el Ecuador</i> .....	12
1.3.2.	<i>Hymenocallis sp.</i> .....	13
1.3.3.	<i>Taxonomía: Hymenocallis sp.</i> .....	13
1.3.4.	<i>Alcaloides de Amaryllidaceae</i> .....	13
1.3.5.	<i>Acciones farmacológicas de alcaloides de Amaryllidaceae</i> .....	14
<b>1.4.</b>	<b>Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas</b> .....	<b>15</b>
1.4.1.	<i>Cromatografía de gases (GC)</i> .....	15
1.4.2.	<i>Espectrometría de masas</i> .....	15
<b>1.5.</b>	<b>Método Ellman</b> .....	<b>16</b>

## CAPÍTULO II

<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	<b>17</b>
2.1.	<b>Población de estudio</b> .....	17
2.2.	<b>Tamaño de la muestra</b> .....	17
2.3.	<b>Lugar de investigación</b> .....	17
2.4.	<b>Equipos, Materiales y Reactivos</b> .....	18
2.4.1.	<i>Equipos</i> .....	18
2.4.2.	<i>Materiales</i> .....	18
2.4.3.	<i>Reactivos</i> .....	20
2.5.	<b>Recolección del material vegetal</b> .....	20
2.6.	<b>Identificación botánica</b> .....	21
2.7.	<b>Preparación del material vegetal.</b> .....	21

2.8.	Extracción de alcaloides .....	21
2.9.	Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) .....	22
2.10.	Preparación de muestras para ensayos de inhibición enzimática de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa .....	23
2.10.1.	<i>Preparación de soluciones</i> .....	23
2.10.2.	<i>Preparación de sustratos</i> .....	23
2.10.3.	<i>Preparación de enzimas</i> .....	23
2.11.	Galantamina (compuesto referencia) .....	24
2.12.	Muestra Alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> .....	24
2.13.	Ensayos de inhibición enzimática de AChE Y BuChE .....	25
2.14.	Análisis de datos .....	25
2.15.	Curva de inhibición enzimática para la determinación del IC <sub>50</sub> .....	26

### CAPÍTULO III

3.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	27
3.1.	Extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> .....	27
3.2.	Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas .....	28
3.3.	Determinación de la actividad inhibitoria de AChE y BuChE .....	31
3.3.1.	<i>Actividad inhibitoria con Solución Madre 1</i> .....	31
3.3.1.1.	<i>Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa con Solución Madre 1</i> .....	31
3.3.1.2.	<i>Actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con Solución Madre 1</i> .....	33
3.3.2.	<i>Actividad inhibitoria con Solución Madre 2</i> .....	35
3.3.2.1.	<i>Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa con Solución Madre 2</i> .....	35
3.3.2.2.	<i>Actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con Solución Madre 2</i> .....	36

<b>3.3.3.</b>	<b><i>Actividad inhibitoria con Solución Madre 3</i></b> .....	<b>37</b>
3.3.3.1.	<i>Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa con Solución Madre 3</i> .....	38
<b>3.3.4.</b>	<b><i>Actividad inhibitoria con Solución Madre 4</i></b> .....	<b>39</b>
3.3.4.1.	<i>Actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con Solución Madre 4</i> .....	39
<b>3.3.5.</b>	<b><i>Análisis comparativo de resultados</i></b> .....	<b>40</b>
3.3.5.1.	<i>Acetilcolinesterasa</i> .....	40
3.3.5.2.	<i>Butirilcolinesterasa</i> .....	42
<b>CONCLUSIONES</b> .....		<b>44</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....		<b>45</b>
<b>GLOSARIO</b> .....		<b>46</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-2:</b>	Equipos utilizados en los distintos procedimientos. ....	18
<b>Tabla 2-2:</b>	Materiales en los distintos procedimientos.....	18
<b>Tabla 3-2:</b>	Reactivos usados en los distintos procedimientos. ....	20
<b>Tabla 4-2:</b>	Concentraciones de galantamina para los ensayos de inhibición de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa. ....	24
<b>Tabla 5-2:</b>	Concentraciones de <i>Hymenocallis sp.</i> utilizadas en los ensayos de inhibición para Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa. ....	25
<b>Tabla 1-3:</b>	Rendimiento de la fracción alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> por extracción metanólica .....	27
<b>Tabla 2-3:</b>	Alcaloides identificados en el extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> por CG-EM.	28
<b>Tabla 3-3:</b>	Porcentaje de inhibición sobre la enzima AChE del extracto alcaloidal <i>Hymenocallis sp.</i> en el primer análisis. ....	31
<b>Tabla 4-3:</b>	Porcentaje de inhibición sobre la enzima AChE del extracto alcaloidal <i>Hymenocallis sp.</i> en el segundo análisis.....	32
<b>Tabla 5-3:</b>	Resultados de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> sobre la enzima AChE con su valor de $R^2$ . ....	33
<b>Tabla 6-3:</b>	Porcentaje de inhibición sobre la enzima BuChE del extracto alcaloidal <i>Hymenocallis sp.</i> en el primer análisis. ....	33
<b>Tabla 7-3:</b>	Porcentaje de inhibición sobre la enzima BuChE del extracto alcaloidal <i>Hymenocallis sp.</i> en el segundo análisis.....	34
<b>Tabla 8-3:</b>	Resultados de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> sobre la enzima BuChE con su valor de $R^2$ . ....	35
<b>Tabla 9-3:</b>	Porcentaje de inhibición sobre la enzima AChE del extracto alcaloidal <i>Hymenocallis sp.</i> en la solución 2. ....	35
<b>Tabla 10-3:</b>	Resultados de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> sobre la enzima AChE con su valor de $R^2$ . ....	36
<b>Tabla 11-3:</b>	Porcentaje de inhibición sobre la enzima BuChE del extracto alcaloidal <i>Hymenocallis sp.</i> en la solución 2.....	36
<b>Tabla 12-3:</b>	Resultados de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> sobre la enzima BuChE con su valor de $R^2$ . ....	37

<b>Tabla 13-3:</b> Porcentaje de inhibición sobre la enzima AChE del extracto alcaloidal <i>Hymenocallis sp.</i> en la solución 3. ....	38
<b>Tabla 14-3:</b> Resultados de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> sobre la enzima AChE con su valor de $R^2$ . ....	39
<b>Tabla 15-3:</b> Porcentaje de inhibición sobre la enzima BuChE del extracto alcaloidal <i>Hymenocallis sp.</i> en la solución 4. ....	39
<b>Tabla 16-3:</b> Resultados de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> sobre la enzima BuChE con su valor de $R^2$ . ....	40
<b>Tabla 17-3:</b> Resultados de las tres soluciones usadas para Acetilcolinesterasa .....	41
<b>Tabla 18-3:</b> Resultados de las tres soluciones usadas para Butirilcolinesterasa. ....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b>	Estructura Química de Galantamina .....	7
<b>Figura 2-1:</b>	Transmisión colinérgica.....	9
<b>Figura 3-1:</b>	Distribución Geográfica de Amaryllidaceae .....	12
<b>Figura 4-1:</b>	Estructuras Química de alcaloides de Amaryllidaceae.....	14
<b>Figura 5-1:</b>	Método Ellman .....	16
<b>Figura 6-3:</b>	Estructura Química de los alcaloides presentes en el extracto de <i>Hymenocallis sp.</i>	29

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Cantidad ( $\mu\text{g gal}/100 \text{ mg PS}$ ) de alcaloides del extracto del bulbo puro de <i>Hymenocallis sp.</i> .....	28
---	----

## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** RECOLECCIÓN *Hymenocallis sp.*
- ANEXO B:** PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL
- ANEXO C:** EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES
- ANEXO D:** PREPARACIÓN DE REACTIVOS, ENZIMAS, SUSTRATOS Y MUESTRAS
- ANEXO E:** MICROPLACA DE 96 POCILLO POSTERIOR A LA LECTURA EN EL ESPECTROFOTÓMETRO ELISA
- ANEXO F:** CURVA DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DE *Hymenocallis sp.* SOBRE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA (3 REPETICIONES)
- ANEXO G:** CURVA DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DE *Hymenocallis sp.* SOBRE LA ENZIMA BUTIRILCOLINESTERASA (3 REPETICIONES)
- ANEXO H:** CONTARTO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS
- ANEXO I:** GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE *Hymenocallis sp.*

## RESUMEN

El presente trabajo de titulación tuvo como objetivo determinar la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de *Hymenocallis sp.* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, especie perteneciente a la familia Amaryllidaceae. Mediante el proceso de maceración con metanol se obtuvo el extracto bruto, se realizó la extracción alcaloidal en base a protocolos con cambios de pH y uso de solventes orgánicos, obteniendo así un rendimiento de alcaloides total de 1.634 %. Los alcaloides fueron identificados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para la determinación de la actividad inhibitoria sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa se empleó el método colorimétrico de Ellman et al. (1961), modificado por Ortiz et al. (2016) y se usó galantamina como compuesto de referencia, para el cálculo del IC50. En el extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* se identificaron 4 alcaloides, el alcaloide mayoritario fue tazetina con una concentración de 66.3107 microgramos gal/100 mg PS, seguido por licorina con un 12.2823 microgramos gal/100 mg PS, en menor cantidad se encuentra hemantamina con el 10.3387 microgramos gal/100 mg PS y licoramina con el 10.0148 microgramos gal/100 mg PS. En la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de *Hymenocallis sp.* sobre la enzima acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa se determinó el IC50, empleando una variación en las concentraciones del cosolvente A y cosolvente B, de esta manera se obtuvo el mejor IC50 en la solución madre 3 con un IC50 de 13.60 con variación de 1.55 microgramos/ml en AChE y en BuChE se obtuvo el mejor IC50 de 166.30 con variación de 2.09 microgramos/ml en la solución madre 1. La actividad inhibitoria de *Hymenocallis sp.* sobre la enzima acetilcolinesterasa se considera alta y sobre la enzima butirilcolinesterasa se considera media. Se recomienda realizar más estudios sobre *Hymenocallis sp.* debido a su escasa información y por su contenido alcaloidal con potencial farmacológico.

**Palabras clave:** <ALZHEIMER>, <LIRIOS (*Hymenocallis sp.*)>, <ACETILCOLINESTERASA>, <BUTIRILCOLINESTERASA>, <EXTRACTO ALCALOIDAL>, <ACTIVIDAD INHIBITORIA>.



## ABSTRACT

The purpose of this titration work was to determine the inhibitory activity of the alkaloidal fraction of *Hymenocallis sp.* on the enzyme's acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, species belonging to the Amaryllidaceae family, through the process of maceration with methanol. The crude extract was obtained, alkaloidal extraction was performed based on protocols with changes in pH and use of organic solvents, thus obtaining a total alkaloid yield of 1.634 %. The alkaloids were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry. For the determination of the inhibitory activity on the enzyme's acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, the colorimetric method of Ellman et al. (1961), modified by Ortiz et al. (2016) and galantamine was used as the reference compound, for the calculation of IC<sub>50</sub>. In the alkaloidal extract of *Hymenocallis sp.* four alkaloids were identified, the majority alkaloid was tazetine with a concentration of 66.3107 µg gal / 100 mg PS, followed by licorin with a 12.2823 µg gal / 100 mg PS. In a smaller amount, hemantamine is found with 10.3387 µg gal / 100 mg PS and lycoramine with the 10.0148 µg gal / 100 mg PS. In the inhibitory activity of the alkaloidal fraction of *Hymenocallis sp.* on the enzyme acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase the IC<sub>50</sub> was determined, using a variation in the concentrations of cosolvent A and cosolvent B. In this way the best IC<sub>50</sub> was obtained in the stock solution 3 with an IC<sub>50</sub> of 13.60 ± 1.55 µg/ml in AChE and BuChE the best IC<sub>50</sub> of 166.30 ± 2.09 µg / ml was obtained in the stock solution 1. The inhibitory activity of *Hymenocallis sp.* on the enzyme acetylcholinesterase is considered high, and on the enzyme butyrylcholinesterase, it is deemed to be medium. Further studies on *Hymenocallis sp.* due to its limited information and its alkaloidal content with pharmacological potential.

**Keywords:** <ALZHEIMER>, <LIRIOS (*Hymenocallis sp.*)>, <ACETILCOLINESTERASE>, <BUTIRILCOLINESTERASA>, <ALCALOIDAL EXTRACT>, <INHIBITORY ACTIVITY>.



## INTRODUCCIÓN

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa, la cual se encuentra asociada con la edad y la genética, causando inicialmente problemas en las funciones mentales o cognitivas como: el olvido, problemas de lenguaje, depresión, comportamiento agresivo, entre otros; estos efectos varían de persona a persona de forma lenta y gradual (Custodio y Montesinos, 2015, p.53).

A lo largo del tiempo el Alzheimer se ha convertido en una de las enfermedades de demencia de gran interés e impacto, debido a que la misma prevalece y se va duplicando cada 5 años después de los 65 años de edad, constituyendo así del 50 al 60 % de los síndromes demenciales en estudios posmortem (Castro y Martínez, 2008, p.2).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS,2017, p.1), el 39 % de la población en Ecuador padece de Alzheimer y el 36,5 % a nivel mundial. Esta enfermedad al no tener cura, se estima que las cifras irán incrementando hasta un 63 % en el año 2030 y en el año 2050 hasta el 68 %.

En base a ensayos clínicos se ha demostrado que los inhibidores de acetilcolinesterasa (AChEI) (rivastigmina, donepecilo, galantamina) y memantina son los principales fármacos aprobados por la FDA. Estos fármacos actúan aumentando la actividad colinérgica cerebral, además cabe recalcar que actualmente se está tratando la enfermedad del Alzheimer con inhibidores de butirilcolinesterasa (BuChEI) como la cimserina.

Ecuador desde un punto de vista geográfico es un país pequeño, pero es uno de los 17 países megadiversos en todo el mundo, además posee un 10% de todas las especies de plantas que existe en el planeta (Consulado del Ecuador, 2017, pp. 1-2).

La familia Amaryllidaceae en el Ecuador está formada por 36 especies, 12 de ellas son estimadas como endémicas, las mismas que se encuentran distribuidas entre 0 y 400 m de altitud, en hábitats variados como valles secos interandinos, bosques de litoral seco y húmedo; cabe recalcar que especies de esta familia son comercializadas como plantas ornamentales. Además, es importante tener en cuenta que 8 especies están en peligro de extinción y 4 son vulnerables (Yáñez et al., 2012,p.17).

Los alcaloides presentes en la familia Amaryllidaceae son isoquinolínicos y presentan varias actividades como: antivirales, antimicrobiano, antineoplásico. El alcaloide con más relevancia es la galantamina, el cual se encuentra en diferentes especies de plantas de la familia Amaryllidaceae,

siendo destacable sus propiedades sobre el sistema colinérgico como inhibidor de acetilcolinesterasa (AChE) y como fármaco en el tratamiento del Alzheimer.

El primer alcaloide aislado fue la licorina de *Narcissus pseudonarcissus* en 1877, a partir de ello se han producido considerables progresos en el estudio de plantas de Amaryllidaceae, existiendo aún muchas fuentes fitoquímicas sin explotar. Hasta la actualidad se han podido aislar 300 alcaloides aproximadamente en este tipo de plantas, a pesar que sus estructuras varían considerablemente entre sí, se considera que estos alcaloides están relacionados biogénicamente (Bastida et al., 2011, p.66).

El género *Hymenocallis* de la familia Amaryllidaceae tiene entre 50 y 60 especies, se distribuye en el sureste y centro de los Estados Unidos de América, islas del Caribe, México, Centroamérica y noreste de Sudamérica (García, 2010, p.625).

En México se han realizado varios estudios basados en información morfológica y molecular sobre el género *Hymenocallis* con el fin de identificar nuevas especies (García, 2010, p.625).

Existen muy pocos estudios sobre el género *Hymenocallis*, pero uno de estos estudios relevantes sobre este género fue la determinación de la actividad inhibitoria de extractos de algunas plantas Amaryllidaceae, entre ellas se encuentra *Hymenocallis littoralis*, que presenta un IC<sub>50</sub> de 90 µg/ml sobre la enzima acetilcolinesterasa (Hammoda et al.,2011, p.2).

Este trabajo de investigación tiene como objetivo determinar la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de *Hymenocallis sp.* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

Esta investigación forma parte del proyecto CYTED “LA BIODIVERSIDAD IBEROAMERICANA COMO FUENTE DE RECURSOS NATURALES PARA SU EXPLOTACIÓN SOSTENIBLE (BIFRENES)”, el cual tiene como finalidad establecer las bases para el aprovechamiento de recursos naturales en la búsqueda de principios activos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas, que se puedan emplear como una estrategia terapéutica en el tratamiento paliativo de esta enfermedad con la administración de galantamina, un alcaloide de alto valor añadido, exclusivo de las Amaryllidaceae (BIFRENES,2018).

Esta investigación se encuentra vinculada con el objetivo 1 del Plan Toda una Vida, en el que indica que el Estado deberá garantizar una vida digna con iguales oportunidades para todas las personas, con el fin de cumplir sus propósitos a lo largo de la vida (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, 2017, pp.53-55).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de *Hymenocallis sp.* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

### **Objetivos Específicos**

- Obtener el extracto bruto alcaloidal de los bulbos de *Hymenocallis sp.* mediante el protocolo que se basa en cambios de pH y el uso de solventes orgánicos.
- Identificar los alcaloides del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).
- Determinar la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal total de *Hymenocallis sp.* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, usando un método colorimétrico de Ellman et al. (1961), modificado por Ortiz et al. (2016) y como compuesto de referencia galantamina.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 1.1. Alzheimer

#### 1.1.1. Descripción

El médico alemán Alois Alzheimer gracias a sus aportes científicos en 1906 describió por primera vez la inusual enfermedad de la corteza cerebral en Tübingen, catalogando así a la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Pérez y Trullén, 2013, pp.129-130).

La enfermedad del Alzheimer es un proceso neurodegenerativo del sistema nervioso central que se caracteriza por la pérdida lenta y gradual de la memoria, la misma que involucra cambios citológicos, histológicos e inmunohistoquímicos, entre los más destacados; daños en las habilidades cognitivas, como el lenguaje, pensamiento abstracto, juicio y el reconocimiento de lugares o personas (Allegri et al., 201, p.121).

El curso natural de la enfermedad del Alzheimer, está muy relacionado con los cambios histopatológicos que ocurren en el cerebro de estos pacientes. Estos cambios neuropatológicos son: pérdida de neuronas y sinapsis, antipatía amiloidea, placa senil y cambio neurofibrilar de Alzheimer (Rodríguez et al., 2003a:p.135).

#### 1.1.2. Factores de riesgo

En la enfermedad del Alzheimer se han realizado varios aportes sobre estudios epidemiológicos, genéticos y bioquímicos, por medio de los cuales se consideran los siguientes factores de riesgo en la EA.

Edad: En la actualidad se ha considerado a la edad como un factor de riesgo relevante en la EA, debido a que la prevalencia de dicha enfermedad se duplica cada 5 años a partir de los 60 años de edad, sin embargo, no es el único factor de riesgo para padecer esta patología cerebral.

Sexo: las mujeres presentan mayor índice de prevalencia de presentar la enfermedad de Alzheimer; a su vez se ha demostrado que los estrógenos presentan una protección en mujeres premenopáusicas, ya que el 17  $\beta$ -estradiol previene la muerte celular inducida por el péptido  $\beta$ -amiloide.

Genética: Se ha demostrado que existen marcadores genéticos en la EA los cuales se han dividido en dos tipos:

Determinantes: Son mutaciones genéticas que ocurren en los cromosomas 1, 14 y 21; estas mutaciones son muy infrecuentes, pero son responsables de la enfermedad precoz de Alzheimer en pacientes de 35 a 55 años de edad.

Predisponentes: Estas mutaciones se asocian con un mayor riesgo de padecer la EA, dichas mutaciones se forman en el cromosoma 1 a nivel del alelo  $\epsilon 4$ , gen encargado de codificar a la aloproteína E; la cual se ubica en el cromosoma 19 (Barranco-Quintana et al., 2005, p.614).

### ***1.1.3. Estadios en la enfermedad de Alzheimer***

La enfermedad del Alzheimer al ser una enfermedad que afecta la corteza cerebral se han considerado dos estadios de gran relevancia:

Estadio de predemencia (prodrómica), la cual se caracteriza por ser sintomática incluyendo el déficit esporádico en el recuerdo, pero que no afectan las actividades instrumentales del diario vivir, detectando así, la aparición de marcadores biológicos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Allegri et al., 2011a: p.122).

Estadio de demencia, la cual se caracteriza por presentar una pérdida de habilidades cognitivas severas que afectarán a las funciones del diario vivir del paciente y requieren la ayuda de sus familiares para poder realizar alguna actividad (Allegri, 2011b: p.122).

#### **1.1.4. Fisiopatología en la enfermedad de Alzheimer**

La fisiopatología de la enfermedad del Alzheimer presenta dos lesiones histopatológicas; las lesiones por depósitos de la proteína  $\beta$ - amiloidea (placas seniles) y lesiones por la presencia de marañas intracelulares (neurofibrilares) formadas por proteínas tau hiperfosforilada (Gutiérrez et al., 2017a: p. 11).

Conocer la causa específica de estas lesiones es complejo, pero en base a varios estudios realizados han mostrado que estas dos lesiones están relacionadas entre sí, ya que la forma soluble de la proteína  $\beta$ - amiloidea desencadena la fosforilación de la proteína tau y a su vez la misma interacción de ambas proteínas inducen a la fosforilación de la proteína tau (Gutiérrez et al., 2017b: p. 12).

#### **1.2. Tratamiento del Alzheimer**

Al no existir cura alguna para la enfermedad de Alzheimer se han buscado alternativas farmacológicas y no farmacológicas, para ser empleados como paliativos de la enfermedad con el fin de brindar una mejor calidad de vida para las personas que padecen de la EA.

##### **1.2.1. Tratamiento farmacológico**

En base a ensayos clínicos se ha demostrado que los inhibidores de acetilcolinesterasa (AChEI) (rivastigmina, donepecilo, galantamina) y memantina son los principales fármacos aprobados por la FDA. Estos fármacos actúan aumentando la actividad colinérgica cerebral, además cabe recalcar que actualmente se está tratando la enfermedad del Alzheimer con inhibidores de Butirilcolinesterasa (BuChEI) como la cimserina.

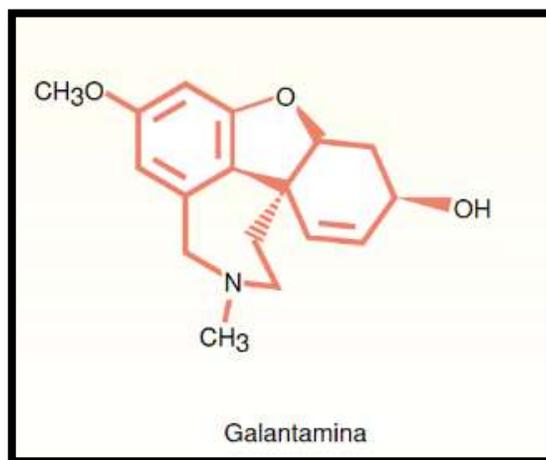
Los AChEI y memantina se emplearán en los pacientes dependiendo del grado en el que se encuentre la EA, de ligero a moderadamente grave se considerará de primera elección a los inhibidores de acetilcolinesterasa (rivastigmina, donepecilo, galantamina) y en el caso de moderado a

moderadamente grave se empleará memantina con inhibidores de acetilcolinesterasa (Sánchez et al., 2015, p. 4318).

### 1.2.1.1. Galantamina

En 1940 fue aislada la galantamina de *Galanthus nivalis*, mostrando ser un inhibidor reversible y competitivo de acetilcolinesterasa, es por ello que la galantamina es indicada para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer leve o moderada. La galantamina es eficaz y bien tolerado, por lo cual existe mejoras a corto plazo en la función cognitiva y en las actividades de la vida cotidiana en los pacientes que padecen de la enfermedad de Alzheimer (Bastida et al., 2011c: pp.90-91).

La galantamina tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, actuando en el sistema nervioso central; lo que conlleva a la estimulación de los receptores nicotínicos pre y post-sinápticos (evitan la apoptosis inducida por toxicidad de  $\beta$ -amiloide) y existe un aumento en la actividad de la acetilcolina y la liberación de neurotransmisores (Bastida et al., 2011d: p.91).



**Figura 1-1:** Estructura Química de Galantamina

**Fuente:** (Marián Carretero, 2003)

## **1.2.2. Tratamiento no farmacológico**

Dentro de este tratamiento se emplean terapias ocupacionales (TO), estas terapias consisten en realizar ciertas intervenciones como: estimulación sensorial, estimulación cognitiva, musicoterapia y entrenamiento de memoria; con el fin de mejorar las funciones cognitivas y emocionales del paciente (Mantilla et al., 2016, p. 354).

### **1.2.2.1. Etiología de la enfermedad del Alzheimer**

Al no existir un origen o una causa específica que justifique claramente la aparición del Alzheimer, se adoptaron hipótesis, que buscan explicar los principios sobre la presencia de la enfermedad, estas hipótesis son:

#### **1.2.2.1.1. Hipótesis Colinérgica**

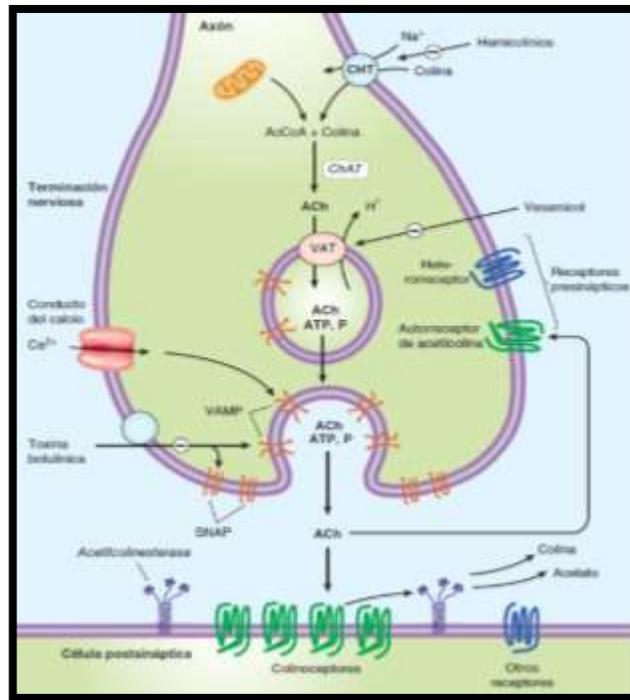
En la hipótesis colinérgica se ha comprobado que existe un déficit colinérgico, disminución del neurotransmisor de acetilcolina y pérdida de las capacidades cognitivas de los enfermos, mostrando así que los únicos tratamientos que actualmente se administran para mejorar las funciones cognitivas de los mismos son los fármacos colinérgicos (Castro y Martínez, 2008, p.1).

En la actualidad se cree que esta hipótesis no es la causa de la enfermedad del Alzheimer, sino que la deficiencia del neurotransmisor (acetilcolina) es el resultado de los daños cerebrales provocados por la misma enfermedad.

Basándose en la estructura y los mecanismos bioquímicos de la sinapsis se están desarrollando las siguientes estrategias terapéuticas:

- Precusores de acetilcolina
- Agonistas nicotínicos

- Liberadores de neurotransmisores
- Agonistas Muscarínicos M1 o Antagonistas Muscarínicos M2
- Inhibidores de acetilcolinesterasa (Castro y Martínez, 2008, p.1).



**Figura 2-1:** Transmisión colinérgica

**Fuente:** (Bertram Katzung, 2017)

#### 1.2.2.1.1.1. Acetilcolina en la enfermedad de Alzheimer

La acetilcolina es un neurotransmisor que se forma en las neuronas colinérgicas a partir de dos precursores: colina y acetil coenzima A. Este neurotransmisor se encargará de la comunicación entre las células nerviosas, pero cabe recalcar que la función de la acetilcolina se verá alterada en la enfermedad de Alzheimer existiendo una pérdida constante del neurotransmisor y causando así circuitos colinérgicos en el sistema neuronal (González, 2013, p.42).

#### 1.2.2.1.1.2. Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa es la enzima responsable de la hidrólisis del neurotransmisor de acetilcolina (ACh). En la sinapsis neuronal este neurotransmisor (ACh) que se encuentra libre va a interactuar

con los receptores nicotínicos y muscarínicos. A nivel pre sináptico la activación nicotínica favorecerá a la liberación de otros neurotransmisores y a nivel post-sináptico las señales nicotínicas forman otro potencial de acción que se transmitirá a otras neuronas (Abizanda y Jordán, 2011).

En la activación muscarínica se controla la excitabilidad de neuronas por adenilato ciclasa y fosfolipasa C, la unión de los receptores (nicotínicos, muscarínicos) y acetilcolina cesa al momento de hidrolizarse por la enzima acetilcolinesterasa, esta enzima es capaz de hidrolizar hasta veinticinco mil moléculas de ACh cada segundo (Abizanda y Jordán, 2011).

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa se clasifican en cuatro categorías:

- Inhibidores pseudoirreversibles.
- Inhibidores irreversibles.
- Inhibidores de tipo análogos de estados de transición.
- Inhibidores reversibles (Carretero, 2007, p. 115).

#### *1.2.2.1.1.3. Butirilcolinesterasa*

La butirilcolinesterasa (BuChe) es una enzima también conocida como pseudocolinesterasa, colinesterasa sérica, colinesterasa en plasma o falsa colinesterasa, posee mejor capacidad de hidrolizar la butirilcolina a diferencia de otros ésteres.

La butirilcolinesterasa es sintetizada en el hígado, se encuentra en ciertos tejidos a excepción de los eritrocitos, no posee una función biológica conocida, pero posee gran importancia toxicológica y farmacológica.

La función principal que tiene la enzima BuChe es hidrolizar esteres exógenos que están presentes en la succinilcolina, ácido acetilsalicílico, mivacurio, cocaína, heroína y varios fármacos anticonvulsionantes (Manzano et al., 2017, pp. 98-99).

#### *1.2.2.1.2. Hipótesis de la cascada Amiloide*

La hipótesis de la cascada amiloide indica que la proteína precursora de amiloide es la causante de la enfermedad del Alzheimer, debido a los depósitos que se generan del péptido  $\beta$ -amiloide; lo cuales posteriormente formarán placas seniles y ovillos neurofibrilares en la neurona, dejándola sin funcionar y provocando así la muerte de la misma (Folch, 2018a: p.49).

#### *1.2.2.1.3. Hipótesis de la proteína Tau*

La proteína tau es considerada como la responsable de la muerte de las neuronas en los trastornos de la enfermedad del Alzheimer, ya que esta proteína es una sustancia fundamental para crear el esqueleto de la célula neuronal; al encontrarse alterada producirá una acumulación de ovillos neurofibrilares en la sinapsis, causando así la muerte neuronal por apoptosis, debido a que, las neuronas del cerebro no podrán limpiar la acumulación de proteínas no deseadas y tóxicas (Folch, 2018b: p.49).

#### *1.2.2.1.4. Hipótesis Viral*

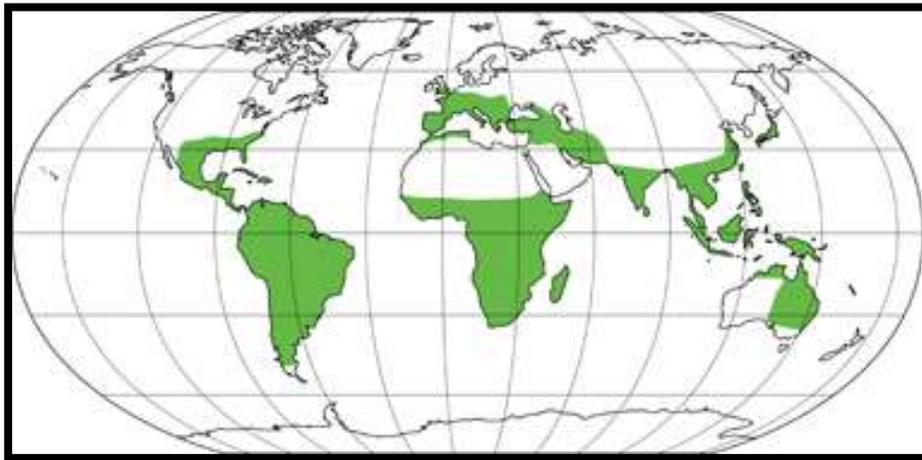
La idea central de esta hipótesis se basa en que una bacteria o virus pueden relacionarse como causales de la enfermedad del Alzheimer, ya que un grupo de investigadores han hallado una evidencia de que los herpes virus, como el herpes labial pueden desencadenar dicha enfermedad, tomando en cuenta que este virus generalmente se detecta temprano en la vida y permanecen inactivos en algún lugar del cuerpo, pero a medida que envejecemos, casi siempre migran al cerebro (Eimer et al, 2018, pp. 56-59).

### 1.3. Familia Amaryllidaceae

#### 1.3.1. Amaryllidaceae en el Ecuador

La familia Amaryllidaceae son hierbas perennes, bulbosas; bulbos tunicados; sus raíces son de dos tipos: contráctiles y perennes; por lo general estas son carentes de olor; tépalos de 6, usualmente fusionados en la base formando un tubo largo o corto (UNDELAR, 2013).

La Familia Amaryllidaceae en el Ecuador está formada por 36 especies, 12 de ellas son estimadas como endémicas, las mismas que se encuentran distribuidas entre 0 y 400 m de altitud, en hábitats variados como valles secos interandinos, bosques de litoral seco y húmedo. Cabe recalcar que las plantas de la familia Amaryllidaceae son comercializadas como plantas ornamentales, ya que de todas estas especies 8 están en peligro de extinción y 4 son vulnerables (Yáñez et al., 2012, p.17).



**Figura 3-1:** Distribución Geográfica de Amaryllidaceae

Fuente: (UNDELAR, 2013)

En el Ecuador existen 36 especies de plantas de la familia Amaryllidaceae, entre las más conocidas se encuentran: *Phaedranassa dubia*, *P. cinérea*, *P. cuencana*, *P. schizantha*, *P. brevifolia*, *P. tunguraguae*, *P. glauciflora*, *P. viridiflora*, *Eucrosia aurantiaca*, *Eucharis grandiflora*, *Eucharis moorei*, *Eucharis formosa*, *Eucharis candida*, *Stenomesson aurantiacum*, *Hippeastrum puniceum* y *Crinum amabile*. (Carrasco, 2017, pp. 24-25).

### **1.3.2. *Hymenocallis* sp.**

El género *Hymenocallis* de la familia Amaryllidaceae tiene entre 50 y 60 especies, se distribuye en el sureste y centro de los Estados Unidos de América, islas del Caribe, México, Centroamérica y noreste de Sudamérica (García, 2010a: p.625).

Se han realizado varios estudios basados en información morfológica y molecular, sobre el género *Hymenocallis* con el fin de identificar nuevas especies y poder diferenciarlas (García, 2010b: p.625).

### **1.3.3. Taxonomía: *Hymenocallis* sp.**

*Hymenocallis* sp. pertenece al Reino plantae, Filo Tracheophyta, Clase Liliopsida, Orden Asparagales, Familia Amaryllidaceae y Género *Hymenocallis* (GBIF, 2017)

Dentro del género de *Hymenocallis* sp. se encuentra una gran variedad de especies como: *Hymenocallis caribaea*, *Hymenocallis littoralis*, *Hymenocallis harrisiana*, *Hymenocallis latifolia*, *Hymenocallis coronaria*, *Hymenocallis occidentali*, *Hymenocallis palmeri*, *Hymenocallis rotata*, *Hymenocallis tubiflora*, *Hymenocallis speciosa*, *Hymenocallis tridentata*, entre otros (GBIF, 2017).

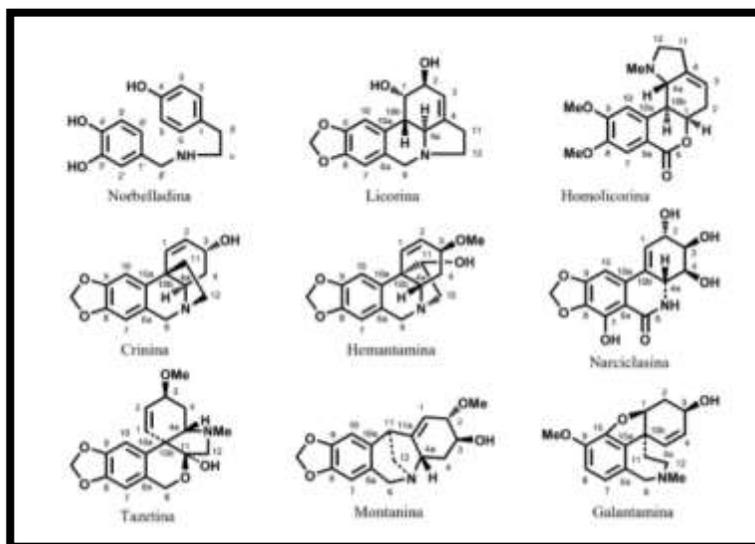
### **1.3.4. Alcaloides de Amaryllidaceae**

Una característica exclusiva de las Amaryllidaceae es la presencia de un grupo de alcaloides de tipo isoquinolina, que han sido aislados de las plantas de todos los géneros de esta familia, de los cuales la mayoría no se encuentra en ninguna otra familia de plantas (Bastida et al., 2011a: p.66).

El primer alcaloide aislado fue la licorina de *Narcissus pseudonarcissus* en 1877, a partir de ello se han producido considerables progresos en el estudio de plantas de Amaryllidaceae, existiendo aún muchas fuentes fitoquímicas sin explotar.

Hasta la actualidad se han podido aislar 300 alcaloides aproximadamente en plantas de la familia Amaryllidaceae, a pesar que sus estructuras varían considerablemente entre sí, se considera que estos alcaloides están relacionados biogénicamente (Bastida et al., 2011b: p.66).

Las Amaryllidaceae según su estructura se clasifican en nueve tipos de esqueleto: norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, hemantamina, narciclasina, tazetina, montanina, galantamina (Bastida et al., 2011, p.67).



**Figura 4-1:** Estructuras Química de alcaloides de Amaryllidaceae

Fuente: (Bastida et al., 2011).

### 1.3.5. Acciones farmacológicas de alcaloides de Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae ha tenido gran interés farmacológico desde la antigüedad, debido a las acciones farmacológicas que presentan los alcaloides de esta familia, es por ello que a través de los años se han realizado amplios Screenings para conocer al alcaloide y su actividad farmacológica (Bergoñón, 1994a: p. 160).

**Tabla 1-1:** Acciones farmacológicas relevantes de los alcaloides de Amaryllidaceae

Alcaloides	Acción farmacológica
Acetilcaranina	Antineoplásico en leucemia linfocítica murínica P-388
Ambellina	Inmunoestimulante moderada
Crinamina	Antineoplásico moderado sobre leucemia Rauscher
Crinasiadina, Crinasiatina	Bacteriostático
Galantamina	Anticolinesterásico a nivel periférico, Neuroestimulante, Analgésico actividad inferior que la morfina, terapia antialzheimer
Hemantamina	Antineoplásica
Hipeastrina	Antivírica potente sobre Herpes simplex

continua

<b>Licorina</b>	Antineoplásico, Antivírica, Antiprotozoario
<b>Narciclasina</b>	Antineoplásico
<b>Pretazetina</b>	Antineoplásica, Antivírica

Fuente: (Bergoñón, 1994b: pp. 160-162)

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

#### **1.4. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

Es una técnica en la cual se combina la capacidad de separación de la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas; esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos en mezclas complejas con un alto grado de efectividad. Esta técnica está indicada para la separación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles (Gutiérrez y Droguet, 2002a: p. 35).

##### **1.4.1. Cromatografía de gases (GC)**

Es una técnica analítica empleada para determinar la composición de una mezcla de productos químicos (muestra). Se usan diferentes tipos de gases dependiendo del analizador y del tipo de detector. El uso correcto del gas especial y del equipo al realizar una cromatografía de gases mejorará considerablemente la precisión de sus resultados analíticos.

En la cromatografía de gases se inyecta la muestra en la fase móvil, la cual generalmente es un gas inerte (He), en esta fase los diferentes componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna (Gutiérrez y Droguet, 2002b: p. 36).

##### **1.4.2. Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas es una de las técnicas analíticas más completas, ya que presenta gran capacidad de identificación y proporciona un espectro característico a cada molécula; también es conocida por ser una técnica rápida ya que se puede realizar un espectro en décima de segundo.

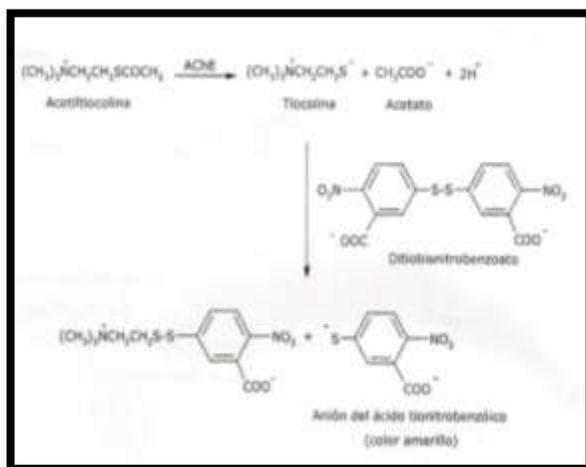
En el espectro de masas se procede a la ionización de muestras, este proceso es de impacto electrónico debido a un bombardeo de electrones a las moléculas, con el fin de provocar una emisión estimulada de electrones y así ionizarlas.

El espectro de masas puede identificar cualquier sustancia pura, pero no puede identificar componentes individuales de una mezcla sin haber sido separados previamente sus componentes; es por ello que la unión de las técnicas de EM y CG permite una separación e identificación de mezclas más complejas (Gutiérrez y Droguet, 2002c: p. 37).

### 1.5. Método Ellman

Es un método fotométrico que se emplea para determinar la actividad de acetilcolinesterasa en extractos de tejidos; mediante un cambio de coloración amarillenta se mide la actividad enzimática de acetilcolinesterasa (Ellman et al., 1961a: pp. 88-89).

La coloración se debe a la interacción de la tiocolina con el ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), para la medición de la misma se utiliza un Espectrofotómetro a una longitud de onda  $\lambda = 412$  nm (Ellman et al., 1961b: pp. 88-89).



**Figura 5-1: Método Ellman**

**Fuente:** (Ellman et al., 1961, p. 89).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Población de estudio

Se analizó la fracción alcaloidal de 2 bulbos de *Hymenocallis sp.*, que fueron recolectadas en la provincia del Guayas.

#### 2.2. Tamaño de la muestra

Se recolectaron aproximadamente 100 g de bulbos frescos de *Hymenocallis sp.* y fueron sometidas a un proceso de secado, obteniendo un peso final aproximado de 20 g.

#### 2.3. Lugar de investigación

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo donde se realizó la extracción alcaloidal y los ensayos de inhibición. También colaboró la Universidad de Barcelona (España) en los análisis de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

## 2.4. Equipos, Materiales y Reactivos

### 2.4.1. Equipos

**Tabla 2-2:** Equipos utilizados en los distintos procedimientos.

Equipos	Procedimiento
Estufa de secado	Preparación del material vegetal
Molino Arthur H. Thomas	
Balanza analítica	Pesaje del material vegetal, reactivos
Rotavapor	Extracción de alcaloides
Sonicador	
Sorbona	
pH-metro	Preparación de reactivos
Centrífuga	
Congelador (-20 °C)	Conservación de reactivos
Refrigerador	
Espectrofotómetro ELISA	Identificación alcaloidal
Computador	
Lector de Microplacas Thermo Scientific	
Agitador Vórtex	
Cronómetro	Ensayos de inhibición enzimática
Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas	

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

### 2.4.2. Materiales

**Tabla 3-2:** Materiales en los distintos procedimientos.

Cantidad	Materiales	Procedimiento
2	Balón de aforo de 1000 ml	
2	Balón de aforo de 100 ml	
2	Balón de aforo de 25 ml	
2	Vaso de precipitación de 1000 ml	
3	Vaso de precipitación de 100 ml	

continua

2	Probeta de 100 ml	Preparación de reactivos
1	Pipeta de 10 ml	
1	Pipeta de 5 ml	
2	Pesamuestra	
2	Varilla de agitación	
2	Frascos ámbar de 1000 ml	
2	Frascos ámbar de 250 ml	
1	Espátula	
1	Balón esmerilado de 250 ml	
2	Vaso de precipitación de 600 ml	
4	Vaso de precipitación de 250 ml	
1	Vial de vidrio	
1	Pipeta pasteur de vidrio	
1	Embudo de separación	
1	Matraz de 1000 ml	
1	Desecador	
3500	Puntas amarillas de micropipeta	Determinación de la actividad inhibitoria
600	Puntas azules de micropipeta	
1	Microplaca de 96 pocillos	
5	Paleta de plástico para pipeta multicanal	
100	Tubos Eppendorf de 1.5 ml	
150	Tubos Eppendorf de 0.5 ml	
50	Tubos Eppendorf de 2 ml	
6	Tubos graduado falcon tapa azul de 20 ml	
2	Tubos graduado falcon tapa ploma de 14 ml	
3	Placas de hielo reutilizables	
1	Placa de poliestireno	
3	Rollo de papel aluminio	
3	Papel absorbente de cocina	
4	Caja de papel sin pelusa Elite	

**Realizado por:** Vergara Zurita, Edith, 2019.

### 2.4.3. Reactivos

**Tabla 4-2:** Reactivos usados en los distintos procedimientos.

Reactivos	Procedimiento	
Metanol CH <sub>4</sub> O	Preparación del material vegetal	
Ácido sulfúrico H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2% V/V)	Obtención alcaloidal	
Éter etílico (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> O		
Hidróxido de amonio NH <sub>4</sub> OH (25% V/V)		
Acetato de etilo C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>		
Sulfato de sodio anhidro Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
Goma arábica		
Fosfato di potásico K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		Determinación de la actividad inhibitoria
Bifosfato de sodio Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		
Cloruro de sodio NaCl		
Ácido clorhídrico HCl (0.5 N)		
Hidróxido de sodio NaOH (0.5 N)		
Acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus electricus</i>		
Butirilcolinesterasa de suero equino		
Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)		
Yoduro de acetiltiocolina		
Yoduro de butiriltiocolina		
Galantamina		
Agua bidestilada	Preparación de reactivos y lavado de materiales	
Agua destilada		

**Realizado por:** Vergara Zurita, Edith, 2019

### 2.5. Recolección del material vegetal

Se recolectó la especie *Hymenocallis sp.* en estado de floración en el cantón Daule provincia Guayas-Ecuador en el mes de septiembre del 2018 a una altitud de 11 metros sobre el nivel del mar.

Se obtuvieron aproximadamente 100 g de bulbos frescos, bajo el contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos del Proyecto de Investigación Científica denominado: “La Biodiversidad de Amaryllidaceae como Fuente de Recursos Naturales para su Explotación Sostenible” MAE-DNB-CM-2015-0054. (Anexo H)

A su vez se tramitó el permiso de movilización desde la provincia del Guayas hacia Riobamba, en el Ministerio del Ambiente de la ciudad de Guayaquil, Guía de movilización de Especímenes de Flora y Fauna Silvestre Nro. 010-DPAG-LA-2018. (Anexo I)

## **2.6. Identificación botánica**

La identificación botánica de la especie vegetal fue realizada por la Dra. Nora Oleas, botánica responsable del Herbario de la Universidad Tecnológica Indoamérica (Quito-Ecuador).

## **2.7. Preparación del material vegetal.**

Después de la recolección de los bulbos de *Hymenocallis sp.* se procedió a la selección del material vegetal tomando en cuenta ciertos criterios: que no presenten daños mecánicos y microbiológicos.

Al material vegetal seleccionado se realizó un acondicionamiento, el cual consistió en una limpieza con agua destilada y alcohol, realizando cortes aproximadamente de 1.5 cm.

Estos cortes se los somete a secado a 60 °C durante 48 horas, una vez seco el material vegetal se procedió al triturado en el molino Arthur Thomas.

## **2.8. Extracción de alcaloides**

Se pesaron 20 g del material vegetal triturado, el mismo que se colocó en un frasco ámbar con 800 ml de metanol durante 72 horas, empleando el sonicador en intervalos de 1 a 2 horas por día. Posteriormente se filtró el macerado obteniendo el extracto crudo, dicho extracto se trasvasó a un balón esmerilado, el mismo que fue sometido al rotavapor a una presión reducida con una temperatura de 50 °C y obteniendo de esta manera el extracto crudo seco.

El extracto crudo obtenido se colocó en un embudo de separación, al cual se le acidificó con ácido sulfúrico (2% V/V), al mismo se le realizó una limpieza con éter etílico por 4 veces; de esta manera se obtuvieron dos fases: la fase orgánica que se desecha y la fase acuosa ácida.

A la fase acuosa ácida se basificó añadiendo hidróxido de amonio (25 % V/V) hasta llegar a un pH 10, posteriormente se realizó un lavado con acetato de etilo por 4 veces, mediante el cual se obtuvieron dos fases: la fase acuosa alcalina que es desechada y la fase orgánica en la cual quedan retenidos los alcaloides. A esta última fase se añade sulfato de sodio anhidro y goma arábiga con el fin de absorber el agua sobrante en la muestra.

Se filtró el extracto alcaloidal y se evaporó el solvente en el rotavapor, obteniendo finalmente el extracto de alcaloides total.

## **2.9. Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)**

La identificación alcaloidal de *Hymenocallis sp.* por CG-EM se realizó en la Universidad de Barcelona (España), debido a que este trabajo de titulación forma parte del proyecto “LA BIODIVERSIDAD IBEROAMERICANA COMO FUENTE DE RECURSOS NATURALES PARA SU EXPLOTACIÓN SOSTENIBLE (BIFRENES)”.

El equipo que se utilizó para la identificación de alcaloides fue el Cromatógrafo de Gases Agilent 6890 acoplada a Espectrometría de Masas 5975, dicho cromatógrafo posee una columna SAPIENSX5-MS.

Los cambios de temperatura se dan de la siguiente manera:

- Inicial de 55 hasta 100 °C (60 °C/min)
- En dos minutos a 100 °C
- De 100 °C hasta 180 °C (15 °C/min)

- En un minuto a 180 °C
- De 180 °C hasta 300 °C (5 °C/min)

El inyector tuvo una temperatura de 280 °C y el flujo de helio fue de 0,8 mL/min, el método que se usó fue *splitless*. Para analizar los datos se utilizó el software AMDIS (NIST), el cual permite ratificar la pureza de las señales y establecer índices de retención (RI) (Acosta et al.,2014, p. 179).

## **2.10. Preparación de muestras para ensayos de inhibición enzimática de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa**

### **2.10.1. Preparación de soluciones**

- Buffer fosfato salino (PBS)

Para la preparación de PBS se debe pesar fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ) 8 mM, bifosfato de sodio ( $NaH_2PO_4$ ) 2.3 mM y cloruro de sodio 0.15 M, aforando con agua bidestilada y ajustar el pH a 7.5 con hidróxido de sodio.

- Solución salina

Se preparó  $Na_2HPO_4$  a una concentración 0.04 M y se ajustó a pH 7.5 con ácido clorhídrico.

- Ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB)

Se prepara DTNB en cada tubo eppendorff con una concentración de 2 mg/mL.

### **2.10.2. Preparación de sustratos**

- Yoduro de Acetilcolina (ATC)

Se prepara ATC con una concentración de 1.7 mg/200 uL.

- Yoduro de Butirilcolina (BTC)

Se prepara BTC con una concentración de 1.9 mg/200 uL.

### **2.10.3. Preparación de enzimas**

- Acetilcolinesterasa (AChE)

Se preparó AChE a una concentración de 0.195 U/mL.

- Butirilcolinesterasa (BuChE)

Se preparó BuChE a una concentración de 6.25 U/mg.

## 2.11. Galantamina (compuesto referencia)

Se preparó 12 mg de galantamina con una concentración de  $3.48 \times 10^{-3}$  M de la solución madre, a partir de dicha solución se prepararon las siguientes diluciones:

**Tabla 5-2:** Concentraciones de galantamina para los ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

Concentraciones de galantamina para Acetilcolinesterasa		Concentraciones de galantamina para Butirilcolinesterasa	
12.5 mg/ml	$1.25 \times 10^{-4}$ M	100 mg/ml	$1 \times 10^{-4}$ M
10 mg/ml	$1 \times 10^{-5}$ M	30 mg/ml	$0.3 \times 10^{-3}$ M
7.5 mg/ml	$0.75 \times 10^{-5}$ M	10 mg/ml	$1 \times 10^{-5}$ M
5 mg/ml	$0.5 \times 10^{-5}$ M	5 mg/ml	$0.5 \times 10^{-5}$ M
2.5 mg/ml	$0.25 \times 10^{-5}$ M	1 mg/ml	$1 \times 10^{-6}$ M
0.5 mg/ml	$0.5 \times 10^{-6}$ M		
0.1 mg/ml	$1 \times 10^{-7}$ M	0.5 mg/ml	$0.5 \times 10^{-6}$ M

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

## 2.12. Muestra Alcaloidal de *Hymenocallis* sp.

Se realizaron los ensayos de inhibición enzimática disolviendo el extracto alcaloidal de *Hymenocallis* sp. en diferentes cosolventes (A y B) variando las concentraciones, con el fin de determinar en qué caso se obtenía mejores valores de  $IC_{50}$ .

Las concentraciones finales para acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa se muestra en la tabla 6-2.

**Tabla 6-2:** Concentraciones de *Hymenocallis sp.* utilizadas en los ensayos de inhibición para acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

Soluciones de <i>Hymenocallis sp.</i> para Acetilcolinesterasa	Soluciones de <i>Hymenocallis sp.</i> para Butirilcolinesterasa
100 µg/ml	500 µg/ml
80 µg/ml	400 µg/ml
40 µg/ml	300 µg/ml
20 µg/ml	200 µg/ml
10 µg/ml	100 µg/ml
5 µg/ml	50 µg/ml
1 µg/ml	25 µg/ml

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

### 2.13. Ensayos de inhibición enzimática de AchE Y BuChE

Para los ensayos de inhibición se trabajó con una microplaca de acuerdo al método de Ellman et al. (1961), modificado por Ortiz et al. (2016). Se adicionó 50 uL de AChE o BuChE según sea el caso disueltas en buffer (8 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, pH 7.5) y 50 uL de la muestra disuelta en el mismo buffer.

Se incubó la placa a 24 °C durante 30 min y se agregó 100 uL de solución sustrato (acetilcolina o butirilcolina, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 M DTNB, y 0.6 mM ATC, pH 7.5). Luego de 5 min, la absorbancia fue leída en un lector de micro placas Thermo Scientific Multiskan a una λ= 405 nm.

### 2.14. Análisis de datos

De las lecturas realizadas en el Espectrofotómetro se obtuvieron absorbancias que fueron procesadas en Excel para adquirir el porcentaje de inhibición, empleando la siguiente fórmula:

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

Donde:

M: Lectura muestra

C: Lectura control

BM: Lectura blanco muestra

BC: Lectura blanco control

### **2.15. Curva de inhibición enzimática para la determinación del IC<sub>50</sub>**

Por medio de la curva de inhibición enzimática se representa al eje y que corresponde a los porcentajes de inhibición en función del eje x que corresponde a la concentración del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.*, mediante el cual se traza una línea de tendencia logarítmica con su respectiva ecuación (Ortiz et al., 2016).

Los datos obtenidos de la curva se utilizaron para calcular el IC<sub>50</sub>, el cual representa la concentración que inhibe el 50 % de las enzimas.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados obtenidos del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* serán presentados en este apartado en base a la metodología expuesta en el apartado anterior.

#### 3.1. Extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.*

En la extracción de la fracción alcaloidal se pesaron 20 g de material vegetal seco y triturado, y se obtuvo el porcentaje rendimiento de alcaloides de 1.634%.

**Tabla 1-3:** Rendimiento de la fracción alcaloidal de *Hymenocallis sp.* por extracción metanólica

Extracto	Metanólico
Muestra vegetal	Bulbo de <i>Hymenocallis sp.</i>
Peso del material vegetal seco de <i>Hymenocallis sp.</i> (g)	20
Volumen de metanol (ml)	800
Alcaloides presentes (mg)	326.9
Rendimiento (%)	1.634

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

El rendimiento de la fracción alcaloidal de *Hymenocallis sp.* fue de 1.634 %, pero es importante tomar en cuenta que el porcentaje de rendimiento puede variar dependiendo de la parte de la planta que se tome la muestra y del tipo de extracción que se emplee. El porcentaje de rendimiento obtenido de *Hymenocallis sp.* es mayor al compararla con otras especies de la familia Amaryllidaceae como: *Phaedranassa glauciflora* 0.3 %, *Phaedranassa dubia* 0.2 %, *Phaedranassa narcissiflora* 0.248 % y *Eucharis formosa* 0.079 %.

### 3.2. Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas

La identificación de alcaloides presentes en la fracción alcaloidal de *Hymenocallis sp.* se realizó mediante CG-EM, los cuales se pueden observar en la tabla 2-3.

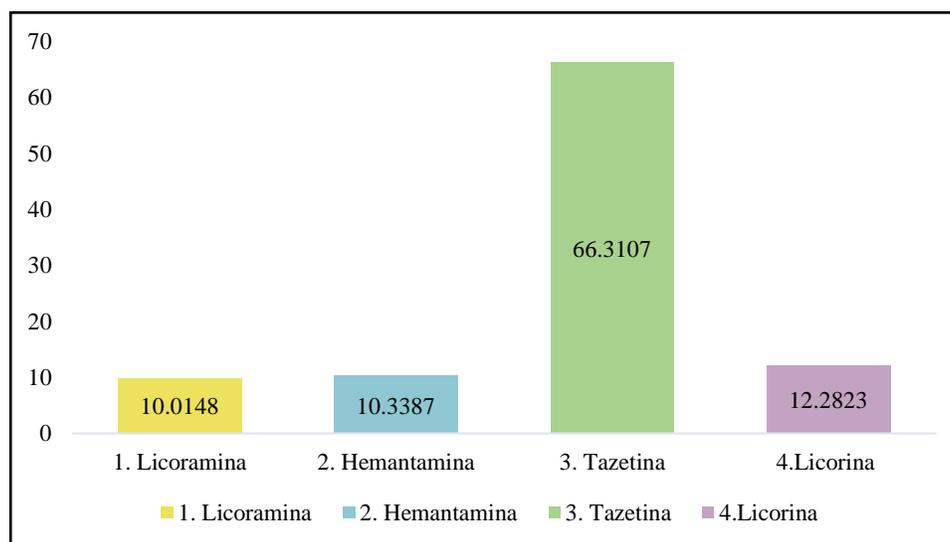
**Tabla 2-3:** Alcaloides identificados en el extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* por CG-EM

Alcaloides	Rt	RI	µg gal/100 mg PS
Licoramina	23.1602	2447.2	10.0148
Hemantamina	26.4857	2667.4	10.3387
Tazetina	26.7180	2683.3	66.3107
Licorina	28.1231	2782.1	12.2823

**Interpretación:** Rt: tiempo de retención; RI: índice de retención; PS: peso seco

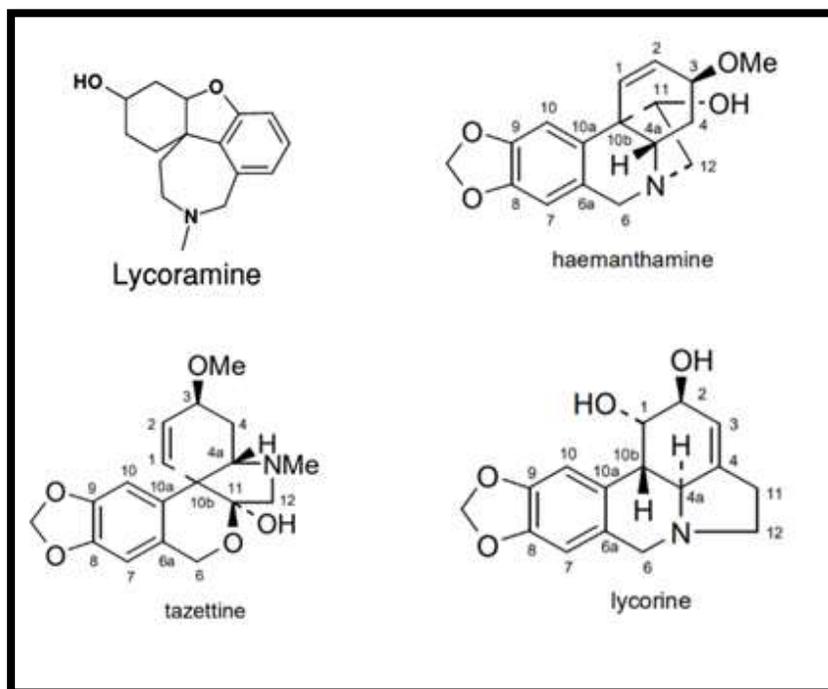
**Fuente:** Universidad de Barcelona

**Realizado por:** Laura Torres y Jaume Bastidas



**Gráfico 1-3:** Cantidad (µg gal/100 mg PS) de alcaloides del extracto del bulbo puro de *Hymenocallis sp.*

**Realizado por:** Vergara Zurita, Edith, 2019.



**Figura 6-3:** Estructura Química de los alcaloides presentes en el extracto de *Hymenocallis sp.*

Fuente: (Bastida et al., 2011, p. 67).

Por medio de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se identificaron 4 alcaloides en el extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.*, siendo tazetina el alcaloide más abundante con un 66.3107 ( $\mu\text{g gal}/100 \text{ mg PS}$ ), seguido por la licorina con una concentración de 12.2823 ( $\mu\text{g gal}/100 \text{ mg PS}$ ), en menor cantidad se encuentra la hemantamina con 10.3387 ( $\mu\text{g gal}/100 \text{ mg PS}$ ) y licoramina con una concentración de 10.0148 ( $\mu\text{g gal}/100 \text{ mg PS}$ ).

El alcaloide mayoritario fue la tazetina, también identificado por el método CG-EM en menor cantidad en varias especies vegetales de la familia Amaryllidaceae como: *Habranthus tubispathus*, *Caliphruria subedentata*, *Rhodophiala bagnoldii*, *Rhodophiala pratensis*, *Rhodophiala volckmannii*, *Eucharis amazónica*, *E. grandiflora*, *Crinum Kunthianum*. Cabe mencionar que no hay estudios específicos de identificación del alcaloide tazetina en el género *Hymenocallis*.

La tazetina es considerado como un hipotensor débil, además posee actividad antiinflamatoria, antitumoral, anti-malárico y antibacterial (Cabezas, 2007, p. 239).

La licorina fue el primer alcaloide aislado del género *Hymenocallis* en 1920, este alcaloide a pesar de encontrarse en baja proporción es de gran interés debido a que es uno de los alcaloides más abundantes en la familia Amaryllidaceae y presenta gran actividad biológica incluyendo inhibición enzimática. Cabe mencionar que la licorina no se usa para el tratamiento en la enfermedad del Alzheimer y otras demencias relacionadas, debido a que es particularmente tóxica (Cabezas et al., 2013, p.69).

En un estudio realizado en México a partir del extracto de raíces y flores de *Hymenocallis littoralis* se aisló el alcaloide licorina, que posee efectos antineoplásicos y antivirales.

La hemantamina uno de los alcaloides minoritarios que se encontraron en el extracto del bulbo de *Hymenocallis sp.* posee una actividad inductora de apoptosis, antiinflamatoria, antiretrovirales, analgésico e hipotensivo y la licoramina es un alcaloide con actividad antiprotozoaria, hipertensivo y citotóxico (Jean Pablo de Andrade, 2014, p. 36).

Existe un estudio en el cual se extrajo el alcaloide hemantamina del género *Narcissus*, dicho alcaloide bloquea la producción de proteínas por los ribosomas, lo que ralentiza el crecimiento de las células cancerosas (Pellegrino et al., 2018, p.1).

Se han realizado estudios de identificación de alcaloides por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en Brasil a varias especies del género *Hymenocallis*, en el cual se han identificado a los siguientes alcaloides tazetina, hipeatrina y hemantidina (Sousa, 2009, p.13).

Debido a que *Hymenocallis sp.* es poco estudiada no existen estudios a profundidad sobre esta planta, pero se ha identificado ciertos alcaloides en otras especies como: licorina, licoramina y hemantamina en: *S. formosissima*, *E. amazónica*, *E. grandiflora*, *Zephyranthes sp.* (Escobar, 2014, p. 50).

### 3.3. Determinación de la actividad inhibitoria de AChE y BuChE

La determinación de la actividad inhibitoria de *Hymenocallis sp.* se realizó en base a la metodología de Ellman et al., (1961) con modificaciones de Ortiz (2016), usando diferentes soluciones madre de origen, detalladas en el apartado de metodología.

#### 3.3.1. Actividad inhibitoria con Solución Madre 1

##### 3.3.1.1. Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa con Solución Madre 1

#### Primer análisis

Para empezar el análisis de los extractos alcaloidales de Amaryllidaceae se utilizaron en primera instancia las concentraciones de 100, 50, 10, 1  $\mu\text{g/ml}$ , para tener una base sobre la tendencia de la recta y el valor de  $\text{IC}_{50}$ .

Se realizaron tres repeticiones consecutivas de las concentraciones antes mencionadas obteniendo así los siguientes resultados:

**Tabla 3-3:** Porcentaje de inhibición sobre la enzima AChE del extracto alcaloidal *Hymenocallis sp.* en el primer análisis.

Concentración del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> $\mu\text{g/ml}$	Porcentaje de inhibición sobre la enzima AChE
100	$65.84 \pm 1.34$
50	$49.17 \pm 0.97$
10	$12.84 \pm 1.73$
1	$-6.84 \pm 0.64$

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

Por medio de los datos analizados se obtuvieron resultados como se muestra en la tabla 3-3, en base a los resultados obtenidos en primera instancia se intuyó que el IC<sub>50</sub> se encontraba entre 100 µg/mL y 50 µg/mL. Es por ello que se incluyó nuevas concentraciones en este rango de concentración, con la finalidad de ajustar la curva de inhibición a la línea de tendencia logarítmica y determinar así el IC<sub>50</sub>.

## Segundo análisis

A partir de los primeros resultados se emplearon nuevas concentraciones de 100, 80, 40, 20, 10, 5 y 1 µg/ml se realizó tres repeticiones consecutivas de las mismas para dar como resultado los siguientes porcentajes de inhibición sobre la enzima acetilcolinesterasa:

**Tabla 4-3:** Porcentaje de inhibición sobre la enzima AChE del extracto alcaloidal *Hymenocallis sp.* en el segundo análisis.

Concentración del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> µg/ml	Porcentaje de inhibición sobre la enzima AChE
100	84.82 ± 0.69
80	79.26 ± 0.93
40	70.41 ± 1.95
20	55.63 ± 0.49
10	39.62 ± 0.37
5	22.86 ± 1.10
1	-6.38 ± 5.54

**Realizado por:** Vergara Zurita, Edith, 2019.

De los resultados obtenidos se realizó un promedio de las tres repeticiones, como se indica en la tabla 4-3 en el extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* se muestra que a una concentración de 100 µg/ml hay una inhibición sobre la enzima acetilcolinesterasa del 84.82 %, cabe mencionar que también se pudo obtener dos valores por encima del 50 % de inhibición y dos valores por debajo, lo cual indica la validez del ensayo.

En base a los valores obtenidos en la tabla 4-3 la concentración inhibitoria media fue de  $16.83 \pm 0.41$   $\mu\text{g/ml}$ , lo cual indica que esa es la concentración que se necesita para inhibir el 50% de la enzima AChE. Al compararla con el  $\text{IC}_{50}$  del control de galantamina ( $0.47 \pm 0.08$   $\mu\text{g/ml}$ ) se puede observar que el valor es superior pero aun así muestra una actividad alta frente a la enzima.

**Tabla 5-3:** Resultados de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* sobre la enzima AChE con su valor de  $R^2$ .

Resultados	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$R^2$
Galantamina	$0.47 \pm 0.08$	0.91
<i>Hymenocallis sp.</i>	$16.83 \pm 0.41$	0.99

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

### 3.3.1.2. Actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con Solución Madre 1.

#### Primer análisis

Para empezar el análisis de los extractos alcaloidales de Amaryllidaceae se utilizaron en primera instancia las concentraciones de 100, 50, 10, 1  $\mu\text{g/ml}$ , para tener una base sobre la tendencia de la recta y el valor de  $\text{IC}_{50}$ .

Se realizó tres repeticiones consecutivas de las concentraciones antes mencionadas obteniendo así los siguientes resultados:

**Tabla 6-3:** Porcentaje de inhibición sobre la enzima BuChE del extracto alcaloidal *Hymenocallis sp.* en el primer análisis.

Concentración del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> $\mu\text{g/ml}$	Porcentaje de inhibición sobre la enzima BuChE
100	$14.90 \pm 6.14$
50	$5.25 \pm 4.26$
10	$-4.11 \pm 6.23$
1	$-8.02 \pm 4.15$

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

Por medio de los datos analizados se obtuvieron resultados como se muestra en la tabla 6-3, en base a los resultados obtenidos en primera instancia se intuye que el IC<sub>50</sub> se encontraba en concentraciones superiores a 100 µg/mL. Es por ello que se incluyeron nuevas concentraciones en este rango de concentración, con la finalidad de ajustar la curva de inhibición a la línea de tendencia logarítmica y determinar así el IC<sub>50</sub>.

### Segundo análisis

A partir de los primeros resultados se incluyeron nuevas concentraciones de 500, 400, 300, 200, 100, 50 y 25 µg/ml; se realizó tres repeticiones consecutivas de las mismas para dar como resultado los siguientes porcentajes de inhibición sobre la enzima butirilcolinesterasa:

**Tabla 7-3:** Porcentaje de inhibición sobre la enzima BuChE del extracto alcaloidal *Hymenocallis sp.* en el segundo análisis.

Concentración del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> µg/ml	Porcentaje de inhibición sobre la enzima BuChE
500	79.99 ± 1.98
400	70.57 ± 1.48
300	63.89 ± 3.10
200	56.69 ± 0.99
100	38.38 ± 2.15
50	18.54 ± 3.03
25	-0.24 ± 0.56

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

De los resultados obtenidos se realizó un promedio de las tres repeticiones, como se indica en la tabla 7-3 en el extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.*, mostrando que a una concentración de 500 µg/ml hay una inhibición sobre la enzima butirilcolinesterasa del 79.99 %, cabe mencionar que también se pudo obtener dos valores por encima del 50 % de inhibición y dos valores por debajo, lo cual indica la validez del ensayo.

En base a los valores obtenidos en la tabla 7-3, la concentración inhibitoria media fue de  $166.30 \pm 2.09 \mu\text{g/ml}$ , lo cual indica que esa es la concentración que se necesita para inhibir el 50% de la enzima BuChE. Al compararla con el  $\text{IC}_{50}$  del control de galantamina ( $14.97 \pm 0.48 \mu\text{g/ml}$ ) se puede observar que el valor es superior mostrando así una actividad media frente a la enzima.

**Tabla 8-3:** Resultados de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* sobre la enzima BuChE con su valor de  $R^2$ .

Resultados	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$R^2$
Galantamina	$14.97 \pm 0.48$	0.99
<i>Hymenocallis sp.</i>	$166.30 \pm 2.09$	0.99

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

### 3.3.2. Actividad inhibitoria con Solución Madre 2

La solución madre 2 corresponde al extracto *Hymenocallis sp.* + cosolvente A + Cosolvente B.

#### 3.3.2.1. Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa con Solución Madre 2

Para analizar la actividad inhibitoria con cosolvente B en la solución 2 se emplearon las concentraciones mencionadas en la tabla 4-3, obteniendo así los siguientes porcentajes de inhibición:

**Tabla 9-3:** Porcentaje de inhibición sobre la enzima AChE del extracto alcaloidal *Hymenocallis sp.* en la solución 2.

Concentración del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> $\mu\text{g/ml}$	Porcentaje de inhibición sobre la enzima AChE
100	$82.58 \pm 0.86$
80	$79.50 \pm 1.19$
40	$67.50 \pm 5.37$
20	$52.21 \pm 3.66$
10	$37.45 \pm 1.54$
5	$19.37 \pm 2.92$
1	$-10.83 \pm 8.69$

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

De los resultados obtenidos se realizó un promedio de las tres repeticiones, como se indica en la tabla 9-3 del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* mostrando que a una concentración de 100 µg/ml hay una inhibición sobre la enzima acetilcolinesterasa del 82.58%, cabe mencionar que también se pudo obtener dos valores por encima del 50 % de inhibición y dos valores por debajo, lo cual indica la validez del ensayo.

En base a los valores obtenidos en la tabla 9-3 la concentración inhibitoria media fue de  $19.13 \pm 0.22$  µg/ml, lo cual indica que esa es la concentración que se necesita para inhibir el 50% de la enzima AChE. Al compararla con el IC<sub>50</sub> del control de galantamina ( $0.57 \pm 0.26$  µg/ml) se puede observar que el valor es superior pero aun así muestra una actividad alta frente a la enzima.

**Tabla 10-3:** Resultados de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* sobre la enzima AChE con su valor de R<sup>2</sup>.

Resultados	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	R <sup>2</sup>
Galantamina	$0.57 \pm 0.26$	0.93
<i>Hymenocallis sp.</i>	$19.13 \pm 0.22$	0.99

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

### 3.3.2.2. Actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con Solución Madre 2

Para analizar la actividad inhibitoria con cosolvente B en la solución 2 se emplearon las concentraciones mencionadas en la tabla 7-3, obteniendo así los siguientes porcentajes de inhibición:

**Tabla 11-3:** Porcentaje de inhibición sobre la enzima BuChE del extracto alcaloidal *Hymenocallis sp.* en la solución 2.

Concentración del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> µg/ml	Porcentaje de inhibición sobre la enzima BuChE
500	$71.89 \pm 2.30$
400	$64.00 \pm 2.65$
300	$58.35 \pm 1.52$
200	$49.28 \pm 3.30$
100	$33.70 \pm 2.36$
50	$19.53 \pm 6.16$
25	$-0.30 \pm 12.78$

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

De los resultados obtenidos se realizó un promedio de las tres repeticiones, como se indica en la tabla 11-3 del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* mostrando que a una concentración de 500 µg/ml hay una inhibición sobre la enzima butirilcolinesterasa del 71.89%, cabe mencionar que también se pudo obtener dos valores por encima del 50 % de inhibición y dos valores por debajo, lo cual indica la validez del ensayo.

En base a los valores obtenidos en la tabla 11-3 la concentración inhibitoria media fue de  $207.18 \pm 3.79$  µg/ml, lo cual indica que esa es la concentración que se necesita para inhibir el 50% de la enzima BuChE. Al compararla con el IC<sub>50</sub> del control de galantamina ( $18.08 \pm 0.79$  µg/ml) se puede observar que el valor es superior mostrando así una actividad baja frente a la enzima.

**Tabla 12-3:** Resultados de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* sobre la enzima BuChE con su valor de R<sup>2</sup>.

Resultados	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	R <sup>2</sup>
Galantamina	$18.08 \pm 0.79$	0.98
<i>Hymenocallis sp.</i>	$207.18 \pm 3.79$	0.99

Realizado por: Edith Vergara

### 3.3.3. Actividad inhibitoria con Solución Madre 3

Se utilizó el cosolvente B en la solución 3, mediante el cual se pudo comparar con el extracto del cosolvente A pudiendo observar que era más traslúcida y presentaba menos sedimentación. De la solución madre preparada con el cosolvente B se prepararon diluciones con las concentraciones mencionadas en la tabla 4-3 para los ensayos sobre la enzima acetilcolinesterasa con el fin de añadir la curva de tendencia logarítmica y de esta manera obtener la ecuación de la curva para calcular el IC<sub>50</sub> del extracto.

### 3.3.3.1. Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa con Solución Madre 3

Para analizar la actividad inhibitoria con cosolvente B en la solución 3 se emplearon las concentraciones mencionadas en la tabla 4-3, obteniendo así los siguientes porcentajes de inhibición:

**Tabla 13-3:** Porcentaje de inhibición sobre la enzima AChE del extracto alcaloidal *Hymenocallis sp.* en la solución 3.

Concentración del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> µg/ml	Porcentaje de inhibición sobre la enzima AChE
100	85.26 ± 3.08
80	81.02 ± 2.38
40	72.62 ± 2.83
20	60.64 ± 2.89
10	46.51 ± 2.37
5	28.15 ± 2.77
1	0.82 ± 4.51

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

De los resultados obtenidos se realizó un promedio de las tres repeticiones, como se indica en la tabla 13-3 del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* mostrando que a una concentración de 100 µg/ml hay una inhibición sobre la enzima acetilcolinesterasa del 85.26%, cabe mencionar que también se pudo obtener dos valores por encima del 50 % de inhibición y dos valores por debajo, lo cual indica la validez del ensayo.

En base a los valores obtenidos en la tabla 13-3 la concentración inhibitoria media fue de  $13.60 \pm 1.55$  µg/ml, lo cual indica que esa es la concentración que se necesita para inhibir el 50% de la enzima AChE. Al compararla con el IC<sub>50</sub> del control de galantamina ( $0.63 \pm 0.11$  µg/ml) se puede observar que el valor es superior pero aun así muestra una actividad alta frente a la enzima.

**Tabla 14-3:** Resultados de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* sobre la enzima AChE con su valor de R<sup>2</sup>.

Resultados	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	R <sup>2</sup>
Galantamina	0.63 ± 0.11	0.93
<i>Hymenocallis sp.</i>	13.60 ± 1.55	0.99

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

### 3.3.4. Actividad inhibitoria con Solución Madre 4

Se utilizó el cosolvente B en la solución 4, mediante el cual se pudo comparar con el extracto del cosolvente A pudiendo observar que era más traslúcida y presentaba menos sedimentación. De la solución madre preparada con el cosolvente B se prepararon diluciones con las concentraciones mencionadas en la tabla 7-3 para los ensayos sobre la enzima butirilcolinesterasa con el fin de añadir la curva de tendencia logarítmica y de esta manera obtener la ecuación de la curva para calcular el IC<sub>50</sub> del extracto.

#### 3.3.4.1. Actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con Solución Madre 4

Para analizar la actividad inhibitoria con cosolvente B en la solución 4 se emplearon las concentraciones mencionadas en la tabla 7-3, obteniendo así los siguientes porcentajes de inhibición:

**Tabla 15-3:** Porcentaje de inhibición sobre la enzima BuChE del extracto alcaloidal *Hymenocallis sp.* en la solución madre 4.

Concentración del extracto alcaloidal de <i>Hymenocallis sp.</i> µg/ml	Porcentaje de inhibición sobre la enzima BuChE
500	73.87 ± 1.09
400	67.47 ± 2.97
300	60.31 ± 0.83
200	51.02 ± 0.82
100	37.96 ± 1.74
50	23.32 ± 2.03
25	8.23 ± 2.24

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

De los resultados obtenidos se realizó un promedio de las tres repeticiones, como se indica en la tabla 15-3 del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* mostrando que a una concentración de 500 µg/ml hay una inhibición sobre la enzima butirilcolinesterasa del 73.87%, cabe mencionar que también se pudo obtener dos valores por encima del 50 % de inhibición y dos valores por debajo, lo cual indica la validez del ensayo.

En base a los valores obtenidos en la tabla 15-3 la concentración inhibitoria media fue de  $177.30 \pm 2.22$  µg/ml, lo cual indica que esa es la concentración que se necesita para inhibir el 50% de la enzima BuChE. Al compararla con el IC<sub>50</sub> del control de galantamina ( $16.56 \pm 0.41$  µg/ml) se puede observar que el valor es superior mostrando así una actividad baja frente a la enzima.

**Tabla 16-3:** Resultados de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* sobre la enzima BuChE con su valor de R<sup>2</sup>.

Resultados	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	R <sup>2</sup>
Galantamina	$16.56 \pm 0.41$	0.98
<i>Hymenocallis sp.</i>	$177.30 \pm 2.22$	0.99

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

### 3.3.5. Análisis comparativo de resultados

#### 3.3.5.1. Acetilcolinesterasa

Los resultados obtenidos de la actividad inhibitoria sobre las enzimas acetilcolinesterasa se obtuvieron a partir de las tres repeticiones realizadas con cada dilución como se muestra en la tabla 17-3.

**Tabla 717-3:** Resultados de las tres soluciones usadas para acetilcolinesterasa

Resultados	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	R <sup>2</sup>
<i>Hymenocallis sp.</i> Solución Madre 1 (Cosolvente A concentración 1 + PBS)	16.83 ± 0.41	0.99
Galantamina	0.47 ± 0.08	0.91
<i>Hymenocallis sp.</i> Solución Madre 2 (Cosolvente A concentración 1 + Cosolvente B concentración 2)	19.13 ± 0.22	0.99
Galantamina	0.57 ± 0.26	0.93
<i>Hymenocallis sp.</i> Solución Madre 3 (Cosolvente A + Cosolvente B concentración 3)	13.60 ± 1.55	0.99
Galantamina	0.63 ± 0.11	0.93

Realizado por: Vergara Zurita, Edith, 2019.

Los resultados obtenidos de las tres soluciones en el extracto de *Hymenocallis sp.* se muestran en la tabla 17-3, en la cual se observa que no existieron cambios drásticos en los valores de IC<sub>50</sub>, pero se observó una mejor actividad en la solución madre 3, en la que hubo mayor concentración de Cosolvente B. En esta solución se observó una mejoría en la disolución del extracto.

Los resultados obtenidos del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* no se han podido comparar a profundidad con bibliografía debido a que sus estudios son escasos sobre inhibición enzimática de acetilcolinesterasa. Solamente, existe un estudio sobre la actividad inhibitoria de extractos de algunas plantas de Amaryllidaceae entre ellas se encuentra *Hymenocallis littoralis*, en este estudio presenta un IC<sub>50</sub> de 90 µg/ml y al compararlo con el extracto alcaloidal del bulbo de *Hymenocallis sp.* se puede observar que el extracto presenta mejor actividad frente a la enzima acetilcolinesterasa (Hammouda et al.,2011, pp.2).

Se encontraron estudios realizados en ciertas plantas de la familia Amaryllidaceae en el cual se ha determinado el valor de IC<sub>50</sub> sobre la enzima acetilcolinesterasa similar al extracto de *Hymenocallis*

*sp.* como: *Zephyrantes robusta* con un  $IC_{50}$  de  $12.3 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ , *Nerine filifolia*  $IC_{50}$  de  $18.5 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$ , *Nerine filamentosa*  $IC_{50}$  de  $21.6 \pm 1.1 \mu\text{g/ml}$ , *Chlidanthus fragrans*  $IC_{50}$   $20.1 \pm 2.9 \mu\text{g/ml}$  (Cahlíková et al., pp. 1202, 2010).

La actividad inhibitoria que presento el extracto de *Hymenocallis sp.* puede deberse a los alcaloides obtenidos por CG-EM, principalmente licorina y su derivado licoramina, ya que estos alcaloides muestran tener afinidad sobre la enzima AChE (Cortes et al., 2014, p. 222).

### 3.3.5.2. Butirilcolinesterasa

Los resultados obtenidos de la actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa se obtuvieron a partir de las tres repeticiones realizadas con cada dilución como se muestran en la tabla 18-3.

**Tabla 18-3:** Resultados de las tres soluciones usadas para butirilcolinesterasa

Resultados	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$R^2$
<i>Hymenocallis sp.</i> Solución Madre 1 (Cosolvente A concentración 1 + PBS)	$166.30 \pm 2.09$	0.99
Galantamina	$14.97 \pm 0.48$	0.99
<i>Hymenocallis sp.</i> Solución Madre 2 (Cosolvente A concentración 1 + Cosolvente B concentración 2)	$207.18 \pm 3.79$	0.99
Galantamina	$18.08 \pm 0.79$	0.98
<i>Hymenocallis sp.</i> Solución Madre 4 (Cosolvente A concentración 1 + Cosolvente B concentración 4)	$177.30 \pm 2.22$	0.99
Galantamina	$16.56 \pm 0.41$	0.98

**Realizado por:** Vergara Zurita, Edith, 2019.

Los resultados obtenidos de las tres soluciones en el extracto de *Hymenocallis sp.* se muestran en la tabla 18-3 mediante el cual se pudo notar cambios en los valores de  $IC_{50}$ , presentando así una mejor actividad en la solución 1. Cabe mencionar que presentó mejor actividad y solubilidad.

Los resultados obtenidos del extracto alcaloidal no se ha podido comparar con bibliografía debido a que no existen estudios sobre inhibición enzimática de *Hymenocallis sp.* sobre la enzima butirilcolinesterasa.

Se encontraron estudios realizados en ciertas plantas de la familia Amaryllidaceae en el cual se ha determinado el valor de  $IC_{50}$  sobre la enzima butirilcolinesterasa similar al extracto de *Hymenocallis sp.* como: *Chlidanthus fragrans* con un  $IC_{50}$  de  $136.8 \pm 6.9 \mu\text{g/ml}$ , *Phaedranassa viridiflora* con  $IC_{50}$  de  $125.51 \pm 3.03 \mu\text{g/ml}$  y *Eucharis formosa* con un  $IC_{50}$  de  $129.903 \pm 12.636 \mu\text{g/ml}$  (Cahlíková et al., 2010, pp.573).

## CONCLUSIONES

- Se obtuvo el extracto alcaloidal de los bulbos de *Hymenocallis sp.* obteniendo un rendimiento de extracción de 1.634 %.
- En el extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se identificaron 4 alcaloides, siendo la tazetina el compuesto mayoritario, seguido de licorina, hemantamina y licoramina.
- Mediante los resultados obtenidos del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* se determinó que a partir de la solución madre 3 se obtuvo una mejor actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa con un  $IC_{50}$  de  $13.60 \pm 1.55 \mu\text{g/ml}$ , la cual se considera alta.
- Mediante los resultados obtenidos del extracto alcaloidal de *Hymenocallis sp.* se determinó que a partir de la solución madre 1 se obtuvo una mejor actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con un  $IC_{50}$  de  $166.30 \pm 2.09 \mu\text{g/ml}$ , la cual se considera media.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda efectuar investigaciones farmacológicas a profundidad sobre el género *Hymenocallis*, debido a que los alcaloides identificados poseen actividad antitumoral, antiinflamatoria, antiviral, antibacteriana, entre otros; esto podría contribuir a la obtención de nuevos fármacos.
- Se recomienda realizar estudios enfocados en el alcaloide hemantamina, el mismo que podría ayudar en el tratamiento del cáncer.
- Debido al gran valor farmacológico que ha presentado la familia Amaryllidaceae se recomienda seguir con los estudios sobre dicha familia con el fin de encontrar metabolitos que ayuden para el tratamiento de otras enfermedades.
- Se recomienda realizar estudios genéticos para la identificación de nuevas especies del género *Hymenocallis sp.*, con el fin de aprovechar el valor farmacológico que presenta dicho género.

## GLOSARIO

<b>EA</b>	Enfermedad del Alzheimer
<b>AChEI</b>	Inhibidores de Acetilcolinesterasa
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>BuChE</b>	Butirilcolinesterasa
<b>BIFRENES</b>	Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo
<b>BTC</b>	Yoduro de Butiriltiocolina
<b>ATC</b>	Yoduro de Acetiltiocolina
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzónico
<b>CG-EM</b>	Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración Inhibitoria máxima media

## BIBLIOGRAFÍA

**ACOSTA; et al.** “Identification of the alkaloids of *stenomesson aurantiacum* (kunth) herb., an amaryllidaceae species from the ecuadorian andes”. *PharmacologyOnLine* [en línea], 2014, 3, pp. 179. [Consulta: 5 septiembre 2019]. ISSN 1827-8620. Disponible en: [file:///C:/Users/SYSTEMarket/Downloads/Identification\\_of\\_the\\_Alkaloids\\_of\\_Steno.pdf](file:///C:/Users/SYSTEMarket/Downloads/Identification_of_the_Alkaloids_of_Steno.pdf)

**ALLEGRI; et al.** “Enfermedad de Alzheimer. Guía de práctica clínica”. *Elsevier* [en línea], 2011, (España) 3 (2), pp. 121. [Consulta: 16 febrero 2019]. ISSN 1853-0028. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-argentina-301>

**BASTIDAS, JAUME; et al.** “Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids”. *Transworld Research Network* [en línea], 2011, pp. 66-67. [Consulta: 18 julio]. Disponible en: <http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/21374/1/259113.pdf>

**BIFRENES, CYTED.** [en línea], 2018. [Citado el: 30 de 07 de 2018] Disponible en: <http://www.cyted.org/es/calendario/red-bifrenes-explotaci%C3%B3n-sostenible-ciclo-de-conferencias>

**BORGOÑÓN.** Aislamiento y caracterización química de alcaloides del tipo Amaryllidaceae. Producción de galantamina por cultivos “in vitro” de *Narcissus confusus*. [en línea]. Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia. (Barcelona).1994. pp. 160-162 [Consulta: 17 junio 2019]. Disponible en: [https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2629/02.SBF\\_2de2.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2629/02.SBF_2de2.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

**CABEZAS ET AL.,** Revista Latinoamericana de química. *Análisis del contenido alcaloidico de Caliphurria Subdentata Baker (Amaryllidaceae) por el método CG-EM*, 41 (1).69, 2013. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0370-59432013000100006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-59432013000100006)

**CABEZAS ET AL.,** Alcalóides de Plantas da Família Amaryllidaceae: Isolamento Caracterização e Testes de Inibição de Acetilcolinesterase (Trabajo de titulación) (Doctorado). [En línea] Universidad estatal de Campinas. (Brasil). 2009.pp. 13 [Consulta: 2019-09-04]. Disponible en: [http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/249138/1/Silva\\_MariadoSocorroSousada\\_D.pdf](http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/249138/1/Silva_MariadoSocorroSousada_D.pdf)

**CABEZAS; et al.** Scientia et Technica. *Alcaloides y actividad biológica en Eucharis amazónica, E. grandiflora, Caliphuria subedentata y Crinum kuntianum, especies colombianas de Amaryllidaceae*, (33). 239, 2007. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84903363>

**CAHLÍKOVÁ et al.**, “Alkaloids from Some Amaryllidaceae Species and Their Cholinesterase Activity”. *Natural Product Communications*. [en línea], 2012, 7 (5), pp.573. [Consulta: 22 octubre 2019]. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1934578X1200700506>

**CARRASCO RUIZ, ANGELO FERNANDO.** Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile* (Trabajo de titulación). [En línea] Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. (Riobamba-Ecuador). 2017. pp. 24-25. [Consulta: 27 julio 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/7925>

**CARRETERO MARIÁN**, “Galantamina”. *Elsevier* [en línea], 2003, 22 (8), pp. 140. [Consulta: 20 mayo 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13051501>

**CARRETERO.** “Los inhibidores de la acetilcolinesterasa en el tratamiento del Alzheimer”. *Elsevier* [en línea], 2017, 22 (7), p. 115. [Consulta: 30 julio 2018]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13050017>

**CASTRO ANA, & MARTINEZ ANA.** "La enfermedad de alzheimer: bases moleculares y aproximaciones terapéuticas". *AEC* [En línea], 2008, (Madrid) 1 (14), p. 2, [Consulta: 27 julio 2019]. Disponible en: <http://www.aecientificos.es/empresas/aecientificos/intereshtml/alzheimer/alzheimer.htm>

**Consulado del Ecuador en el Reino de los Países Bajos**, *Ecuador Ama la Vida*. [en línea], 2017. [Citado el: 3 agosto 2018]. Disponible en: <http://www.embassyecuador.eu/site/index.php/es/turismo-inf-general-2/turismo-flora-fauna>

**CORTES, N; et al.** “Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants”. *Elsevier* [en línea], 2014, pp.222. [Consulta: 01 octubre 2019]. ISSN 0731-7085. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/267047502\\_Alkaloid\\_metabolite\\_profiles\\_by\\_GCMS\\_and\\_acetylcholinesterase\\_inhibitory\\_activities\\_with\\_binding-mode\\_predictions\\_of\\_five\\_Amaryllidaceae\\_plants](https://www.researchgate.net/publication/267047502_Alkaloid_metabolite_profiles_by_GCMS_and_acetylcholinesterase_inhibitory_activities_with_binding-mode_predictions_of_five_Amaryllidaceae_plants)

**CUSTODIO, NILTON; & MONTESINOS, ROSA.** *Enfermedad de Alzheimer* [En línea]. Perú, 2015. [Consulta: 28 julio 2018]. Disponible en: <https://www.alzheimeruniversal.eu/wp-content/uploads/2015/09/libroenfermedaddealzheimer-150925020156-lva1-app7263.pdf>

**DÍAZ, M; et al.** *Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos* [en línea]. Bogotá-Colombia: 2004. [Consulta: 2 septiembre 2019]. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=Dc7XzDR7GJMC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=Dc7XzDR7GJMC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

**EIMER; et al.** “Alzheimer’s Disease-Associated  $\beta$ -Amyloid is rapidly seeded by Herpesviridae to protect against brain infection”. *Elsevier* [en línea], 2018, (USA) 99(1), pp. 56-59. [Consulta 15 julio 2019]. Disponible en: [https://www.cell.com/neuron/pdfExtended/S0896-6273\(18\)30526-9](https://www.cell.com/neuron/pdfExtended/S0896-6273(18)30526-9)

**ELLMAN; et al.** “A New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity”. *Biochemical Pharmacology* [en línea], 1961, (USA) 7 (2), pp. 88-89. [Consulta: 12 septiembre 2019]. ISSN 0006-2952. Disponible en: <https://sci-hub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0006295261901459>

**ESCOBAR.** Caracterización química de alcaloides del género *Zephyranthes sp.* (Trabajo de Titulación). [En Línea] Universidad ICESI. (Santiago de Cali). 2014. pp.50 [Consulta: 2019-09-15]. Disponible en: [https://repository.icesi.edu.co/biblioteca\\_digital/bitstream/10906/76979/1/caracterizacion\\_quimica\\_alcaloides.pdf](https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/76979/1/caracterizacion_quimica_alcaloides.pdf)

**FOLCH; et al.** “Una revisión de los avances en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer: estrategia frente a la proteína  $\beta$ -amiloide”. *Elsevier* [en línea], 2018, (España) 33(1), p. 49. [Consulta: 10 agosto 2019]. ISSN 0213-4853. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S021348531500064X?token=4A5917D184F76650BA97091767A117141DD2C470FF6B7D3BA5E32612C5EC252CBA6CF33A3FCF36C3555CFA81E7190001>

**GARCÍA.** “Especie nueva de *Hymenocallis* (Amaryllidaceae) de Oaxaca y Puebla, México”. *Revista Mexicana de Biodiversidad* [en línea], 2010, (México) 81(3), pp. 625. [Consulta 17 septiembre 2019]. ISSN 1870-3453. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42518439003>

**GBIF,** [en línea], 2017. [Citado el: 26 de julio 2019]. Disponible en: <https://www.gbif.org/es/species/2860118>

**GONZÁLEZ MALDONADO RAFAEL.** *El extraño caso del Dr. Alzheimer.* España: Copyright, 2013. ISBN (9788461653942), pp. 42.

**GUTIÉRREZ, LUIS; ET AL.** *La Enfermedad de Alzheimer y otras demencias como problema nacional de salud.* México: Intersistemas, 2017. ISBN 978-607-443-721-8, pp. 11-12.

**GUTIÉRREZ, M.C; DROGUET, M.** “La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor”. *BOLETÍN INTEXTER* [en línea], 2002, (España), 122, pp. 35-37. [Consulta: 9 septiembre 2019]. ISSN 1131-6756. Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**HAMMODA et al.,** “Acetylcholinesterase inhibitory of some Amaryllidaceae plant extracts and their alkaloidal isolates”. *ResearchGate.* [en línea], 2011, 25 (1), pp. 2. [Consulta: 18 octubre 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/291827480\\_Acetylcholinesterase\\_inhibitory\\_activity\\_of\\_some\\_Amaryllidaceae\\_plant\\_extracts\\_and\\_their\\_alkaloidal\\_isolates](https://www.researchgate.net/publication/291827480_Acetylcholinesterase_inhibitory_activity_of_some_Amaryllidaceae_plant_extracts_and_their_alkaloidal_isolates)

**JEAN PAULO DE ANDRADE.** Estudio de la composición alcaloídica de *Narcissus broussonetii* y de tres especies brasileñas del género *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) (Trabajo de Titulación) (Doctorado). [En línea] Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia. (Barcelona-España). 2014. pp.36 [Consulta: 2019-09-06]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/c6ef/76697d21233b621fd7062e9f5363d509ae87.pdf>

**JORDÁN JOAQUÍN & PEDRO ABIZANDA.** *Conocer para aceptar. Enfermedad de Alzheimer* [en línea]. Castilla-España: 2011. [Consulta: 11 agosto 2019]. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=\\_kqCAgAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=_kqCAgAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

**KATZUNG BERTRAM; et al.** “Farmacología básica y clínica” [en línea]. 13ª ed. 2017. [Consulta: 20 agosto 2019]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1832&sectionid=126874993>

**LEÓN YÁNEZ.** “*Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador*” [en línea]. 2ª ed. Quito-Ecuador: Copyrighted materia, 2012. [Consulta: 18 junio 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=UeteDwAAQBAJ&pg=PA17&dq=libro+rojo+de+las+plantas+endemicas+del+ecuador&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiWypW1n->

zkAhWhrVkJKHTXID5IQ6AEIODAD#v=onepage&q=libro%20rojo%20de%20las%20plantas%20endemicas%20del%20ecuador&f=false

**MANZANO, YOLIMA; et al.** “Deficiencia de butirilcolinesterasa identificada después de la administración de succinilcolina”. *IATREIA* [en línea], (Colombia) 31 (1), pp. 98-99. [Consulta: 14 septiembre 2019]. ISSN 0121-0793. Disponible en: <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/325586/20786723>

**OMS,** 2017 [en línea]. [Citado el: 07 de julio 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/countries/ecu/es/>

**ORTIZ, JAVIER; et al.** “Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and their Cholinesterase inhibitory activities: An in vitro and in silico study”. *Journal of Natural Products* [en línea], 2016, pp. 1247. [Consulta: 15 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27096334>

**PELLEGRINO, S; et al.** “The Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine binds the eukaryotic ribosome to repress cancer cell growth”. *Elsevier* [en línea], 2018, 26, pp. 1. [Consulta: 14 enero 2020]. Disponible en: <https://www.sciencedaily.com/releases/2018/02/180226090911.htm>

**PÉREZ-TRULLÉN.** “Breve biografía de Alois Alzheimer”. *Neurosciences and History* [en línea], 2013, (España) 1 (3), pp. 129-130. [Consulta: 15 febrero 2019]. ISSN 2254-6146. Disponible en: [http://nah.sen.es/vmfiles/abstract/NAHV1N32013125\\_136ES.pdf](http://nah.sen.es/vmfiles/abstract/NAHV1N32013125_136ES.pdf)

**SECRETARIA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO** Toda una Vida. Quito: s.n., 2017, pp. 53-55.

**SOUSA, María del Socorro.** Alcaloides de plantas de la familia Amaryllidaceae: aislamiento, caracterización y ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa. [En línea] (Tesis de doctorado). Universidad Estatal de Campinas, Instituto de Química. (Capinas). 2009. pp.7-10. [Consulta: 12 octubre 2019]. Disponible en: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/249138>

**SUNDARASEKAR et al.,** “Potencial antioxidant activities of methanolic extracts of Spider lily (*Hymenocallis littoralis*)”. *Australian Journal of Crop Science*. [en línea], 2013, Universiti Sains Malaysia, 7 (5), pp.627. [Consulta: 20 octubre 2019]. ISSN 1835-2707. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/f5c5/424fc413e9a46e988172680c7f7179c76a82.pdf>

**UNDELAR.** "Amaryllidaceae". [En línea] 2013. [Citado el: 29 julio 2018]. Disponible en: [http://www.thecompositaehut.com/www\\_tch/webcurso\\_spv/familias\\_pv/amaryllidaceae\\_amaryllidoideae.html](http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/amaryllidaceae_amaryllidoideae.html)