



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE
ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL
EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Phaedranassa cinerea***

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACEUTICA

AUTORA: SALAZAR SANTAMARÍA CRISTINA MACARENA

TUTORA: Lic. KAREN LISSETH ACOSTA LEON, M.Sc.

Riobamba-Ecuador

2017

©2017, Cristina Macarena Salazar Santamaría

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 de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que el trabajo de investigación: “DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Phaedranassa cinerea*”, de responsabilidad de la señorita, Cristina Macarena Salazar Santamaría, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Lic. Karen Acosta M.Sc.

DIRECTOR DEL TRABAJO

DE TITULACIÓN

BqF. Gisela Pilco M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Cristina Macarena Salazar Santamaría declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Cristina Macarena Salazar Santamaría

180455927-4

DEDICATORIA

A mi familia, luz en medio de cualquier oscuridad, el abrazo que no me deja naufragar.

Cristina

AGRADECIMIENTOS

Les agradezco infinitamente a mis padres por todo su amor, sus cuidados, su guía y su fe en mí, sin los cuales no podría haber alcanzado este objetivo. A Michelle, mi hermana, por todo su cariño, su ayuda en los momentos difíciles, su paciencia y tolerancia.

A mi hijo Daniel, por ser mi motor, mi inspiración, por enseñarme a cuestionarlo todo e insistir hasta obtener respuestas, por enseñarme sobre el amor.

Mi sincero agradecimiento y gratitud al grupo de investigación GIPRONAF, Karen, que además de ser mi maestra es mi gran amiga y un excelente ser humano, a M.Sc. Gisela Pilco por su valioso apoyo durante la realización de este proyecto; a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias y a la Escuela de Bioquímica y Farmacia en donde pude desarrollarme hasta completar mi formación en esta etapa académica.

A la Universidad Nacional Autónoma de Chimborazo, por permitirnos disponer de recursos necesarios para la ejecución de este proyecto.

A mis maestros, quienes han sido parte fundamental de mi formación, y a compañeros y amigos con quienes hemos aprendido dentro y fuera de las aulas valiosas lecciones de vida.

A todas las personas que, con su cariño, apoyo o ayuda, han colaborado para hacer esto posible.

Cristina

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celcius
M	Molar
uM	Micro molar
g	Gramo
mg	Miligramos
L	Litro
mL	Mililitros
μL	Micro litro
cm²	Centímetro cuadrado
mm	Milímetro
h	Hora
min	Minuto
A	Absorbancia
ppm	Partes por millón
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
EA	Enfermedad de Alzheimer
AChE	Acetilcolinesterasa
BuChE	Butirilcolinesterasa
ATC	Acetilticolina
BTC	Butirilticolina yodada
DTNB	Ácido 5,5 - ditio - bis- (2 - nitrobenzoico)
AChEI	Inhibidor de acetilcolinesterasa

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	XIII
SUMMARY	XIII
INTRODUCCIÓN	XIV

CAPÍTULO I

1.	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	5
1.1	Fundamentación Teórica y Conceptual	5
1.1.1	<i>Droga</i>	5
1.1.2	<i>Droga vegetal</i>	5
1.1.3	<i>Principio activo</i>	5
1.1.4	<i>Extracto vegetal</i>	5
1.1.5	<i>Extracción</i>	6
1.1.6	<i>Metabolitos secundarios</i>	5
1.1.6.1	<i>Alcaloides</i>	9
1.1.7	<i>Familia Amaryllidaceae</i>	7
1.1.7.1	<i>Alcaloides de la familia Amaryllidaceae</i>	10
1.1.7.2	<i>Subfamilia Amaryllioideae</i>	13
1.1.7.3	<i>Género Phaedranassa</i>	13
1.1.7.4	<i>Phaedranassa cinerea Ravenna</i>	15
1.1.8	<i>Alzheimer</i>	15
1.1.8.1	<i>Beta-amiloide</i>	17
1.1.8.2	<i>Tratamiento de Enfermedad de Alzheimer</i>	18
1.1.8.3	<i>Inhibición de Acetilcolinesterasa</i>	18
1.1.8.4	<i>Inhibidores de Acetilcolinesterasa</i>	19
1.1.9	<i>Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)</i>	19
1.1.10	<i>Determinación de actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa</i>	20
1.1.10.1	<i>Método modificado de Ellman y colaboradores</i>	22

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO.....	21
2.1	Tipo y diseño de Estudio	21

2.1.1	<i>Unidad de análisis</i>	21
2.1.2	<i>Población de Estudio</i>	21
2.1.3	<i>Tamaño de Muestra</i>	21
2.2	Lugar de recolección del material vegetal	21
2.2.1	<i>Selección de muestra</i>	21
2.3	Lugar de investigación	21
2.4	Materiales, equipos y reactivos	21
2.4.1	<i>Material vegetal</i>	21
2.4.2	<i>Materiales</i>	23
2.4.3	<i>Equipos</i>	25
2.4.4	<i>Reactivos</i>	26
2.5	Recolección y acondicionamiento de la droga vegetal	27
2.5.1	<i>Recolección</i>	27
2.5.2	<i>Limpieza</i>	27
2.5.3	<i>Secado</i>	27
2.5.4	<i>Reducción de tamaño de droga vegetal seca (Molienda)</i>	27
2.6	Técnicas y Métodos	28
2.6.1	<i>Extracción de alcaloides</i>	28
2.6.1.1	<i>Obtención de extracto bruto</i>	31
2.6.1.2	<i>Obtención de extracto de alcaloides</i>	31
2.6.2	<i>Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto de alcaloides de Phaedranassa cinerea</i>	30
2.6.3	<i>Determinación de actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa</i> ...	30
2.6.3.1	<i>Preparación de reactivos</i>	32
2.6.3.2	<i>Preparación de sustrato</i>	37
2.6.3.3	<i>Preparación de enzimas</i>	38
2.6.3.4	<i>Disoluciones de galantamina</i>	39
2.6.3.5	<i>Disoluciones de extracto de alcaloides de Phaedranassa cinerea</i>	41
2.6.3.6	<i>Diseño de placa</i>	42
2.6.3.7	<i>Cálculo de resultados</i>	42

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	42
3.1	Extracto de alcaloides	42
3.2	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas	42
3.3	Etapas seguidas en la puesta a punto del método modificado de Ellman et al.	44

3.3.1	<i>Etapa 1. Determinación de condiciones de almacenamiento, área de trabajo, equipos y tiempo</i>	44
3.3.1.1	<i>Almacenamiento de reactivos</i>	46
3.3.1.2	<i>Condiciones experimentales</i>	47
3.3.2	<i>Etapa 2. Estandarización de Galantamina</i>	46
3.3.2.1	<i>Acetilcolinesterasa</i>	48
3.3.2.2	<i>Butirilcolinesterasa</i>	48
3.3.3	<i>Etapa 3. Análisis de muestras de alcaloides de Phaedranassa cinerea</i>	47
3.3.3.1	<i>Acetilcolinesterasa</i>	49
3.3.3.2	<i>Butirilcolinesterasa</i>	50
3.4	Determinación de IC50 del Extracto de alcaloides de Phaedranassa cinerea	50
3.4.1	<i>Acetilcolinesterasa</i>	50
3.4.2	<i>Butirilcolinesterasa</i>	52

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Lista de materiales empleados en los diferentes procesos.....	23
Tabla 2-2:	Lista de equipos empleados en los diferentes procesos.....	25
Tabla 3-2:	Lista de reactivos empleados en los diferentes ensayos.	26
Tabla 4-2:	Preparación de disoluciones de galantamina.	38
Tabla 5-2:	Secuencia de adición de reactivos en microplaca.....	40
Tabla 1-3:	Alcaloides presentes en bulbo de <i>P. cinerea</i> , obtenidos mediante CG-EM.	42
Tabla 2-3:	Resultados de la primera prueba de extracto de alcaloides de <i>P. cinerea</i> frente a AChE.	47
Tabla 3-3:	Resultados de la segunda prueba de extracto de alcaloides de <i>P. cinerea</i> frente a AChE.	48
Tabla 4-3:	Resultados de la primera prueba de extracto de alcaloides de <i>P. cinerea</i> frente a BuChE.	49
Tabla 5-3:	Resultados de la segunda prueba de extracto de alcaloides de <i>P. cinerea</i> frente a BuChE.	49
Tabla 6-3:	Resultados de la tercera prueba de extracto de alcaloides de <i>P. cinerea</i> frente a BuChE.	50
Tabla 7-3:	Resultados de la determinación de actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de <i>P. cinerea</i> y galantamina frente a AChE.	51
Tabla 8-3:	Resultados de la determinación de actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de <i>P. cinerea</i> y galantamina frente a AChE.	52

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1-1:	Tipos de esqueletos de alcaloides de la familia Amaryllidaceae.	10
Figura 2-1:	Alcaloides con esqueletos de tipo galantamina.	11
Figura 3-1:	Mapa de distribución de <i>Phaedranassa</i> spp. en Ecuador.	12
Figura 4-1:	<i>Phaedranassa cinerea</i> . Flores.	13
Figura 5-1:	<i>Phaedranassa cinerea</i> Ravenna. Planta seca.	14
Figura 1-2:	Esquema para la obtención del extracto de alcaloides de <i>Phaedranassa cinerea</i>	28
Figura 1-3:	Porcentaje de Abundancia de alcaloides de <i>P. cinerea</i> , obtenido mediante CG-EM.	43

RESUMEN

El objetivo del estudio fue acondicionar el método de Ellman et al., descrito por López en 2002 para la determinación de actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) y cuantificar dicha actividad en un extracto de alcaloides de bulbos de *Phaedranassa cinerea*, usando la galantamina como referencia; además de identificar los alcaloides presentes en *P. cinerea* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La familia vegetal Amaryllidaceae produce alcaloides de tipo isoquinolínico, farmacológicamente activos, siendo galantamina el más interesante por su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer como inhibidor de AChE y BuChE. El material vegetal fue recolectado en el sector del puente Salsipuedes cantón Pallatanga, perteneciente a la provincia de Chimborazo, en marzo del 2017. La extracción de alcaloides se efectuó mediante un protocolo basado en el cambio de pH, fundamentado en la naturaleza química de estos compuestos. Los alcaloides identificados en el extracto de *P. cinerea* fueron: Galantamina, N-formilnorgalantamina, Pancratina C y N-demetilgalantamina; en orden de abundancia. Mediante el método puesto a punto, se determinó que el IC50 del extracto, inhibiendo AChE fue de 37.600 ± 0.097 , frente al de galantamina que fue de 0.869 ± 0.172 ; mientras que el IC50 del extracto inhibiendo BuChE fue de 108.505 ± 8.978 , frente al de galantamina que fue de 17.232 ± 2.884 . Se concluye, por lo tanto, que la galantamina pura tiene una actividad superior en la inhibición de colinesterasas, frente al extracto obtenido. Se recomienda efectuar estudios complementarios de esta especie, sin descuidar su conservación.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FITOQUÍMICA>, <ALCALOIDES>, <AMARYLLIDACEAE> <*Phaedranassa cinerea*>, <ACTIVIDAD INHIBITORIA>, <ACETILCOLINESTERASA>, <BUTIRILCOLINESTERASA>, <EXTRACTOS DE PLANTAS>, <GALANTAMINA>, <CROMATOGRFÍA DE GASES> <ESPECTROMETRÍA DE MASAS>.

SUMMARY

The objective of the study was to fine-tune the method of Ellman et al., Described by López in 2002 for the determination of acetylcholinesterase inhibitory activity (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) and to quantify such activity in an extract of bulb alkaloids of *Phaedranassa cinerea*, using galantamine as reference; besides identifying the alkaloids present in *P. cinerea* by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry. The plant family Amaryllidaceae produces isoquinolinic type alkaloids, pharmacologically active, galantamine being the most interesting for its use in the treatment of Alzheimer's disease as an inhibitor of AChE and BuChE. The vegetal material was collected in the sector of the Salsipuedes bridge Pallatanga, belonging to the province of Chimborazo, in March 2017. The extraction of alkaloids was carried out by means of a protocol based on the pH change thanks to the chemical nature of these compounds. The alkaloids identified in the *P. cinerea* stratum were: Galantamine, N-formylnorgalantamine, Pancratinin, C and N-demethylgalantamine; in order of abundance. By means of the fine-tuned method, it was determined that the IC₅₀ of the stratum, inhibiting AChE, was $37,600 \pm 0.097$, compared to that of galantamine, which was 0.869 ± 0.172 ; while the IC₅₀ of the extract inhibiting AChE and BuChE was of 108.505 ± 8.978 , against that of galantamine that was of 17.232 ± 2.884 . It is concluded, therefore, that pure galantamine has a superior activity in the inhibition of polynethrene, compared to the obtained extract. It is recommended to carry out complementary studies without neglecting their conservation.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <PHYTOCHEMISTRY>, <ALCALOIDS>, <AMARYLLIDACEAE>, <*Phaedranassa cinerea*>, <INACTIVITY INHIBITORY>, <ACETYLCHOLINESTERASE>, < BUTIRYLCHOLINESTERASE >, <PLANTS' EXTRACTS>, <GALANTAMINE>, <GAS CROMATOGRAPHY>, <MASS SPECTROMETRY>.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología que tiene incidencia global, según datos de la OMS, es la causa del 60 a 70% de los casos de demencia en el planeta, que afectan alrededor de 50 millones de personas y cada año se suman 7,5 millones más (OMS, 2016).

La demencia es una patología que impide al desarrollo normal de las actividades cotidianas de quien la padece, afectando a su memoria, capacidad intelectual y subsecuentemente a su comportamiento; no es una consecuencia normal del envejecimiento en las personas, aunque los pacientes suelen ser adultos mayores. Al ser un síndrome de naturaleza progresiva y degenerativa, causa problemas graves en la vida de los pacientes y su entorno. (OMS, 2016).

En Ecuador, hasta el 2014, se estimaba que habían de 80 a 100 mil personas que padecían EA, según datos de la Asamblea Nacional (Asamblea Nacional de la República del Ecuador, 2014) obtenidos mediante un censo efectuado en nuestro país, en el "Anuario de Estadísticas Vitales, Nacimientos y Defunciones 2014" (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2014). En el 2011, 3894 personas murieron por demencia y Enfermedad de Alzheimer, representando un 6,25% de la tasa total de mortalidad (Planificación, 2013).

Estos datos indican que esta patología afecta un grupo considerable de la población en nuestro país, y se requieren medidas para tratar con esta problemática. La enfermedad de Alzheimer no tiene cura hasta la actualidad, por lo cual los tratamientos se enfocan a controlar los síntomas de la demencia que provoca en los pacientes (OMS, 2016).

No se conoce la etiología exacta de la enfermedad de Alzheimer, existen muy pocas investigaciones cuyo objetivo haya sido identificar los factores de riesgo modificables de esta patología, y lo que se ha encontrado hasta ahora es que hay dos grandes factores comunes, necesarios en la mayoría de los casos, para que se produzca la enfermedad de Alzheimer. Estos factores están principalmente relacionados con la calidad de vida que tuvieron los pacientes antes de desarrollar demencia y sus síntomas (OMS, 2016).

Por ello, la prevención se prepara en torno a las evidencias disponibles, como la lucha contra los factores de riesgo de enfermedad vascular (diabetes, hipertensión, obesidad e hipercolesterolemia en edades medianas y tempranas), depresión en edades medianas y tardías, y algunos factores

relacionados con el modo y calidad de vida, como el consumo de tabaco, la inactividad física, o actividad física insuficiente y las dietas poco saludables (OMS, 2016). La prevención ha venido desarrollándose en el país mediante varias estrategias, discutidas en la asamblea de la OMS (OPS_OMS, 2014).

En Ecuador, las estadísticas de enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad son considerablemente elevadas, lo cual se asocia a estilo de vida inadecuado en edades tempranas y medianas, influenciado por alimentación incorrecta y estilos de vida que no incluyen hábitos deportivos adecuados (Country statistics and global health estimates by World Health Organization and UN partners, 2015).

Esto sitúa al país en riesgo de presentar tasas más altas de enfermedad de Alzheimer y afecciones similares. En el censo de 2009 se evidenció que el 16,3% de hombres y 25,7% de mujeres presentan deterioro de sus funciones cognitivas (Encuesta Salud, Bienestar y Envejecimiento, 2009).

Es relevante decir, que el grupo poblacional más afectado por EA son los adultos mayores a 65 años, mientras más incrementa la esperanza de vida en un país, mayor porcentaje de trastornos neurológicos se presentan (Bertolote, 2013).

En el Ecuador la esperanza de vida es de 74 a 79 años según la OMS e incrementa conforme la atención primaria en salud se difunde (Romero-Sandoval et al., 2012), esto es excelente para la población, pero incrementa la incidencia de casos de enfermedad de Alzheimer al incrementar el número de adultos mayores.

En el 2014, el gasto total en salud fue del 9.2% del PIB en Ecuador (Romero-Sandoval et al., 2012), un rubro importante, del cual se desprenden los gastos causados por los cuidados necesarios para los pacientes que padecen esta patología; los rubros se subdividen en costos médicos directos; costos sociales directos, como pago a cuidadores profesionales, cuidados en casa y residencias especiales; y costos de cuidados informales o no pagados.

A nivel mundial, los costos relacionados con Enfermedad de Alzheimer han ido en aumento de US\$604 billones en el 2010 a US\$818 billones en el 2015, lo cual refleja un incremento de 35,4% en cinco años, que es bastante relevante para una economía en desarrollo como la nuestra (Asociación Internacional de Alzheimer, 2015).

La situación problemática de este proyecto, va orientada a la búsqueda de una alternativa de tratamiento para pacientes con enfermedad de Alzheimer en nuestro país, al ser la farmacoterapia empleada en el tratamiento de Alzheimer bastante costosa y no pudiéndose considerar eficiente (Aznar, 2015).

En la actualidad, el tratamiento de EA se ha enfocado a controlar los síntomas de demencia y existen solamente dos tipos de fármacos recomendados para este fin, uno de ellos son los inhibidores de acetilcolinesterasa, que es una enzima encargada de metabolizar a la ACh, como la galantamina (Ho et al., 2015).

Las plantas poseen mecanismos de adaptación diversos, como la producción de metabolitos secundarios que en ocasiones benefician a la humanidad al ejercer algún efecto farmacológico en el organismo; este es el caso de la galantamina, que es un es un alcaloide terciario, de tipo isoquinolínico (Ho et al., 2015) producido por varias especies de la familia Amaryllidaceae (Lopez et al., 2002).

La galantamina es el segundo principio activo más usado en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, al ser un inhibidor de acetilcolinesterasa. Este alcaloide posee un costo relativamente alto debido a su obtención (Azevedo et al., 2011) y está presente en *Phaedranassa cinerea*, lo cual sería un recurso bastante promisorio para nuestro país; sin contar con que es una especie vulnerable según la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN (IUCN, 2016) y su reproducción mediante las técnicas adecuadas, podría evitar la extinción de esta especie vegetal, considerando su utilidad farmacológica.

Por estos motivos surgió la necesidad de evaluar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de la planta endémica *Phaedranassa cinerea*, que es una especie vegetal perteneciente a la familia Amaryllidaceae, subfamilia Amaryllidoideae (Oleas, 2011).

Varias especies de Amaryllidaceae han sido estudiadas, alrededor del mundo, y presentan alcaloides con actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, especialmente galantamina, aunque existen otros compuestos implicados; esta actividad se emplea en el tratamiento de los síntomas de demencia, causados por la enfermedad de Alzheimer (Ng et al., 2015).

Este trabajo contribuye al objetivo nacional 3 para el Buen Vivir "Mejorar la calidad de vida de la población", debido a que se enfoca a brindar una posible alternativa de tratamiento para un grupo relevante de la población ecuatoriana, que padece o podrá padecer enfermedad de Alzheimer (Desarrollo, 2013).

Dentro de los lineamientos del Plan Nacional del Buen Vivir, además, se destaca como una meta específica, la búsqueda de alternativas de tratamiento y cuidado para la demencia y enfermedad de Alzheimer, en el lapso entre 2013 y 2017 (Planificación, 2013).

En base a lo expuesto, los objetivos de esta investigación son: Realizar la extracción de alcaloides en bulbos de la especie *Phaedranassa cinérea* mediante un protocolo basado en cambios de pH, identificar los alcaloides presentes en el extracto obtenido, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; determinar las condiciones experimentales adecuadas del método de Ellman et al., para inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa y con ello determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Phaedranassa cinerea*, empleando galantamina como referencia.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Fundamentación Teórica y Conceptual

1.1.1 Droga

Sustancia de origen natural o sintético que poseen sustancias químicas con actividad biológica (Verpoorte, 2000).

1.1.2 Droga vegetal

Parte de una planta, como hojas, flores, tallo, bulbo; que contiene sustancias químicas con actividad biológica (Verpoorte, 2000).

1.1.3 Principio activo

Sustancia químicamente pura que posee actividad terapéutica (Osorio, 2009).

1.1.4 Extracto vegetal

Los extractos vegetales son mezclas complejas de diferentes compuestos químicos o metabolitos que pueden poseer actividad farmacológica, se obtienen de una planta mediante un proceso de extracción, que puede ser químico, físico o biológico (Roersch, 2004, p. 234).

Los extractos se nombran y definen según el método de extracción y solvente empleado, en la mayoría de los casos se requieren procesos complementarios para lograr una extracción óptima, como concentración y purificación (Osorio, 2009).

Se pueden extraer compuestos específicos de una droga vegetal, con el empleo de condiciones, procesos y protocolos específicos para ello, como solventes adecuados; todo está en dependencia de los compuestos de interés que se pretenda obtener (Osorio, 2009).

Pueden presentarse líquidos, como las tinturas, semisólidos con textura blanda o densa; o sólidos, denominados extractos secos. Según datos de la OMS, aproximadamente el 25% de los fármacos que son comercializados tienen origen vegetal y el 25% de estos fármacos contienen principios activos que han sido producto de hemisíntesis o síntesis en base a compuestos encontrados en plantas (Pardo, 2002).

1.1.5 Extracción

Proceso mediante el cual se separan mezclas de sustancias orgánicas complejas de una fuente natural, mediante el empleo de un solvente o una mezcla de solventes. Esto dependerá de la naturaleza de las sustancias a separar, de los protocolos a seguir y objetivos a tomar en consideración (Roersch, 2004, p. 235).

1.1.6 Metabolitos secundarios

Son moléculas orgánicas que, a diferencia de los metabolitos primarios, parecen no tener una función directa en procesos vitales para la especie vegetal, como respiración celular, nutrición, fotosíntesis, transporte de solutos o síntesis de proteínas, lípidos o carbohidratos. Difieren de los metabolitos primarios, además, en que no todos los grupos de plantas poseen metabolitos secundarios, es decir presentan una restringida distribución dentro del reino vegetal (Ávalos i García, 2009).

Los metabolitos secundarios poseen varios tipos de actividad biológica en las especies vegetales, como repelentes o atrayentes de animales para dispersión de semillas, repelentes naturales, entre otras (Ávalos i García, 2009).

La diferenciación estructural entre metabolitos primarios y secundarios es difusa al tener en consideración que comparten varios intermediarios en sus procesos de síntesis. Las rutas principales de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo del carbono (Ávalos i García, 2009).

En la actualidad existen unos 20000 metabolitos secundarios caracterizados en dos grandes grupos:

- Metabolitos secundarios nitrogenados: Alcaloides, aminas, aminoácidos no proteicos, glucósidos cianógenicos y glucosinolatos.

- Metabolitos secundarios no nitrogenados: Policéticos, terpenoides y fenilpropanoides (Llerena, 2011).

1.1.6.1 Alcaloides

Son aminas derivadas de fuentes naturales, antes conocidas como álcalis vegetales. Las aminas son compuestos orgánicos que contienen nitrógeno en su estructura, son bases débiles (Ávalos i García, 2009).

El estudio de los alcaloides ayudó en gran medida al desarrollo de la Química Orgánica en sus inicios, en el siglo XIX, y en la actualidad sigue siendo una fascinante área de investigación por su aplicabilidad (Mcmurry, 2008, p. 64).

Las estructuras alcaloidales son bastante variables, existen alcaloides estructuralmente simples, como la metilamina $-\text{CH}_3\text{NH}_2-$ que es la responsable del olor característico del pescado, y otros realmente complejos (Judd et al., 2007).

Muchos alcaloides poseen propiedades biológicas marcadas y varios de ellos, junto con sus derivados, se emplean como agentes farmacológicos en la actualidad (Mcmurry, 2008, p. 64).

Los ejemplos más claros de esto podrían ser, la morfina, que es un potente analgésico y proceden del opio de la amapola *Papaver somniferum*; la efedrina, descongestivo y broncodilatador, procedente de la *Ephedra sinica*; la reserpina, antihipertensivo y tranquilizante, que procede de raíces secas y pulverizadas de *Rauwolfia serpentina*; y la cocaína, estimulante del sistema nervioso central y anestésico, que procede de una especie endémica de las áreas de selva subtropical de América del sur, *Erythroxylon coca* (Mcmurry, 2008, p. 64).

1.1.7 Familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae se clasifica dentro del grupo principal de las Angiospermas, que es el más extenso del reino Plantae. Las angiospermas se caracterizan porque tienen flores y producen frutos con semillas. Esta familia se sitúa dentro del grupo Monocotiledonea, en el orden Asparagales. (Garden, 2010).

Son hierbas perennes, bulbosas, de bulbo tunicado, con hojas simples, alternas, dísticas, raramente espiraladas, o largamente oblongas o láminas lineares, de base envainadora, y en ocasiones pseudopeciolas. Sin estípulas (Judd et al., 2007).

Sus raíces son adventicias, contráctiles y perennes o fibrosas y de corta vida (Judd et al., 2007).

Poseen inflorescencias umbeliformes, terminadas en 2 ó más brácteas membranáceas y amplias, al final de un largo escapo (Judd et al., 2007).

Sus flores no suelen poseer olor, son bisexuales, zigomorfas o actinomorfas; rojas, amarillas, blancas o verdes tienen 6 tépalos ordenados en 2 verticilos, con ovario ínfero y 6 estambres (Judd et al., 2007).

Sus frutos son cápsulas loculicidas y las semillas se ubican en cada lóculo, con testa fina, negra o marrón, y por lo general son secas, aunque algunas se presentan carnosas, aplanadas y aladas (Judd et al., 2007).

Las especies de esta familia se hallan distribuidas en gran medida alrededor del mundo, especialmente en zonas tropicales y subtropicales del norte y sur de África, América del sur y Europa del mediterráneo (Wang et al., 2010).

Presentan una importancia cultural y económica bastante relevante en ciertas zonas, en donde se emplean como condimentos, plantas ornamentales y los usos medicinales (Chase et al., 2009).

La familia Amaryllidaceae, se divide en 3 subfamilias; Amaryllioideae, Agapanthoideae y Allioideae (Chase et al., 2009).

1.1.7.1 Alcaloides de la familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae presenta alcaloides exclusivos, que han presentado actividades terapéuticas interesantes. Las principales características de este grupo de alcaloides son:

- Contienen un átomo de nitrógeno solamente, que puede ser secundario, terciario y hasta cuaternario.
- Generalmente presentan de 16 a 20 átomos de carbono en dependencia de los sustituyentes del anillo.

- Son bases débiles moderadamente, su pKa está entre 6 y 9.
- Finalmente, su estructura base es "C₆-C₁-N-C₂-C₆", la fracción "C₆-C₁" se deriva de la L-fenilalanina y la fracción "N-C₂-C₆" deriva de la L-tirosina (Osorio, 2008).

Los alcaloides de la familia Amaryllidaceae se han ido clasificando gracias a la obtención de conocimiento de sus rutas biosintéticas; todos provienen de los aminoácidos L-fenilalanina y L-tirosina, pero varían en los acoplamientos fenólicos oxidativos (Ng et al., 2015).

La clasificación más empleada se basa en los esqueletos policíclicos que son: tazetina, licorina, crinina, hemantamina, homolicorina, narciclasina, norbelladina, montanina y galantamina (Osorio et al., 2010).

Una particularidad de estos esqueleto policíclicos es que no siguen las reglas IUPAC para su numeración de carbonos, si no que se acogen a una propuesta que prioriza la ruta biosintética de los alcaloides, la de Ghosal y colaboradores (Osorio et al., 2010).

Esta propuesta determina que:

- El anillo aromático A siempre será numerado de la misma manera, sin importar el tipo de esqueleto.
- La posición bencílica en alfa es siempre 6 con respecto al heteroátomo.
- En el anillo pirrolidínico, la posición vecinal al Nitrógeno, que no se halla comprometida con los ciclos C o B, es 12.
- En los alcaloides de tipo homolicorina, la numeración del anillo C se da en sentido antihorario, a causa de su ruta biosintética específica; en los demás se da al contrario.
- La notación ['] en los alcaloides con esqueleto de tipo norbelladina, se refiere al anillo que proviene, por su ruta biosintética, del aminoácido L-fenilalanina (Ghosal, Singh i Srivastava, 1986).

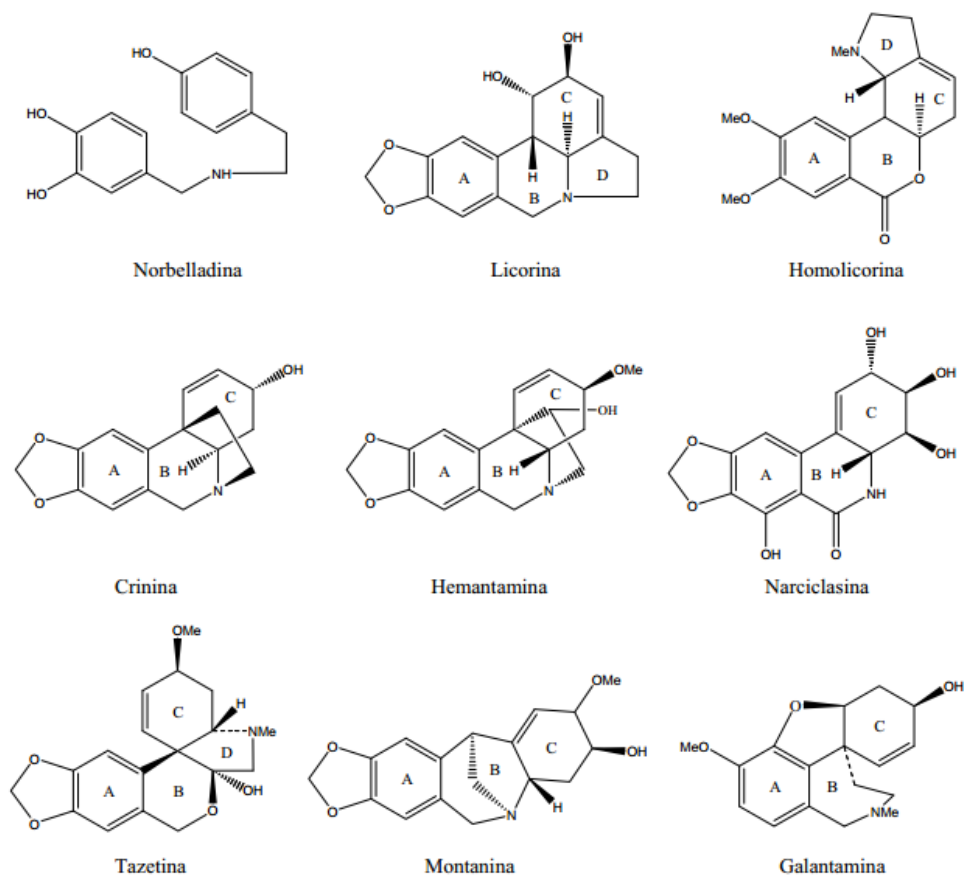


Figura 1-1: Tipos de esqueletos de alcaloides de la familia Amaryllidaceae.

Fuente: (Osorio, 2008).

Esqueleto tipo galantamina

Su estructura base un esqueleto dibenzofurano, y proceden de un acoplamiento fenólico oxidativo *para-orto*'. Son los alcaloides más interesantes desde el punto de vista farmacológico (Osorio et al., 2010).

Los alcaloides con esqueleto tipo galantamina presentan una insaturación entre los carbonos 4a - 4, y sustituciones oxigenadas en sus posiciones 3 y 9. El anillo C de la licoramina y sus derivados se muestra completamente saturado. La habrantina, por su parte, presenta una sustitución oxigenada en su posición 11 (Osorio, 2008).

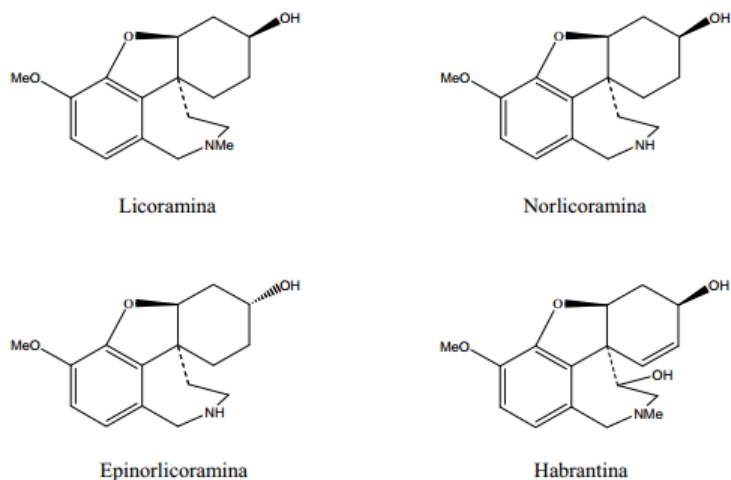


Figura 2-1: Alcaloides con esqueletos de tipo galantamina.

Fuente: (Osorio, 2008).

1.1.7.2 Subfamilia Amaryllioideae

Las especies de esta subfamilia poseen grandes flores perennes, presentan bulbo generalmente, algunas poseen rizomas; sus hojas carnosas se hallan dispuestas verticalmente en dos columnas (Stevens, 2010).

Se han empleado ampliamente por su valor ornamental y se distinguen de las otras subfamilias de Amaryllidaceae, Agapanthoideae y Allioideae, por su estilo hueco, ovario inferior y su química alcaloidal única (Stevens, 2010).

Alrededor de 70 géneros se hallan incluidos dentro de esta subfamilia, algunos de ellos son: *Acis*, *Amaryllis*, *Crinum*, *Galanthus*, *Habranthus*, *Hymenocallis*, *Lapiedra*, *Narcissus*, *Phaedranassa*, entre otras (Stevens, 2010).

1.1.7.3 Género *Phaedranassa*

El género *Phaedranassa* es neotropical y se restringe, generalmente, a la cordillera de los Andes, desde Ecuador hasta el sur de Colombia. Las poblaciones se hallan en zonas áridas y secas de la cordillera interandina. En Ecuador se han encontrado siete especies (*Phaedranassa brevifolia*, *P. glauciflora*, *P. dubia*, *P. lehmanni*, *P. tunguraguae*, *P. schizantha*, *P. cinérea* y *P. viridiflora*) de las nueve especies descritas dentro de este género, seis de ellas son endémicas del país (Oleas, 2011).

Su distribución geográfica dentro del Ecuador está concentrada en la Sierra Centro-Norte, en dónde se halla al el 85% de las especies, entre los 800 y 3500 m de altitud los dos lados de la cordillera (Oleas, Meerow i Francisco-Ortega, 2009).

Cada especie suele limitarse a un rango altitudinal específico, a excepción de *Phaedranassa viridiflora* y *P. dubia*, cuyas distribuciones no se superponen. Esta distribución sugiere los Andes ecuatorianos ubicados en la Sierra Centro-Norte pudieron ser el centro de diversificación del género *Phaedranassa* (Oleas, Meerow i Francisco-Ortega, 2009).

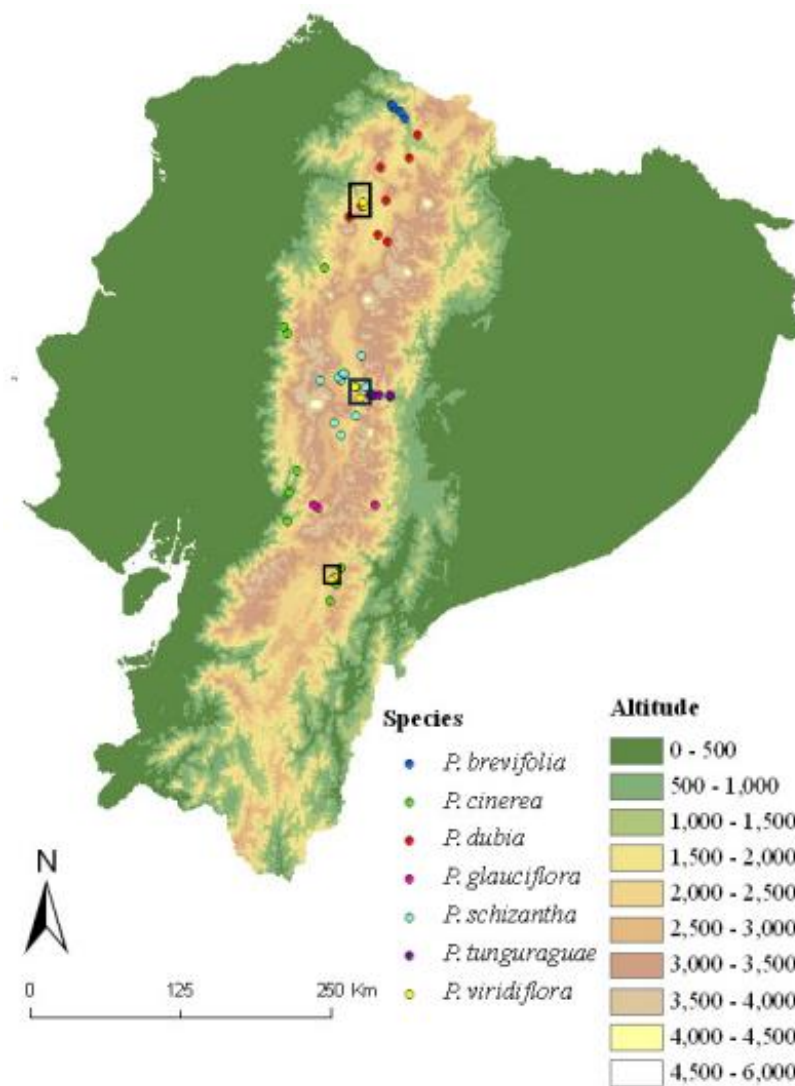


Figura 3-1: Mapa de distribución de *Phaedranassa* spp. en Ecuador.

Fuente: (Oleas, 2011)

Las especies pertenecientes al género *Phaedranassa* son geófitas, poseen bulbos recubiertos por una túnica marrón y de raíces contráctiles. Sus hojas presentan una prominente vena central en toda su longitud, varían en el tamaño y el color, en dependencia de las especies. Sus inflorescencias se presentan en forma de umbrela y tienen de 6 a 20 flores tubulares. Presentan una lámina lanceolada o elíptica, con agudo ápice y base estrecha hasta el pecíolo. Sus flores se denominan actinomorfas, cada una posee seis pétalos, que son verdes desde el ápice, en la base y al rosa, rojo, amarillo o naranja al final. Presentan también 6 estambres libres y anclados a los pétalos por la base. Presentan anteras amarillas o verdes y tres filamentos estaminales. El ovario es inferior y contiene múltiples óvulos. Sus frutos son cápsulas que llevan en su interior numerosas semillas marrones oscuro o negras, generalmente aladas y de forma plana (Oleas, Meerow i Francisco-Ortega, 2009).

1.1.7.4 *Phaedranassa cinerea* Ravenna



Figura 4-1: *Phaedranassa cinerea*. Flores.
Fuente: (Society, 2016)

Es una especie herbácea terrestre endémica de Ecuador. Pertenece al reino Plantae, filo Tracheophyta, clase Liliopsida, orden Liliales, y familia Amaryllidaceae (JSTOR, 2000).

Se conocen siete subpoblaciones localizadas principalmente en zonas secas y rocosas de los Andes, en las provincias de Pichincha, Cotopaxi y Chimborazo. No se conocen datos específicos sobre esta especie dentro de la red de reservas ecológicas del país, pero podría existir presencia de esta especie en las zonas bajas de la Reserva Ecológica Los Ilinizas (Oleas i Pitman, 2015).

La subpoblación ubicada en Chimborazo se halla en la carretera Gral. Elizalde, Bucay-Pallatanga; a 32 km de Pallatanga, y a 650 m sobre el nivel del mar (Garden, 2017).

Estas subpoblaciones se pueden encontrar en las carreteras en las zonas secas y rocosas. Presentan flores de color rosa profundo con bandas verdes en las puntas de los tépalos, los colores se muestran separados por una estrecha banda de amarillo. Los filamentos de antera son blancos. La parte inferior de las hojas de esta especie es plateada, aunque algunas plantas parecen tener menor coloración plateada que otras cultivadas de la misma vaina (Society, 2016).



Figura 5-1: *Phaedranassa cinerea* Ravenna. Planta seca.

Fuente: (Society, 2016).

La única amenaza conocida para esta especie es la destrucción del hábitat. Sin embargo se halla en la categoría Vulnerable B1ab(iii) dentro de la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN (IUCN, 2016).

Un taxón es "Vulnerable" cuando la mejor evidencia disponible indica que cumple con cualquiera de los criterios A (reducción) a E (análisis cuantitativo) para Vulnerables, por lo que se considera que se enfrenta a un alto riesgo de extinción en estado salvaje (IUCN, 2017).

"B" es el intervalo geográfico en forma de B1 (extensión de ocurrencia) O B2 (área de ocupación) O ambos:

"1" quiere decir que la extensión de la ocurrencia estimada es menos de 100 km², y las estimaciones que indican por lo menos dos de a:

"a" es "Severamente fragmentado" o conocido por existir en un solo lugar.

"b" quiere decir "Descenso continuo", observado, inferido o proyectado, en cualquiera de los siguientes:

(i) el grado de ocurrencia

(ii) área de ocupación

(iii) área, extensión y / o calidad del hábitat (IUCN, 2017).

1.1.8 Alzheimer

Es una condición neurodegenerativa crónica, progresiva y severa, asociada con deterioro de la cognición y de la memoria que finalmente conduce a la muerte del paciente (Dey et al., 2016).

Se caracteriza fisiopatológicamente por una pérdida de neuronas colinérgicas en el cerebro y se asocia con niveles disminuidos de acetilcolina (ACh), esto relacionado con la hiperfosforilación de la proteína asociada a los microtúbulos tau, la deposición de péptidos β ($A\beta$) amiloides en el parénquima cerebral, y pérdida de neuronas colinérgicas (Lane, Potkin i Enz, 2006).

1.1.8.1 Beta-amiloide

Beta-amiloide ($A\beta$) es un péptido de 39 a 43 aminoácidos sintetizado por la proteólisis intramembrana del fragmento terminal β -carboxilo (β CTF) por γ -secretasa, de la proteína precursora β -amiloide

(APP) (Morishima-Kawashima, 2014). La deposición de péptidos A β genera reacciones inflamatorias, activando a los astrocitos y microglia, y generando especies reactivas de oxígeno (ROS) y citoquinas (Extance, 2010).

Las acumulaciones de células inmunes activadas dentro del cerebro, sugieren que la neuroinflamación así causada es un factor denominado patogénesis de la EA (Del Pino et al., 2016).

La β -amiloidosis en la enfermedad de Alzheimer está regida por citoquinas proinflamatorias, y quimiocinas, como el interferón- α , la interleucina-1 β , el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina -8, la interleucina-6 (IL-6) y la proteína quimiotáctica monocítica-1 (Extance, 2010).

1.1.8.2 Tratamiento de Enfermedad de Alzheimer

En la actualidad, el tratamiento para la enfermedad de Alzheimer reduce los síntomas de demencia, pero no revierte ni detiene el trastorno neurodegenerativo que los causa (Atanasova et al., 2015).

Sólo existen dos clases de fármacos con aprobación para tratar la EA: los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEI) y los inhibidores de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Atanasova et al., 2015).

Los AChEI disponibles en el mercado son: el donepezil, rivastigmina y galantamina; los inhibidores de NMDA están representados por el fármaco memantina (Atanasova et al., 2015). Aunque se han desarrollado estrategias terapéuticas probadas en modelos animales que han tenido éxito, la mayoría no funciona en humanos (Franco i Cedazo-Minguez, 2014).

1.1.8.3 Inhibición de Acetilcolinesterasa

Se debe aclarar que la muerte celular de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, causante de la neurodegeneración de la EA, es independiente de la inhibición de la AChE y la alteración del nivel de acetilcolina en el sistema nervioso central (Del Pino et al., 2016).

Sin embargo, la disminución de niveles de ACh es la causante de los síntomas de demencia en esos pacientes, por lo tanto con la inhibición de AChE se logra controlar dichos síntomas, que es el enfoque actual del tratamiento de EA (Del Pino et al., 2016).

1.1.8.4 Inhibidores de Acetilcolinesterasa

Donepezil

El donepezilo es un potente inhibidor de la AChE y ha demostrado ser muy eficaz para el tratamiento paliativo de enfermedad de Alzheimer, mantiene los niveles normales de colina en el cerebro AD (Mishra et al., 2017).

Se desarrolló como una mezcla racémica de los dos enantiómeros fácilmente combinados en solución acuosa, a través de un intermedio de cetoenol. El donepezilo no sufre de hepatotoxicidad limitante de la dosis, tiene una biodisponibilidad relativa del 100% después de la administración oral, y su vida media es considerablemente larga (70-80 h) en comparación con otros inhibidores de la AChE (0,3 a 12 h). Estudios farmacocinéticos han demostrado que S-donepezilo tiene niveles plasmáticos más altos que el R-donepezilo (Greunen et al., 2016).

Rivastigmina

La rivastigmina es un inhibidor bien conocido de la acetilcolinesterasa de doble acción y de la butirilcolinesterasa, es eficaz en el tratamiento de los síntomas conductuales y psiquiátricos, de la demencia, incluyendo alucinaciones, así como síntomas cognitivos. Presenta una estructura de fenilcarbamato (Değirmenci i Keçeci, 2016).

Los efectos adversos más frecuentes de la rivastigmina, en relación con la estimulación colinérgica en el sistema nervioso central y en los tejidos periféricos son los síntomas gastrointestinales, cardiorrespiratorios, extrapiramidales, genitourinarios, musculoesqueléticos, trastornos del sueño e irritaciones cutáneas (con la forma transdérmica en particular). Se le han atribuido además, alucinaciones visuales en mujeres de alrededor de 80 años con enfermedad de Alzheimer (Değirmenci i Keçeci, 2016).

Galantamina

El hidrobromuro de galantamina es un alcaloide terciario, que tiene un mecanismo de acción dual propuesto: la inhibición competitiva y alostérica (por modulación de los receptores nicotínicos) de acetilcolinesterasa (AChE) (Suh et al., 2004).

Muchos investigadores se han interesados en evaluar los beneficios potenciales que proporcionaría el mecanismo dual de acción de la galantamina. Ensayos clínicos han demostrado que la galantamina es eficaz durante al menos 4 años de tratamiento, y es bien tolerado en la mayoría de los pacientes hasta los 5 años de tratamiento (Suh et al., 2004).

La galantamina fue inicialmente aislada de bulbos y flores de *Galanthus caucasicus*, *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae) y géneros relacionados. Paskov la desarrolló por primera vez como fármaco industrial bajo el nombre comercial Nivalin, para Sopharma, en Bulgaria (Atanasova et al., 2015).

Ha sido empleada en el tratamiento de la miastenia gravis, trastornos residuales de parálisis de la poliomielitis, miopatía, trastornos sensoriales y motores del SNC. Gracias a su lipofilia, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica con facilidad y afecta la función colinérgica central (Atanasova et al., 2015).

Desde los años 80 se investiga a la galantamina para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y en el 2000 se aprobó su uso en Estados Unidos, Europa y Asia. Además de su capacidad para inhibir la AChE, la galantamina es un modulador alostérico de receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR); la estimulación de nAChRs puede aumentar los niveles intracelulares de Ca^{2+} y facilitar la liberación de noradrenalina, este efecto también mejora la función cognitiva del cerebro (Atanasova et al., 2015).

Recientemente, Takata y colaboradores demostraron que la galantamina aumentó significativamente la fagocitosis microglial amiloide-b (Ab) en microglía de ratas y facilitó el aclaramiento de la beta amiloide en los cerebros de modelos experimentales, roedores, con enfermedad de Alzheimer. Esta acción multi-objetivo de la galantamina hace que sea un fármaco de gran valor para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y se trabaja en la síntesis de nuevos derivados de la galantamina (Atanasova et al., 2015).

1.1.9 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

La cromatografía de gases (CG o GLC) es una técnica analítica comúnmente utilizada en muchos laboratorios de investigación e industriales para la identificación y cuantificación de compuestos en una mezcla, así para el control de calidad (Bauerlein, 2013).

La CG permite la detección de cantidades muy pequeñas de sustancias químicas. Mediante este método se pueden analizar una amplia variedad de muestras, siempre y cuando los compuestos sean razonablemente volátiles y térmicamente estables (Cortes et al., 2014).

La espectrometría de masas es una técnica analítica empleada para cuantificar sustancias químicas identificadas, y en mayor medida, identificar compuestos desconocidos dentro de una muestra y dilucidar la estructura y propiedades químicas de diferentes moléculas (Biosoft, 2015).

El proceso completo de este método analítico implica la conversión de las moléculas de muestra en iones gaseosos, con o sin fragmentación, que después son caracterizados por sus relaciones masa/carga (m/z) y por sus abundancias relativas (Lisec et al., 2006).

Básicamente, esta técnica estudia el efecto de la energía ionizante sobre las moléculas. Depende de las reacciones químicas en la fase gaseosa en la que se consumen las moléculas de la muestra durante la formación de especies iónicas y neutras (Cortes et al., 2014).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) facilita la identificación y cuantificación robusta de, incluso, cientos de metabolitos en un único extracto vegetal, brindando una cobertura bastante completa de las vías centrales del metabolismo (Bauerlein, 2013).

Las principales ventajas de esta metodología son que ha sido empleada durante largo tiempo para el perfilado de metabolitos y, además para establecer protocolos para la configuración y mantenimiento de equipos, y la evaluación e interpretación del cromatograma obtenido (Lisec et al., 2006).

GC-MS tiene una amplia cobertura en análisis de varias clases de compuestos, incluidos los ácidos, alcoholes de azúcar, azúcares, productos intermedios fosforilados y compuestos lipofílicos (Lisec et al., 2006).

1.1.10 Determinación de actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

1.1.10.1 Método modificado de Ellman y colaboradores

Este método se efectúa mediante un ensayo colorimétrico, en el cual se mide el incremento en el color amarillo producido por tiocolina cuando esta reacciona con el ion ditiobisnitrobenzoto; la tiocolina es un producto de la acción de acetilcolinesterasa o butirilcolinesterasa sobre la acetilcolina (Ellman et al., 1961).

Para poder evaluar los cambios de coloración obtenidos por el método descrito, se deben realizar mediciones en un espectrofotómetro Elisa, con lo cual además de la cualificación, presencia o ausencia de actividad inhibitoria, se puede realizar una cuantificación de la actividad observada en base a la intensidad del cambio de color producido (Lopez et al., 2002).

La actividad enzimática se calcula como un porcentaje comparado con un ensayo usando un tampón sin ningún inhibidor. Los datos de inhibición de AChE deben ser analizados con un software adecuado, como el paquete Prism (Graph Pad Inc., San Diego, EE.UU.).

Los valores de inhibición como IC_{50} deben ser medias de tres determinaciones individuales realizadas cada una por triplicado (Lopez et al., 2002).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Tipo y diseño de Estudio

La investigación realizada es de tipo exploratoria con un diseño experimental basado en el análisis de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto vegetal, obtenido mediante un protocolo de extracción de alcaloides, de bulbos de la especie *Phaedranassa cinerea*.

2.1.1 Unidad de análisis

La unidad de análisis con la que se trabajó son los extractos de alcaloides de bulbos de *Phaedranassa cinerea*.

2.1.2 Población de Estudio

Bulbos de *Phaedranassa cinerea*.

2.1.3 Tamaño de Muestra

La recolección del material vegetal se realizó mediante un muestreo aleatorio simple, obteniendo aproximadamente 200 g de la especie vegetal *Phaedranassa cinerea*.

2.2 Lugar de recolección del material vegetal

La especie *Phaedranassa cinerea*, se recolectó en Ecuador, provincia Chimborazo, cantón Pallatanga, parroquia Pallatanga.

Altitud: 1301 msnm

2.2.1 Selección de muestra

La selección de la muestra se lo realizó en base a los siguientes criterios:

- Criterios de inclusión:

Los mejores individuos de la especie vegetal, que presenten vigorosidad y buen estado. Presentaron hojas, tallos, flores y/o frutos tiernos y frescos con superficies integrales. Plantas jóvenes con un tamaño adecuado y accesibles desde la carretera.

- Criterios de exclusión:

Aquellas plantas que presentaron daños por acción de animales o condiciones externas. Ejemplares que presentaron deterioro por agua o viento. Plantas que se encontraban en proceso de descomposición.

2.3 Lugar de investigación

La presente investigación experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de productos naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), ubicado en la provincia Chimborazo, cantón Riobamba, con el Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia (GIPRONAF), dentro de la línea de investigación de Ensayos de inhibición de colinesterasas de Amaryllidaceae.

Se trabajó, además, en el Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología de la Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH).

2.4 Materiales, equipos y reactivos

2.4.1 Material vegetal

Aproximadamente 30 gramos de bulbos acondicionados, secos y reducidos a un tamaño de muestra adecuado, de *Phaedranassa cinerea*.

2.4.2 Materiales

Tabla 1-2: Lista de materiales empleados en los diferentes procesos.

MATERIAL	CANTIDAD
PREPARACIÓN DE REACTIVOS	
Balones de aforo 100 MI	2
Pipeta graduada 5 MI	1
Pipetas graduadas 1 MI	2
Pipetas volumétrica 10 mL	1
Probeta 100 MI	1
Balones de aforo de 1 L	2
Espátula	1
Microespátula	1
Frascos plásticos tipo viales 5 MI	3
Frascos ámbar de vidrio 500 MI	6
Frasco ámbar de vidrio 1000 MI	1
EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES	
Frasco ámbar de vidrio 1000 MI	1
Probeta 50 MI	1
Papel filtro	1
Embudo	1
Trípode	1
Vaso de precipitación 100 MI	1
Balón para rotavapor	1

Probeta 10 MI	1
Embudo de separación 500 MI	1
Vaso de precipitación 500 MI	1
Vaso de precipitación 250 MI	1
Frasco de vidrio tipo vial 10 MI	1
Desecador	1
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA AChE Y BuChE	
Tubos Eppendorf para microcentrífuga 1,5 MI	150
Tubos Eppendorf para microcentrífuga 0,5 MI	150
Tubos plásticos graduados con tapón de rosca 35 MI	2
Puntas amarillas para micropipeta	300
Puntas azules para micropipeta	300
Puntas blancas para micropipeta	200
Microplacas de 96 pocillos	3
Dispensador de líquido para pipeta multicanal	1
Bloques de hielo reutilizables	6
Caja térmica de Poliestireno expandido 4 L	1
Caja térmica de Poliestireno expandido 19 L	1
Gradillas para tubos	2
Cajas porta-tubos	3
Toallas de papel tipo tissue (caja)	1
Toallas de papel toalla (rollo)	1
Papel aluminio (rollo)	1
Piseta	1

2.4.3 Equipos

Tabla 2-2: Lista de equipos empleados en los diferentes procesos.

EQUIPO	PROCEDIMIENTO
Estufa de secado RedLine by Binder	Secado de droga vegetal Reducción de volumen de extracto de alcaloides
Molino Arthur H. Thomas C.O	Reducción de tamaño de droga seca
Balanza analítica HDM	Pesajes en varios procedimientos
Agitador magnético	Preparación de reactivos
Refrigerador	Conservación de reactivos y muestras
Congelador (-20°C)	Conservación de reactivos y muestras madre
Congelador (-14°C)	Conservación de reactivos
Sonicador	Obtención de extracto crudo
Rotavapor	Concentración de extractos
pH-metro	Extracción de alcaloides
Espectrofotómetro ELISA	Determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas
Cabina de flujo laminar	Preparación de ensayos de determinación actividad inhibitoria de colinesterasas
Agitador de tubos	Determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas
Agitador para microplacas	Determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas
Cronómetro	Determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas
Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas	Identificación de alcaloides

Realizado por: Cristina Salazar. 2017

2.4.4 Reactivos

Tabla 3-2: Lista de reactivos empleados en los diferentes ensayos.

REACTIVO	ENSAYO	
Metanol CH ₄ O	Obtención de extracto crudo	
Ácido sulfúrico H ₂ SO ₄ (2% V/V)	Extracción de alcaloides	
Éter etílico (C ₂ H ₅) ₂ O		
Hidróxido de amonio NH ₄ OH (25% V/V)		
Acetato de etilo C ₄ H ₈ O ₂		
Sulfato de sodio anhidro Na ₂ SO ₄		
Goma arábica		
Fosfato dipotásico K ₂ HPO ₄		Determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas
Bifosfato de Sodio NaH ₂ PO ₄		
Cloruro de Sodio NaCl		
Fosfato de disódio Na ₂ HPO ₄		
Ácido clorhídrico HCl (0.5 N)		
Acetilcolinesterasa AChE		
Butirilcolinesterasa BuChE		
Ácido 5,5 - ditio - bis- (2 - nitrobenzoico) DTNB		
Acetilcolina ATC		
Butirilcolina yodada BTC		
Galantamina		
Agua destilada	Preparación de reactivos y lavado de materiales	
Agua grado farmacéutico		

2.5 Recolección y acondicionamiento de la droga vegetal

2.5.1 Recolección

Se realizó en la ubicación descrita en 2.6, tomando en consideración los criterios de selección descritos en 2.5.

Se recolectaron 3 individuos completos de la especie *Phaedranassa cinerea*, con un peso total aproximado de 300 gramos. El material vegetal se almacenó en bolsas plásticas y se transportó al Laboratorio de productos naturales de la facultad de Ciencias de la ESPOCH.

2.5.2 Limpieza

Los bulbos fueron separados del resto de las plantas y se lavaron con agua clorada y destilada, retirando los residuos de polvo, material orgánico y microbios adheridos a la superficie.

Se fraccionó los bulbos separándolos capa por capa y realizando cortes de aproximadamente 2 cm².

2.5.3 Secado

Se colocaron los cortes de bulbo de *Phaedranassa cinerea* sobre papel aluminio, y se sometieron a secado en estufa de aire caliente Memmert, a 60°C durante 48 h.

La estufa contaba con un ventilador para un secado adecuado de la droga vegetal, evitando la acumulación de humedad dentro del equipo.

2.5.4 Reducción de tamaño de droga vegetal seca (Molienda)

El material vegetal seco fue triturado en un molino de cuchillas H. Thomas, alcanzando un tamaño de partícula de 2 a 3 mm. El material molido fue posteriormente recogido en una bolsa de papel que se colocó inmediatamente dentro de una bolsa plástica hermética. La bolsa de papel conserva de mejor manera la droga vegetal seca, al estar en contacto directo con ella, y la bolsa plástica hermética impide que se filtre humedad, de esta manera se almacena adecuadamente.

2.6 Técnicas y Métodos

2.6.1 Extracción de alcaloides

Para la obtención del extracto de alcaloides de *P. cinerea*, se empleó el protocolo descrito por Acosta (Acosta et al. 2014).

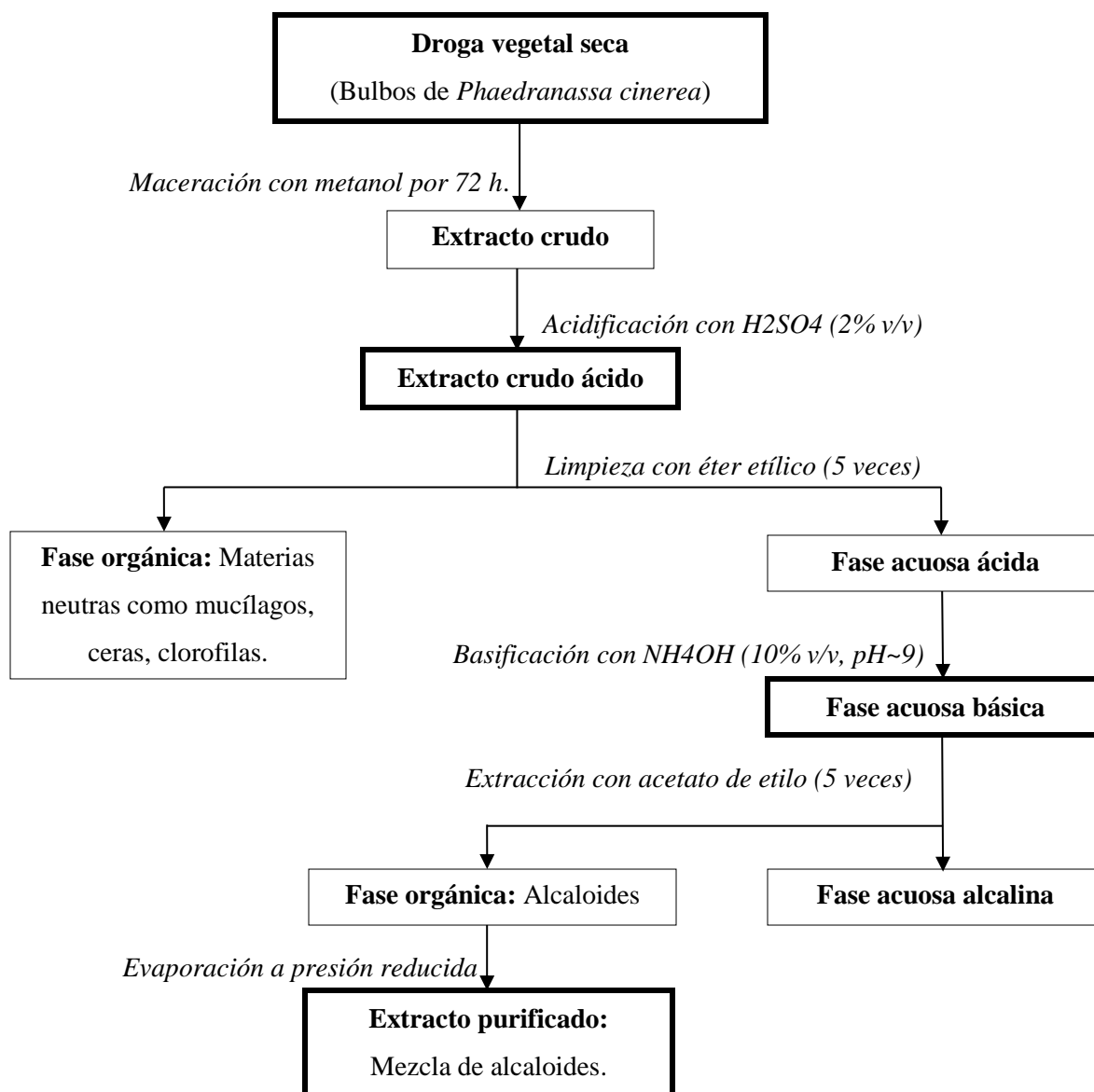


Figura 1-2: Esquema para la obtención del extracto de alcaloides de *Phaedranassa cinerea* (Acosta et al. 2014).

Realizado por: Cristina Salazar. 2017

2.6.1.1 Obtención de extracto bruto

Se pesaron 16 gramos de la droga vegetal seca y se maceraron en 400 mL de metanol durante 72 horas; el macerado se sometió a sonicación en dos ocasiones por lapsos de una hora cada vez.

El macerado fue filtrado, y el residuo vegetal se maceró por segunda vez en 400 mL de metanol durante 24 horas, se sometió a sonicación durante una hora y el extracto bruto líquido obtenido se mezcló con el anterior.

A continuación, el extracto metanólico fue concentrado a presión reducida a 50°C, temperatura de ebullición del solvente, obteniendo el extracto bruto seco (Acosta et al. 2014).

2.6.1.2 Obtención de extracto de alcaloides

Al extracto bruto seco se añadieron 150 mL de H₂SO₄ (2% V/V), se sometió a sonicación durante 30 min y se filtró, obteniendo un extracto crudo ácido.

Seguidamente, se limpió el extracto crudo ácido con éter etílico 5 veces, en un embudo de separación con agitación vigorosa, tomando alícuotas de 50 mL de éter para cada 50 mL de extracto.

Este proceso se realiza para retirar sustancias que no son de interés para esta investigación, como ceras, clorofilas, mucílagos, entre otras. Se tomó la fase acuosa ácida, la misma que fue basificada con NH₄OH (25% V/V) hasta pH 10, obteniendo la fase acuosa básica.

Se realizó una posterior extracción con acetato de etilo a la fase acuosa básica por cuatro ocasiones y se recogió la fase orgánica; se adicionó a esta fase aproximadamente 10 g de sulfato de sodio anhidro y 10 g de goma arábica.

Finalmente se filtró y concentró a presión reducida a 60°C. El extracto se recogió en un frasco de vidrio tipo vial y se concentró en una estufa de aire caliente hasta obtener el extracto de alcaloides sólido (Acosta et al. 2014).

2.6.2 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto de alcaloides de *Phaedranassa cinerea*

A partir del extracto de alcaloides de *Phaedranassa cinerea* se realizó una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

Este ensayo fue realizado en un Cromatógrafo de Gases de Adilent, modelo 6890; acoplado a un Espectrómetro de Masas de impacto electrónico, modelo 5975, operando a 230°C en la fuente iónica y 70eV.

La fase estacionaria fue fenilmetilsilicona al 5% en una columna SAPIENS-X5-MS, 30m x 0,25mm x 0,25µm.

La inyección fue 2.0 mg/mL (metanol) a 280 °C, en modo "Splitness", el flujo de Helio 0,8 mL/min y el alcaloide referencial fue 0,5 µg de codeína.

El programa de temperatura empleado fue:

Un aumento inicial de temperatura de 55 a 100°C (60°C por min), seguido por 2 minutos a 100°C, continuando con un aumento de temperatura de 100 a 180°C (15°C por min), un minuto a 180°C y, finalmente, un aumento desde 180 a 300°C (5°C por min).

El análisis de datos se efectuó en un software AMDIS 2.71 (NIST), en el cual se efectuó el cálculo de índices de retención (RI) y se verificó la pureza de señales (Acosta et al. 2014).

2.6.3 Determinación de actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

2.6.3.1 Preparación de reactivos

En todos los casos se debe colocar la fecha y codificación luego de prepararlas. En el caso de PBS, solución salina y enzimas, tienen un largo periodo de duración (aproximadamente 6 meses), pero es importante controlar la presencia de contaminaciones.

Reactivos:

- PBS (Buffer pH 7,5)
- Solución salina (pH 7,5)
- Soluciones de AChE y BuChE (almacenar en congelador entre -20 y -40°C)
- Solución DTNB (duración 3 meses)
- Soluciones de ATC y BTC (duración 3 meses)
- Soluciones seriadas de galantamina (1 semana de duración)

Solución NaOH 0,5 N

PM: 40.00 g/mol; Pureza: 98%

1 N-----40 g/L

0,5 N-----X= 20 g/L

98 g (puros)-----100 g (impuros)

20 g (puros)-----X= 20,41 g (impuros)

Pesar 20.41 g de NaOH, disolverlos y llevar a 1000mL.

1000 mL ----- 20.41

100 mL ----- X= 2.04 g NaOH

Pesar 2.04 g de hidróxido de sodio, disolverlos y enrasar en matraz de 100 mL.

Solución H₂SO₄ 0,5 N

PM: 34,46 g/mol; Pureza: 37%; d=1,19 g/cm³

1 N-----34,46 g/L

0,5 N-----X= 17.23 g/L

37 g (puros)-----100 g (impuros)
17.23 g (puros)-----X= 46.57 g (impuros)

$$d = m/V$$

$$V = m/d$$

$$V = 46.57 \text{ g} / 1.19 \text{ g/mL}$$

$$V = 39.13 \text{ mL}$$

Medir 39,13 mL de H₂SO₄, agregar sobre agua y llevar a 1000 mL

Solución HCl 0.5 N

A partir de HCl 12.17 N.

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$12.17 \text{ N} * V_i = 0.5 \text{ N} * 100 \text{ ml}$$

$$V_i = 0.5 \text{ N} * 100 \text{ mL} / 12.17 \text{ N}$$

$$V_i = 4.1 \text{ mL HCl}$$

Medir 4.1 mL de HCl, disolverlos y enrasar en matraz de 100 mL.

Solución salina (Na₂HPO₄)

Según protocolo:

$$25 \text{ mL (agua)}-----142 \text{ mg Na}_2\text{HPO}_4$$

$$1000 \text{ mL}-----X = 5,680 \text{ g}$$

Preparar la solución y ajustar el pH con HCl (0.5 N) hasta 7.5. Almacenar en un frasco de vidrio ámbar de 1 L y rotular con la fecha y "Solución salina".

Buffer fosfato salino (PBS):

Para preparar 1 L de solución stock

K_2HPO_4 8 mM-----1.39 g
 NaH_2PO_4 2.3 mM-----0.272 g
 NaCl 0.15 M-----8.77 g
 H_2O -----1L

Preparar la solución y ajustar el pH con NaOH (0.5 N) hasta 7.5. Conservar en congelación (-20 °C). Almacenar en alícuotas de 250 mL en frascos de vidrio ámbar, rotular con la fecha y "PBS" en cada frasco.

DTNB:

Según protocolo:

2 mg-----25 mL solución salina

Pesar 20 mg-----10000 uL (En matraz)

$$2 \text{ mg} \text{-----} X = 1000 \text{ uL}$$

Debe existir una relación de 2 mg de DTNB en 25 mL de solución salina.

Se pesan 20 mg de DTNB y se enrazan a 10 mL con solución salina.

$$20 \text{ mg} / 10 \text{ mL} = 2 \text{ mg/ mL}$$

Se fraccionan en 10 tubos Eppendorf, quedando 1 mL en cada uno. (C/u con 2 mg/mL)

$$1 \text{ mL} * 2 \text{ mg/mL} = 2 \text{ mg}$$

$$\mathbf{2 \text{ mg} / 25 \text{ mL}}$$

Para 50 tubos Eppendorf de DTNB

1000 μL ----- 2 mg (1 tubo Eppendorf)

50000 μL ----- = 100 mg DTNB (50 tubos Eppendorf)

Luego de preparar la solución stock, dividir la misma en 50 tubos Eppendorf (cada uno con 2mg/mL), rotular con fecha, y en cada tubo la concentración y "DTNB". Almacenar en congelación (-20°C). La solución es estable por 3 meses.

ATC:

Según protocolo:

1.7 mg -----25 mL solución salina

Pesar 17 mg-----2000 uL (En tubo Eppendorf)

1.7 mg -----X=200 uL

Debe existir una relación de 1.7 mg de ATC en 25 mL de solución salina

Se pesan 17 mg de ATC y se añaden 2 mL en un tubo Eppendorf.

$$17 \text{ mg} / 2 \text{ mL} = 8.5 \text{ mg} / \text{mL}$$

Se fraccionan en 10 tubos Eppendorf, quedando 200 µL en cada uno. A partir de la solución stock, (c/u con 1.7 mg/200 µL), rotular con fecha y almacenar en congelador (-30°C). La solución es estable por 3 meses.

$$0.2 \text{ mL} * 8.5 \text{ mg/mL} = 1.7 \text{ mg}$$

1.7 mg / 25 mL

Para preparar 20 tubos Eppendorf

1.7 mg ----- 200 µL (1 tubo Eppendorf)

34 mg ----- 4000 µL (20 tubos Eppendorf)

A partir de la solución stock, dividirla en 20 tubos Eppendorf (cada uno con 1.7 mg/200 uL), rotular con fecha, y en cada tubo la concentración y "ATC". Almacenar en congelación (-20°C). La solución es estable por 3 meses.

BTC:

Según protocolo:

0.24 mM

PM: 317.23 g/mol

1 mM-----317.23 mg/L

0.24 mM-----X= 76.14 mg/L

1000 mL ----- 76.14 mg

1 mL-----X= 0.07614 mg

Pesar: 19 mg-----2000 uL (Solución salina)

1.9 mg-----X= 200 uL

Para preparar 20 tubos Eppendorf

1.9 mg ----- 200 µL (1 tubo Eppendorf)

38 mg ----- 4000 µL (20 tubos Eppendorf)

A partir de la solución stock, dividirla en 20 tubos Eppendorf (cada uno con 1.9 mg/200 uL), rotular con fecha, y en cada tubo la concentración y "BTC". Almacenar en congelación (-20°C). La solución es estable por 3 meses.

2.6.3.2 Preparación de sustrato

Al momento del ensayo:

En un matraz aforado de 25 mL agregar DTNB más ATC o BTC, según corresponda y enrazar con solución salina. Cubrir con papel aluminio y reservar en caja térmica (4 °C).

2.6.3.3 Preparación de enzimas

AChE:

Según protocolo: 0.25 U/mL.

Disolver toda la enzima (1 mg sólido = 518 U) en 1500 uL de PBS. Distribuir la solución en 83 tubos Eppendorf (18 uL en cada uno; 6.24 U). Rotular con fecha, y en cada tubo la concentración y "AChE". Conservar en congelación (-20 °C).

Al momento del ensayo, llevar el contenido de 1 tubo Eppendorf a 32 mL con PBS (tubo plástico graduado con tapón de rosca). Por lo tanto, 6.24 U/25 mL = 0.25U/mL.

Para enzima que presenta 14.6 mg sólido y 137 U/mg

137 U----- 1 mg

518 U----- = 3.78 mg AChE

Corroborar la actividad enzimática (valor de A: 0.5-0.7) en cada ensayo.

BuChE:

Según protocolo: 0.25 U/mL.

Enzima comercial: 60 mg sólido; 10 U/mg de proteína; 70 % proteína.

Si 100 %----- 60 mg (impuro)

70 %-----X= 42 mg de proteína

Si 1 mg-----10 U

42 mg-----X=420 U

El frasco realmente presenta 42 mg de enzima pura, lo que corresponde a 420 U

Disuelvo 8.9 mg en 10 ml de PBS enrazando a un matraz.

60 mg de sólido --- 420 U

8.93 mg de sólido --- X= 62.5 U (en 10 ml)

6.25 U en 1 ml → 6.25 U/ml

Estos 10 mL de solución stock los divido en 20 tubos Eppendorf con 0.5 mL cada uno, con una concentración de 6.25 U/mL.

$$0.5 \text{ mL} * 6.25 \text{ U/ml} = 3.125 \text{ U}$$

$$3.125 \text{ U} / 25 \text{ mL} = \mathbf{0.125 \text{ U/mL}}$$

Pesar 8.9 g de enzima, disolverla en PBS y llevar a volumen (en matraz de 10 mL). Distribuir la solución en 20 tubos Eppendorf (500 uL c/u; 6.25 U). Rotular con fecha, y en cada tubo concentración y "BuChE". Conservar en congelación (-20 °C).

Al momento del ensayo, disolver el contenido de 1 tubo Eppendorf en 32 mL de PBS (tubo plástico graduado con tapón de rosca). Por lo tanto, $6.25 \text{ U} / 25 \text{ mL} = 0.25 \text{ U/mL}$.

Corroborar la actividad enzimática (valor de A: 0.5-0.7) en cada ensayo.

2.6.3.4 Disoluciones de galantamina

Para galantamina de 10 mg (comprimido Buxton): disolver el comprimido en tubo falcon, sonicar y centrifugar 10 min, filtrar para eliminar los excipientes. Trasvasar a matraz de 10 mL y enrazar con PBS.

10 mg de principio activo gal/10 ml PBS = 1 mg/ml

PM gal= 287.35 g/mol

Si 287.35 mg/ml-----1 M

1 mg/ml-----X= 3.48×10^{-3} M (solución madre)

Concentraciones de galantamina (AChE y BuChE): 1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 0.5×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 0.5×10^{-6} M y 1×10^{-7} M

Tabla 4-2: Preparación de disoluciones de galantamina.

Solución N.	Concentración	Vol. Solución X (µL)	Vol. PBS (µL)	Vol. Final (µL)
1	1×10^{-3} M	575 (Sol. Madre)	713 + 712	2000
2	1×10^{-4} M	200 (1×10^{-3} M)	900 * 2	2000
3	1×10^{-5} M	200 (1×10^{-4} M)	900 * 2	2000
4	0.5×10^{-5} M	100 (1×10^{-4} M)	950*2	2000
5	1×10^{-6} M	200 (1×10^{-5} M)	900*2	2000
7	0.5×10^{-6} M	200 (0.5×10^{-5} M)	900*2	2000
8	1×10^{-7} M	200 (1×10^{-6} M)	900*2	2000

Aclaración: Para AChE (soluciones 2-8) y BuChE (soluciones 1-7).

Almacenar en caja térmica (-4°C). La solución es estable por 1 semana.

Realizado por: Cristina Salazar. 2017

Antes de comenzar con los ensayos, se deberá tener preparado: (en todos los casos colocar fecha y numeración luego de prepararlas)

- a. PBS (buffer pH 7,5).
 - b. Solución salina (pH 7,5).
 - c. Soluciones de AChE (almacenadas en congelación): controlar su actividad con el valor de absorbancia a la hora de la lectura (entre 0,3 y 0,7).
 - d. Soluciones de ATC: Se conservan 3 meses aproximadamente.
 - e. Solución DTNB.
- } Controlar presencia de precipitado y/o hongos.

f. Soluciones seriadas de Galantamina: Se conservan 1 semana como máximo.

2.6.3.5 Disoluciones de extracto de alcaloides de *Phaedranassa cinerea*

Se trabajó con 5 concentraciones de extracto de alcaloides del bulbo de la especie estudiada (1, 5, 10, 20, 50, 100 ug/mL). Para preparar la solución madre se pesaron 10 mg de extracto de alcaloides y se disolvieron con 100 μ L de metanol más 900 mL de PBS.

Disolución 1 (100 ug/mL)

$$10 \text{ mg/mL} * V_1 = 0.1 \text{ mg/mL} * 1 \text{ mL}$$

$V_1 = 10 \mu\text{L}$ (de solución madre) + 990 μL de PBS.

Disolución 2 (50 ug/mL)

$$0.1 \text{ mg/mL} * V_1 = 0.05 \text{ mg/mL} * 1 \text{ mL}$$

$V_1 = 500 \mu\text{L}$ (de Disolución 1) + 500 μL de PBS.

Disolución 3 (20 ug/mL)

$$0.05 \text{ mg/mL} * V_1 = 0.02 \text{ mg/mL} * 1 \text{ mL}$$

$V_1 = 400 \mu\text{L}$ (de Disolución 2) + 600 μL de PBS.

Disolución 4 (10 ug/mL)

$$0.02 \text{ mg/mL} * V_1 = 0.01 \text{ mg/mL} * 1 \text{ mL}$$

$V_1 = 500 \mu\text{L}$ (de Disolución 3) + 500 μL de PBS.

Disolución 5 (5 ug/mL)

$$0.01 \text{ mg/mL} * V_1 = 0.005 \text{ mg/mL} * 1 \text{ mL}$$

$V_1 = 500 \mu\text{L}$ (de Disolución 4) + 500 μL de PBS.

Disolución 6 (1 ug/mL)

$$0.005 \text{ mg/mL} * V_1 = 0.001 \text{ mg/mL} * 1 \text{ mL}$$

$$V_1 = 200 \mu\text{L (de Disolución 5)} + 800 \mu\text{L de PBS.}$$

2.6.3.6 Diseño de placa

Es la guía para el llenado de la microplaca. La galantamina y las disoluciones del extracto de alcaloides se deben ubicar en el diseño de menor a mayor concentración.

Tabla 5-2: Secuencia de adición de reactivos en microplaca.

ORDEN	REACTIVO	CONTROL	BLANCO CONTROL	MUESTRA	BLANCO MUESTRA
1°	Extracto/Galantamina	-----	-----	50μL	50μL
2°	PBS	50μL	100μL	-----	150μL
3°	Enzima	50μL	-----	50μL	-----
Lapso de 30 minutos desde que se termina de poner la enzima.					
4°	Sustrato	100μL	100μL	100μL	-----
5 minutos desde que se empieza a poner el sustrato hasta el inicio de la lectura.					

La enzima, el sustrato y la microplaca deben estar cubiertos con papel aluminio.

Realizado por: Cristina Salazar. 2017

Inmediatamente después que se ha terminado de pipetear el sustrato se debe someter a la microplaca a agitación, de tal manera que ingrese a lectura en el espectrofotómetro ELISA exactamente a los cinco minutos.

2.6.3.7 Cálculo de resultados

Porcentaje de inhibición

Se calcula mediante la fórmula:

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

En donde:

- M Lectura de absorbancia de muestra
- C Lectura de absorbancia de control
- BM Lectura de absorbancia de blanco muestra
- BC Lectura de absorbancia de blanco control

Concentración inhibitoria media (IC₅₀)

Se debe realizar una gráfica de la curva de inhibición utilizando los promedios de % de inhibición calculados y la concentración (en µg) de los extractos empleados; obteniendo una línea de tendencia, en este caso logarítmica, y la ecuación de la misma, con cuya pendiente e intersección se procede al cálculo de IC₅₀.

Utilizando la ecuación lineal ($y = mx + n$) en este gráfico para $y = 50$ el valor x punto se convierte en valor IC₅₀.

En el caso que la línea de tendencia no se adapte correctamente, se puede efectuar el cálculo por interpolación directa en el gráfico (impreso en papel milimetrado).

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Extracto de alcaloides

A partir de 16,0013 g de bulbos secos de *Phaedranassa cinerea*, se obtuvieron 17,0 mg de extracto de alcaloides, teniendo un rendimiento del 0,11%.

3.2 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

Los datos obtenidos mediante CG-EM, para bulbos de *Phaedranassa cinerea*, son el resultado del análisis de 1.06 g de bulbo seco, del cual se obtuvieron 488.25 mg de extracto crudo y 5.45 mg de extracto de alcaloides. El ensayo se efectuó bajo las condiciones descritas en la metodología y con una inyección de 2.0 mg/mL con metanol.

Tabla 1-3: Alcaloides presentes en bulbo de *Phaedranassa cinerea*, obtenidos mediante CG-EM.

Alcaloide	Tiempo de Retención (Rt)	Índice de Retención (RI)	% de Abundancia Total
Galantamina	23.402	2431.9	10.24
N-formilnorgalantamina	29.378	2834.4	1.27
Pancratina C	26.312	2621.9	0.99
N-demetilgalantamina	24.089	2476.4	<0.1
m/z 275* _a ; [M = 275]* _b	25.638	2576.8	<0.1
m/z 264	27.585	2710.2	<0.1
m/z 262* _a ; [M = 263]* _b	27.853	2728.7	<0.1
m/z 316* _a ; [M = 345]* _b	28.854	2798.1	<0.1

*_a Pico base; *_b Posible pico de iones moleculares; m/z=Relación (masa / carga).

Realizado por: Cristina Salazar. 2017

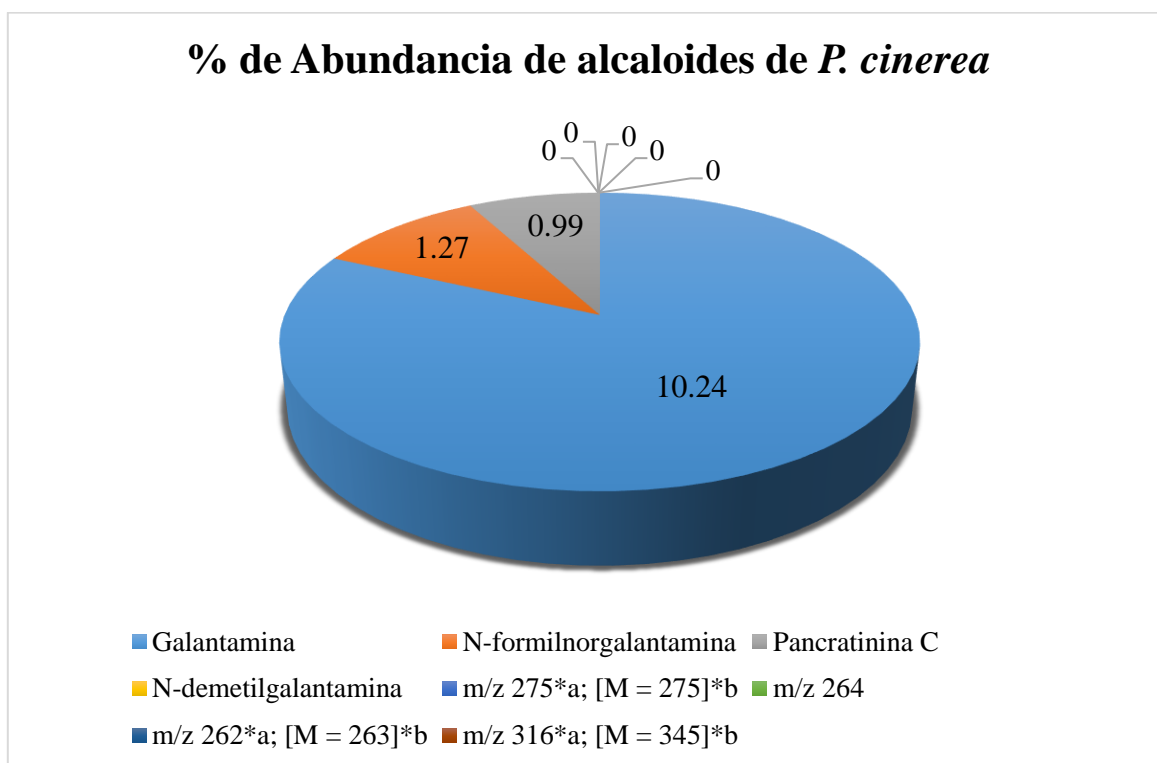


Figura 1-3: Porcentaje de Abundancia de alcaloides de *P. cinerea*, obtenido mediante CG-EM.

Realizado por: Cristina Salazar. 2017

Tanto en la tabla 1-3, como en la figura 1-3, se puede apreciar que mediante CG-EM, se evidenció la presencia de cuatro alcaloides en los bulbos de *P. cinerea*, y cuatro compuestos no identificados que serían presumiblemente alcaloides. De estos, el que se halla en mayor porcentaje es la galantamina, seguida por la N-formilnorgalantamina, Pancratinina C, N-demetilgalantamina y los compuestos no identificados.

La galantamina, encontrada en un 10.24% de abundancia en el extracto de alcaloides de *Phaedranassa cinerea*, se halla presente en varias otras especies de la familia Amaryllidaceae (Backhaus et al., 1992), en porcentajes que van desde 99 a trazas; por lo cual es coherente hallarla en esta cuantificación; es un alcaloide bastante interesante desde el punto de vista farmacológico, por su uso en tratamiento de enfermedad de Alzheimer, como inhibidor de colinesterasas, esta información ampliada se ha expuesto con anterioridad (Sell et al., 1999).

N-formilnorgalantamina, encontrada en un 1.27% de abundancia, es estructuralmente similar a la galantamina y su presencia se ha registrado en especies de la familia Amaryllidaceae como *Crinum x powelli* (Niño et al., 2005); al igual que N-demetilgalantamina, hallada además en *Hippeastrum argentinum* y *Narcissus broussonetii* (Andrade, 2014).

En cuanto a Pancratinina C, hallada en un 0.99% de abundancia, ha sido encontrada también en *Hippeastrum argentinum* al igual que alcaloides relacionados (Ortiz et al., 2015), con lo cual se puede decir que los alcaloides encontrados en esta especie se relacionan con los registrados en otras especies de Amaryllidaceae.

Las moléculas no identificadas deberían ser estudiadas por métodos complementarios para evaluar si se trata de alcaloides, como se presume, y si esas moléculas podrían tener interés químico o terapéutico.

3.3 Acondicionamiento del método modificado de Ellman et al.

3.3.1 Etapa 1. Determinación de condiciones de almacenamiento, área de trabajo, equipos y tiempo

La variación de condiciones experimentales se realizó de acuerdo a la metodología desarrollada por Ellman et al, con algunas modificaciones descritas por López (Lopez et al., 2002), para el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Chimborazo.

3.3.1.1 Almacenamiento de reactivos

De acuerdo a los requerimientos de los reactivos empleados, características del área de trabajo y equipos se determinaron las siguientes condiciones de almacenamiento:

Soluciones

- **Buffer fosfato salino (PBS):** solución conservada en frascos de vidrio ámbar a 4°C.
- **Solución salina:** solución conservada en frascos de vidrio ámbar a 4°C.

Estándar

- **Galantamina:** sólido químicamente puro almacenado a -20°C , a excepción de periodos de pesaje no mayor a 5 minutos.
- **Diluciones de galantamina:** Soluciones conservadas a 4°C .

Enzimas

- **Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa:** conservadas en tubos Eppendorf de 0,5 mL a menos 20°C .

Sustratos

- **Yoduro de acetiltiocolina (ATC) y Yoduro de butiriltiocolina (BTC):** conservados en tubos Eppendorf de 0,5 mL a menos 20°C
- **Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB):** sustancia conservada en oscuridad en tubos Eppendorf de 1,5 mL a 20°C

Muestras

- **Extracto de alcaloides:** solución conservada en congelación a -20°C , a excepción de periodos de pesaje no mayor a 5 minutos.
- **Diluciones del extracto de alcaloides:** soluciones conservadas a 4°C .

3.3.1.2 Condiciones experimentales

Las condiciones del ensayo en cuanto a tiempos, características ambientales y equipos fueron las siguientes:

- **Área de trabajo:** Cabina de flujo laminar vertical BIOBASE.
- **Temperatura:** la temperatura de trabajo fue de 21°C , se realizaron monitoreos constantes.
- **Presión:** la presión atmosférica del área de trabajo fue de 728.17 hPa.

- **Equipo:** se empleó un Espectrofotómetro ELISA BioTeK ELx800 de 96 pocillos, sometido a calibración diaria bajo las especificaciones necesarias para la lectura de la microplaca.
- **Tiempo de incubación:** una vez añadida la enzima en la microplaca el tiempo de incubación fue de 30 minutos a 21°C.
- **Tiempo de agitación:** una vez finalizada la adición del sustrato el tiempo de agitación de la microplaca cubierta de la luz fue de 2 minutos manteniendo la temperatura del área de trabajo.
- **Tiempo para la lectura:** previo la lectura de la microplaca a 405 nm, la reacción enzima sustrato debe darse en un tiempo exacto de 5 minutos incluida la etapa de agitación.

3.3.2 Etapa 2. Estandarización de Galantamina

Al ser empleada galantamina como el compuesto de referencia es ideal estabilizar su valor de IC₅₀ frente acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa bajo las condiciones expuestas, mediante múltiples ensayos, con los que se busca obtener valores similares a la bibliografía usada como guía.

3.3.2.1 Acetilcolinesterasa

Las variantes de ejecución aplicadas corresponden a las ya definidas en el apartado anterior, únicamente se modificó el volumen de dilución de la enzima hasta obtener una actividad enzimática adecuada, dando como resultado un valor IC₅₀ de $14,92 \pm 0,55 \mu\text{M}$. Al obtener resultados dentro de los parámetros establecidos por la metodología (Ortiz et al., 2016) en tres ensayos consecutivos, se puede denotar que existe una baja variación entre los resultados y por lo tanto se alcanzó el objetivo de estabilizar el compuesto de referencia frente butirilcolinesterasa.

3.3.2.2 Butirilcolinesterasa

Las variantes de ejecución aplicadas corresponden a las ya definidas en el apartado anterior, únicamente se modificó el volumen de dilución de la enzima hasta obtener una actividad enzimática adecuada, dando como resultado un valor IC₅₀ de $14,92 \pm 0,55 \mu\text{M}$. Al obtener resultados dentro de los parámetros establecidos por la metodología (Ortiz et al., 2016) en tres ensayos consecutivos, se puede denotar que existe una baja variación entre los resultados y por lo tanto se alcanzó el objetivo de estabilizar el compuesto de referencia frente butirilcolinesterasa.

3.3.3 Etapa 3. Análisis de muestras de alcaloides de *Phaedranassa cinerea*

En esta etapa se buscó definir las concentraciones idóneas de extractos de alcaloides a emplear en los ensayos con el fin de obtener el valor de IC50.

3.3.3.1 Acetilcolinesterasa

Prueba uno

En el protocolo de Ellman et al. descrito por López (Lopez et al., 2002), se establece que para este tipo de extractos, se debe empezar efectuando un monitoreo, empleando cuatro concentraciones (1, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$).

Tabla 2-3: Resultados de la primera prueba de extracto de alcaloides de *P. cinerea* frente a AChE.

Concentración de galantamina (μM)	Promedio % inhibición ^a	Desviación Estándar
1	22.14650767	1.032738982
10	35.434412	1.453042769
50	59.369676	0.442602421
100	67.80238501	0.921350411

^aLos valores son promedio de tres repeticiones.

Realizado por: Cristina Salazar. 2017

Gracias a este primer monitoreo se pudo tener un resultado aproximado del % de inhibición de *P. cinerea*, hallado entre las concentraciones de 10 y 50 μM ; en base a esos datos se tomaron las concentraciones más adecuadas para obtener resultados objetivos y que se ajusten a la curva de calibración empleada para la determinación de IC50 (Lopez et al., 2002).

Prueba dos

Con los resultados del monitoreo, se escogieron seis concentraciones, teniendo en consideración que deben existir al menos dos valores sobre el 50% de inhibición, y dos valores por debajo de ese porcentaje; de manera que al diseñar la curva de calibración podamos agregar una línea de tendencia

que se acople adecuadamente y obtener así una ecuación que nos permita calcular correctamente el IC50.

Las concentraciones escogidas fueron:

1, 5, 10, 20, 50, 100 μM .

Tabla 3-3: Resultados de la segunda prueba de extracto de alcaloides de *P. cinerea* frente a AChE.

Concentración de galantamina (μM)	Promedio % inhibición ^a	Desviación Estándar
1	0	0
5	10.787172	0.504971081
10	22.157434	1.336027899
20	36.05442177	1.314650074
50	56.46258503	0.168323694
100	70.65111759	0.606899708

^aLos valores son promedio de tres repeticiones.

Realizado por: Cristina Salazar. 2017

Los resultados presentados de la prueba dos, muestran que se cumplió con el objetivo de obtener dos concentraciones superiores a 50% de promedio de inhibición, y dos inferiores a ese valor, por lo cual se dice que la prueba efectuada es válida con el método empleado (Lopez et al., 2002).

3.3.3.2 Butirilcolinesterasa

Prueba uno

En el protocolo de Ellman et al descrito por López (Lopez et al., 2002), se establece que para este tipo de extractos, se debe empezar efectuando un monitoreo, empleando cuatro concentraciones, al igual que para Acetilcolinesterasa.

Las concentraciones escogidas fueron:

1, 10, 50 y 100 μM .

Tabla 4-3: Resultados de la primera prueba de extracto de alcaloides de *P. cinerea* frente a BuChE.

Concentración de galantamina (μM)	Promedio % inhibición ^a	Desviación Estándar
1	0	0
10	0.044771	1.330579457
50	40.494209	3.071625868
100	53.804494	1.197615079

^aLos valores son promedio de tres repeticiones.

Realizado por: Cristina Salazar. 2017

Gracias a este primer monitoreo se pudo tener un resultado aproximado del % de inhibición de BuChE de *P. cinerea*, hallado entre las concentraciones de 50 y 100 μM ; al tener un solo dato superior al 50% de porcentaje de inhibición, se decidió efectuar otro monitoreo con el fin de tener una mayor certeza sobre las concentraciones a elegir para la determinación final (Lopez et al., 2002).

Prueba dos

Con el fin de obtener valores que se adapten adecuadamente a la curva de calibración se decidió cambiar las concentraciones del monitoreo a 20, 50, 100 y 150 $\mu\text{g/ mL}$.

Tabla 5-3: Resultados de la segunda prueba de extracto de alcaloides de *P. cinerea* frente a BuChE.

Concentración de galantamina (μM)	Promedio % inhibición ^a	Desviación Estándar
20	15.90038314	1.446328436
50	34.291188	0.663620999
100	54.118774	2.715985992
150	59.96168582	0.723164218

^aLos valores son promedio de tres repeticiones

Realizado por: Cristina Salazar. 2017

Los resultados presentados del segundo monitoreo, presentan datos más equilibrados, al tener dos concentraciones superiores a 50% de promedio de inhibición, y dos inferiores a ese valor; por lo cual,

en base a esos datos se tomaron las concentraciones más adecuadas para obtener resultados objetivos y que se ajusten a la curva de calibración empleada para la determinación de IC50 (Lopez et al., 2002).

Prueba tres

En base a los monitoreos realizados, se escogieron las siguientes concentraciones: 10, 20, 50, 100, 150 y 200.

Tabla 6-3: Resultados de la tercera prueba de extracto de alcaloides de *P. cinerea* frente a BuChE.

Concentración de galantamina (μM)	Promedio % inhibición ^a	Desviación Estándar
10	5.073649755	1.671078384
20	16.53027823	0.649529782
50	31.09656301	12.83266594
100	55.15548282	0.375006194
150	65.54828151	1.022094599
200	69.47626841	0.141739019

^aLos valores son promedio de tres repeticiones.

Realizado por: Cristina Salazar. 2017

Los resultados presentados de la prueba tres, muestran que se cumplió con el objetivo de obtener dos concentraciones superiores a 50% de promedio de inhibición, y dos inferiores a ese valor, por lo cual se dice que la prueba efectuada es válida con el método empleado (Lopez et al., 2002).

3.4 Determinación de IC50 del Extracto de alcaloides de *Phaedranassa cinerea*

3.4.1 Acetilcolinesterasa

La determinación de actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa, medida mediante el IC50 del extracto de alcaloides de la especie vegetal mencionada, se efectuó empleando el método de Ellman et al. descrito por López (Lopez et al., 2002), y puesto a punto bajo las condiciones experimentales del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Chimborazo, en el apartado 3.3 del presente trabajo.

Los resultados obtenidos se obtuvieron de tres ensayos, cada uno efectuado por triplicado, de la manera descrita en la metodología.

Tabla 7-3: Resultados de la determinación de actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *P. cinerea* y galantamina frente a AChE.

	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3
% de Inhibición			
<i>1 μg/mL</i>	0	0	0
<i>5 μg/mL</i>	12.116±1.435	13.226±0.279	12.572±1.199
<i>10 μg/mL</i>	24.141±0.683	25.323±1.143	23.417±2.285
<i>20 μg/mL</i>	39.331±1.962	38.710±0.559	34.549±3.657
<i>50 μg/mL</i>	56.691±0.872	54.637±0.513	54.990±0.831
<i>100 μg/mL</i>	68.807±0.271	70.000±0.342	72.361±1.255
IC50			
<i>μg/mL</i>	37.710	37.565	37.526
R²			
-	0.9988	0.9984	0.9897
PROMEDIO DE IC50 = 37.600±0.097			
GALANTAMINA			
<i>μg/mL</i>	0.918	1.012	0.678
PROMEDIO DE IC50 GALANTAMINA = 0.869±0.172			

Realizado por: Cristina Salazar. 2017

La concentración inhibitoria 50% (IC50) del extracto de alcaloides de *Phaedranassa cinerea* es 37.600, con una desviación estándar de 0.097. Este valor tiene coherencia, al presentar la planta un 10.24% de abundancia del alcaloide galantamina. Otras especie del género *Phaedranassa* que presentan este alcaloide en su composición química son: *Phaedranassa megistrophylla* (Lopez et al., 2002), *Phaeranassa schizantha* y *Phaedranassa dubia* (Osorio et al., 2010), dentro de la familia Amaryllidaceae, varios géneros han reportado este alcaloide, dentro de ellos destaca el género *Narcissus* y el género *Galanthus* (Lopez et al., 2002). En las especies mencionadas, el IC50 va de 0,42 a mayor a 50 μM (Lopez et al., 2002), encontrándose el valor de *P. cinerea* dentro de ese rango. La desviación estándar obtenida entre ensayos, 0.097 es casi óptima, y los R² de los ensayos, llegan a 0.99 en todos los casos, lo cual es un indicativo directo de la precisión del método en los ensayos.

3.4.2 Butirilcolinesterasa

La determinación de actividad inhibitoria de butirilcolinesterasa, medida mediante el IC50 del extracto de alcaloides de la especie vegetal mencionada, se efectuó empleando el método de Ellman et al. descrito por Ortiz (Ortiz et al., 2015), y puesto a punto bajo las condiciones experimentales del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Chimborazo, en el apartado 3.3 del presente trabajo.

Los resultados obtenidos se obtuvieron de tres ensayos, cada uno efectuado por triplicado, de la manera descrita en la metodología.

Tabla 8-3: Resultados de la determinación de actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *P. cinerea* y galantamina frente a BuChE.

	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3
% de Inhibición			
10 $\mu\text{g/mL}$	0	0.796	3.406 \pm 1.061
20 $\mu\text{g/mL}$	16.856 \pm 14.825	12.467 \pm 0.531	14.517 \pm 0.855
50 $\mu\text{g/mL}$	26.987 \pm 0.303	33.864 \pm 1.254	29.359 \pm 0.921
100 $\mu\text{g/mL}$	50.044 \pm 0.151	49.425 \pm 0.405	45.904 \pm 0.782
150 $\mu\text{g/mL}$	60.524 \pm 0.800	58.532 \pm 0.153	55.556 \pm 0.743
200 $\mu\text{g/mL}$	64.192 \pm 0.303	65.517 \pm 0.531	61.963 \pm 0.281
IC50			
$\mu\text{g/mL}$	104.433	102.285	118.797
R²			
-	0.9819	0.9999	0.9919
PROMEDIO DE IC50 = 108.505\pm8.978			
GALANTAMINA			
$\mu\text{g/mL}$	20.1666	17.1277	14.4015
PROMEDIO DE IC50 GALANTAMINA = 17.232\pm2.884			

Realizado por: Cristina Salazar. 2017

La concentración inhibitoria 50% (IC50) del extracto de alcaloides de *Phaedranassa cinerea* es 108.505, con una desviación estándar de 8.978. Esto se relaciona directamente con la presencia de galantamina en su composición química, la cual fue discutida en el apartado anterior. Los valores de IC50 de varias amarilidáceas para butirilcolinesterasa van de 1 a 200 μM , después de lo cual se

considera inactivo al extracto, del mismo modo que para acetilcolinesterasa (Ortiz et al., 2015). La desviación estándar en estos ensayos es bastante mayor que en los de AChE, sin embargo se encuentra aceptable dentro de los lineamientos dados por anteriores investigaciones (Zhan et al., 2016). Los R^2 obtenidos para estos ensayos son de 0.98 como mínimo, lo cual nos indica que el método fue aceptablemente preciso en estos casos también. El IC50 de galantamina, determinado empleando las mismas condiciones, en los mismos ensayos, fue de 17.232 ± 2.884 , la misma que se halla dentro de los parámetros establecidos y es sumamente inferior al IC50 del extracto de *P. cinerea*, demostrando su superior eficacia en la inhibición de BuChE.

CONCLUSIONES

1. El rendimiento de la obtención de extracto de alcaloides a partir de bulbos de *P. cinerea* fue del 0,11%. La extracción se efectuó siguiendo un protocolo descrito en la metodología del presente trabajo, basado en cambios de pH gracias a la naturaleza química de los alcaloides.
2. Los alcaloides identificados en el extracto, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, fueron: Galantamina, N-formilnorgalantamina, Pancratina C y N-demetilgalantamina; en orden de abundancia.
3. El método de Ellman et al., descrito por López en 2002, fue puesto a punto bajo las condiciones experimentales del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Chimborazo y del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; definiendo parámetros de experimentación descritos en la metodología del presente trabajo.
4. La actividad inhibitoria de Acetilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *P. cinerea*, en función de su IC₅₀, es de 37.600 ± 0.097 , valor obtenido de tres ensayos realizados por triplicado. Mientras que la actividad inhibitoria de Butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *P. cinerea*, en función de su IC₅₀, es de 108.505 ± 8.978 , valor obtenido de tres ensayos realizados por triplicado.
5. Los valores de IC₅₀ del extracto de alcaloides mencionado, son bastante más altos que los del alcaloide referencial, galantamina pura, demostrando que el extracto es mucho menos eficaz para la inhibición de AChE y BuChE que la galantamina, cuyos IC₅₀ son: 0.869 ± 0.172 y 17.232 ± 2.884 respectivamente.

RECOMENDACIONES

1. *P. cinerea* es una especie catalogada como vulnerable por la IUCN, además, al momento de la recolección se pudo comprobar lo disminuida que se halla su población, que se halla en un territorio expuesto a la presencia humana; por lo cual se debería pensar en incluir a esta especie en programas de conservación, como estudios de micropropagación o protección de su hábitat.
2. Se recomienda realizar estudios de la planta en distintos estadios vegetativos, debido a que se ha evidenciado que la presencia de alcaloides varía en gran manera entre plantas jóvenes y adultas, así como entre la época húmeda y seca. La presencia de alcaloides varía también en las distintas partes de las plantas, por lo cual podrían efectuarse estudios en hojas y flores, por ejemplo.
3. Se deberían realizar estudios complementarios a las moléculas separadas mediante cromatografía de gases que no pudieron ser identificadas por espectrometría de masas, con el fin de darles una identidad y evaluar sus propiedades y posibles usos terapéuticos o comerciales, tomando en consideración su toxicidad.
4. Se recomienda buscar más especies de Amaryllidaceae que presenten contenidos más elevados de galantamina en su composición química y emplear el método, puesto a punto en el presente trabajo, exclusivamente para las especies que cumplan con esa condición.
5. Se recomienda desarrollar y/o poner a punto métodos complementarios para determinar más actividades terapéuticas de interés, en nuestra universidad y nuestro medio, con el fin de complementar estudios anteriores de especies vegetales y generar más conocimiento aplicable en nuestro ámbito de ejercicio profesional.

BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA, K. et al.** *Identification of the alkaloids of *Stenomesson aurantiacum* (Kunth) Herb, an Amaryllidaceae species.* PharmacologyOnLine [en línea], vol. 3, pp. 178-183. 2014. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/270216008_Identification_of_the_alkaloids_of_stenomesson_aurantiacum_KUNTH_Herb_an_Amaryllidaceae_species_from_the_ecuadorian_Andes.
- ANDRADE, J.P. De.** *Estudio de la composición alcaloídica de *Narcissus broussonetii* y de tres especies brasileñas del género *Hippeastrum* (Amaryllidaceae)* [en línea]. S.l.: universitat de Barcelona. 2014. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/55988/1/JPdA_TESIS.pdf.
- ASOCIACIÓN INTERNACIONAL DE ALZHEIMER, A.** *El Impacto Global de la Demencia. Informe Mundial sobre el Alzheimer.* [en línea]. 2015. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <https://www.alz.co.uk/research/worldalzheimerrreport2015-summary-spanish.pdf>.
- ATANASOVA, M. et al.** *Galantamine derivatives with indole moiety: Docking, design, synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity.* Bioorganic and Medicinal Chemistry. [en línea], vol. 23, no. 17, pp. 5382-5389. ISSN 14643391. DOI 10.1016/j.bmc.2015.07.058. 2015. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.058>.
- ÁVALOS, A. y GARCÍA, E.** *Metabolismo secundario de plantas.* Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal [en línea], vol. 2, no. 3, pp. 119-145. 2009. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf.
- AZEVEDO, L. et al.** *Stability-indicating study of the anti-Alzheimer's drug galantamine hydrobromide.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. [en línea], vol. 55, no. 1, pp. 85-92. ISSN 0731-7085. DOI 10.1016/j.jpba.2011.01.022. 2011. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2011.01.022>.
- AZNAR, C.M.** *El día 1 de diciembre se celebra el Día Mundial del SIDA.* Ministerio de Salud Pública del Ecuador. [en línea]. 2015. [Consulta: 8 febrero 2017]. Disponible en: <http://instituciones.msp.gob.ec/cz6/index.php/sala-de-prensa/901-el-21-de-septiembre-se-celebra-el-dia-mundial-del-alzheimer>.

- BACKHAUS, R. et al.** *Biosynthesis of the antineoplastic pancratistatin following tissue culture of *Hymenocallis littoralis* (Amaryllidaceae)*. Medicinal and Aromatic Plants. [en línea], vol. 306, pp. 364-366. 1992. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1936523308800198>.
- BAUERLEIN, M.** *Gas Chromatography-Principles, Techniques and Applications*. Anticancer research. [en línea], vol. 33, no. 5, pp. 2345. ISSN 1791-7530. DOI 10.1016/j.asieco.2012.10.004. 2013. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645785>.
- BERTOLOTE, J.M.** *OMS / Los trastornos neurológicos afectan a millones de personas en todo el mundo: informe de la OMS*. Who. [en línea]. 2013. [Consulta: 8 febrero 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr04/es/>.
- BIOSOFT.** *Mass Spectrometry: Introduction, Principle of Mass Spectrometry, Components of Mass Spectrometer, Applications*. Premier Biosoft. [en línea]. 2015. [Consulta: 6 marzo 2017]. Disponible en: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html.
- CHASE, M.W. et al.** *A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae*. Botanical Journal of the Linnean Society. [en línea], vol. 161, pp. 132-136. 2009. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/sci-hub.cc/doi/10.1111/j.1095-8339.2009.00999.x/pdf#>.
- CORTES, N. et al.** *Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five 12 Amaryllidaceae plants*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. [en línea], ISSN 0731-7085. DOI 10.1016/j.jpba.2014.09.022. 2014. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.022>.
- COUNTRY STATISTICS AND GLOBAL HEALTH ESTIMATES BY WORLD HEALTH ORGANIZATION AND UN PARTNERS.** *Ecuador WHO statistical profile*. WHO Profiles. [en línea]. 2015. [Consulta: 10 marzo 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/gho/en>.
- DEĞİRMENCI, Y. y KEÇEÇI, H..** *Visual Hallucinations Due to Rivastigmine Transdermal Patch Application in Alzheimer's Disease; The First Case Report*. International Journal of Gerontology. [en línea], vol. 10, no. 4, pp. 240-241. ISSN 18739598. DOI

10.1016/j.ijge.2015.10.010. 2016. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1873959816301211>.

DEL PINO, J. et al. *SN56 basal forebrain cholinergic neuronal loss after acute and long-term chlorpyrifos exposure through oxidative stress generation; P75NTR and nAChRs alterations mediated partially by AChE variants disruption*. *Toxicology* [en línea], vol. 353-354, pp. 48-57. ISSN 18793185. DOI 10.1016/j.tox.2016.05.007. 2016. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.05.007>.

DEY, A. et al. *Natural products against Alzheimer's disease: pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions*. *Biotechnology Advances*. [en línea], ISSN 0734-9750. DOI 10.1016/j.biotechadv.2016.12.005. 2016. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.005>.

ECUADOR. ASAMBLEA NACIONAL DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR. *En Ecuador más de 100 mil personas sufren de alzheimer y otras demencias*. Sala de prensa. [en línea]. 2014. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <http://www.asambleanacional.gob.ec/es/noticia/en-ecuador-mas-de-100-mil-personas-sufren-de-alzheimer-y>.

ECUADOR. DESARROLLO, S.N. de P. *Objetivo 3. Mejorar la calidad de vida de la población*. Plan Nacional del Buen Vivir. [en línea]. 2013. [Consulta: 9 febrero 2017]. Disponible en: [www.planificacion.gob.ec/wp.../07/Plan-Nacional-para-el-Buen-Vivir-2017-2021.pdf](http://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/2013/07/Plan-Nacional-para-el-Buen-Vivir-2017-2021.pdf).

ECUADOR. INEC. *Salud mental en el Ecuador. Encuesta Salud, Bienestar y Envejecimiento*. Infografía. [en línea]. 2009. [Consulta: 7 marzo 2017]. Disponible en: www.who.int/mental_health/ecuador_who_aims_report.pdf.

ECUADOR. INEC. *Anuario de Estadísticas Vitales Nacimientos y Defunciones*. Dirección de Estadísticas Socio-demográficas. [en línea]. 2015. [Consulta: 6 marzo 2017]. Disponible en: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Poblacion_y_Demografia/Nacimientos_Defunciones/Publicaciones/Anuario_Nacimientos_y_Defunciones_2014.pdf.

ECUADOR. PLANIFICACIÓN, C.N. *Plan Nacional del Buen Vivir*. Consejo Nacional de Planificación. [en línea]. 2013. [Consulta: 3 marzo 2017]. Disponible en:

www.buenvivir.gob.ec/versiones-plan-nacional.

- ELLMAN, G. et al.** *A new and rapid colorimetric of Acetylcholinesterase determination*. Biochemical Pharmacology. [en línea], vol. 7, pp. 88-95. 1961. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13726518>.
- EXTANCE, A.** *Alzheimer's failure raises questions about disease-modifying strategies*. Nature reviews. Drug discovery. [en línea], vol. 9, no. 10, pp. 749-751. ISSN 1474-1776. DOI 10.1038/nrd3288. 2010. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3288>.
- FRANCO, R. y CEDAZO-MINGUEZ, A.** *Successful therapies for Alzheimer's disease: Why so many in animal models and none in humans*. Frontiers in Pharmacology. [en línea], vol. 5 JUN, no. June, pp. 1-14. ISSN 16639812. DOI 10.3389/fphar.2014.00146. 2014. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25009496>
- GARDEN, M.B.** *Amaryllidaceae*. The Plant List. [en línea]. 2010. [Consulta: 8 mayo 2017]. Disponible en: <http://www.theplantlist.org/browse/A/Amaryllidaceae/>.
- GARDEN, M.B.** *Phaedranassa cinerea Ravenna*. Bolivia Catalogue. [en línea]. 2017. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/1202113>.
- GHOSAL, S. et al.** *Alkaloids of Zephyranthes flava*. Phytochemistry. [en línea], vol. 25, no. 3, pp. 0-3. 1986. [Consulta: 8 mayo 2017]. Disponible en: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200811875.
- GREUNEN, D.G. et al.** *Targeting Alzheimer's disease by investigating previously unexplored chemical space surrounding the cholinesterase inhibitor donepezil*. European Journal of Medicinal Chemistry. [en línea], ISSN 0223-5234. DOI 10.1016/j.ejmech.2016.10.036. 2016. [Consulta: 8 mayo 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.036>.
- HO, A.** *Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells Ivo Dosko c*. Phytochemistry Letters journal. [en línea], vol. 13, pp. 394-398. DOI 10.1016/j.phytol.2015.08.004. 2015. [Consulta: 8 mayo 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2510759>
- IUCN.** *Phaedranassa cinerea*. Red List. Guiding conservation for 50 years. [en línea]. 2016

[Consulta: 8 febrero 2017]. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/search>.

IUCN. *Categories and Criteria (version 3.1)*. © International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. [en línea]. 2017. [Consulta: 10 mayo 2017]. Disponible en: http://www.iucnredlist.org/static/categories_criteria_3_1.

JSTOR. *Phaedranassa cinerea*. JSTOR Global Plants. [en línea]. 2000. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: <http://plants.jstor.org/search?genus=Phaedranassa&species=cinerea>.

JUDD, W.S. et al. *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. 3rd Editio. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2007, pp. 563-567.

LANE, R.M. et al. *Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia*. The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP). [en línea], vol. 9, no. 1, pp. 101-24. ISSN 1461-1457. DOI 10.1017/S1461145705005833. 2006. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16083515>.

LISEC, J. et al. *Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants*. Nat Protoc. [en línea], vol. 1, no. 1, pp. 387-396. ISSN 1750-2799. DOI 10.1038/nprot.2006.59. 2006. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406261>.

LLERENA, Á. *Metabolitos secundarios*. Tercer congreso latinoamericano de agroecología. [en línea]. 2011. [Consulta: 27 mayo 2017]. Disponible en: http://www.rap-al.org/articulos_files/METABOLITOS_Llerena3.pdf.

LÓPEZ, S. et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life Sciences* [en línea], vol. 71, pp. 2521-2529. 2002. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320502020349.

MCMURRY, J. *Química Orgánica*. 7a. México, D.F.: Cengage Learning. ISBN 9786074813494. 2008, pp. 243-254.

MISHRA, C.B. et al. *Design, synthesis, in-silico and biological evaluation of novel donepezil derivatives as multi-target-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease*. European Journal of Medicinal Chemistry. [en línea], vol. 125, pp. 736-750. ISSN 17683254. DOI

10.1016/j.ejmech.2016.09.057. 2017. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.057>.

MORISHIMA-KAWASHIMA, M. *Molecular mechanism of the intramembrane cleavage of the b-carboxyl terminal fragment of amyloid precursor protein by Secretase*. *Frontiers in Physiology*. [en línea], vol. 5, no. Nov, pp. 1-8. ISSN 1664042X. DOI 10.3389/fphys.2014.00463. 2014. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4245903/>

NG, Y.P. et al. *Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease*. *Neurochemistry International*. [en línea], ISSN 0197-0186. DOI 10.1016/j.neuint.2015.07.018. 2015. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2015.07.018>.

NIÑO, J. et al. *Cuantificación de licorina en callos y raíces cultivados in vitro de Crinum x powelli «album» (Amaryllidaceae) por Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)*. *Scientia et Technica*. [en línea], vol. 29, no. ISSN 0122-1701, pp. 83-88. 2005. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/849/84911948010.pdf>.

OLEAS, N. *Landscape Genetics of Phaedaranassa Herb. (Amaryllidaceae) in Ecuador*. *FIU Electronic Theses and Dissertations*. [en línea], vol. Paper 443. 2011. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: <http://digitalcommons.fiu.edu/etd> Recommended.

OLEAS, N. et al. *Eight microsatellite loci in Phaedaranassa schizantha Baker (Amaryllidaceae) and cross-amplification in other Phaedaranassa species*. *Conservation Genetics*. [en línea], vol. 10, no. 6, pp. 1887-1889. ISSN 15660621. DOI 10.1007/s10592-009-9846-8. 2009. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: link.springer.com/article/10.1007/s10592-009-9846-8

OLEAS, N. y PITMAN, N. *Phaedaranassa cinerea*. *The IUCN Red List of Threatened Species™* [en línea], vol. 8235. 2015. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2003.RLTS.T42810A10754648.en>.

OMS. *Demencia*. *Centro de prensa*. [en línea]. 2016. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>.

OPS_OMS. *La obesidad infantil es tema central en asamblea de OMS*. [en línea]. 2014. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en:
http://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=1234:mayo-21-

2014&Itemid=356.

- ORTIZ, J.E. et al.** *Alkaloids from Hippeastrum argentinum and Their Cholinesterase- Inhibitory Activities: An in Vitro and in Silico Study*. Journal of Natural Products. [en línea], DOI 10.1021/acs.jnatprod.5b00785. 2015. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27096334>
- OSORIO, E.** *Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora colombiana: Alcaloides de Phaedranassa dubia (Amaryllidaceae) y biflavonoides de Garcinia madruno (Clusiaceae)*. [en línea]. S.I.: Universidad de Barcelona. 2008. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2618/EJOD_TESIS.pdf.
- OSORIO, E.** *Aspectos básicos de Farmacognosia*. Universidad de Antioquia. [en línea]. 2009. [Consulta: 1 abril 2017]. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/Farmacognosia.pdf>.
- OSORIO, E.J. et al.** *In vitro antiprotozoal activity of alkaloids from Phaedranassa dubia (Amaryllidaceae)*. Phytochemistry Letters. [en línea], vol. 3, no. 3, pp. 161-163. ISSN 1874-3900. DOI 10.1016/j.phytol.2010.06.004. 2010. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2010.06.004>.
- PARDO, J.** *Patentabilidad de los extractos vegetales*. Los lunes del centro de patentes. [en línea]. [Consulta: 3 marzo 2017]. 2002. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: www.ub.edu/centrepatents/pdf/doc_dilluns.../pardo_patentesextractosplantas.pdf.
- ROERSCH, C.** *Plantas Medicinales*. 4ª ed. Alemania: Koeltz Scientific Book e Königstein. 2004, pp. 654-657.
- ROMERO-SANDOVAL, N. et al.** *OMS / Ecuador*. Open Journal of Epidemiology. [en línea]. 2012. [Consulta: 7 febrero 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/countries/ecu/es/>.
- SELL, M. et al.** *Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in Narcissus confusus: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids*. Plant Cell Reports. [en línea], vol. 18, no. Springer-Verlag, pp. 646-651. 1999. [Consulta: 3 mayo 2017]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002990050636>.
- SOCIETY, P.B.** *Phaedranassa*. Telos Rare Bulbs. [en línea]. 2016. [Consulta: 4 mayo 2017].

Disponible en: <http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Phaedranassa>.

STEVENS, P.F. *Asparagales*. Angiosperm Phylogeny Website. [en línea]. 2010. [Consulta: 20 abril 2017]. Disponible en:

<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/orders/asparagalesweb.htm#Amaryllidaceae>

SUH, G.H. et al. *A prospective, double-blind, community-controlled comparison of three doses of galantamine in the treatment of mild to moderate Alzheimer's disease in a Korean population*. Clinical Therapeutics. [en línea], vol. 26, no. 10, pp. 1608-1618. ISSN 01492918. DOI 10.1016/j.clinthera.2004.10.006. 2004. [Consulta: 20 abril 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/8132385_A_prospective_double-blind_community-controlled_comparison_of_three_doses_of_galantamine_in_the_treatment_of_mild_to_moderate_Alzheimer's_disease_in_a_Korean_population

VERPOORTE, R. *Pharmacognosy in the New Millennium: Leandfinding and Biotechnology*.

Journal of Pharmacy and Pharmacology. [en línea], vol. 52, no. Pharm. Pharmacol., pp. 253-262. 2000. [Consulta: 20 abril 2017]. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10757412>.

WANG, L. et al. *Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of Lycoris radiata*. Biochemical Systematics and Ecology. [en línea], vol. 38, no. 3, pp. 444-446. ISSN 0305-1978. DOI 10.1016/j.bse.2010.02.005. 2010. [Consulta: 20 abril 2017]. Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2010.02.005>.

ZHAN, G. et al. *Amaryllidaceae alkaloids with new framework types from Zephyranthes candida as potent acetylcholinesterase inhibitors*. European Journal of Medicinal Chemistry. [en línea], ISSN 0223-5234. DOI 10.1016/j.ejmech.2016.10.057. 2016. [Consulta: 20 abril 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.057>.

ANEXOS

ANEXO A: Lugar de recolección de la especie vegetal, identificada por la doctora Nora Oleas (Oleas, 2011). Latitud: -2.055520. Longitud: -78.985458.



ANEXO B: Bulbos de *P. cinerea* secos.



ANEXO C: Concentración de metanólico de *P. cinerea*.



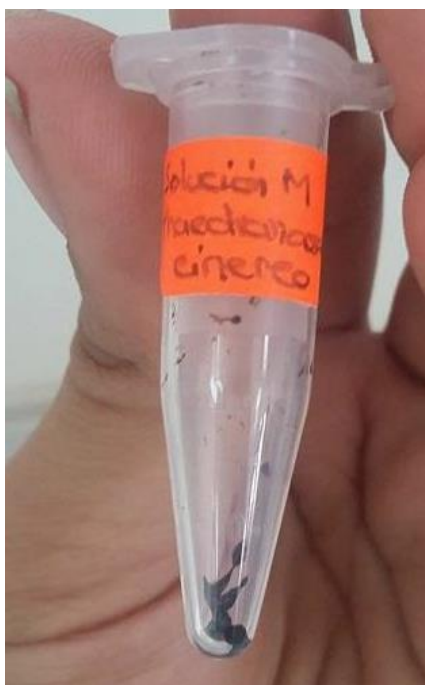
ANEXO D: Extracción de alcaloides con éter etílico.



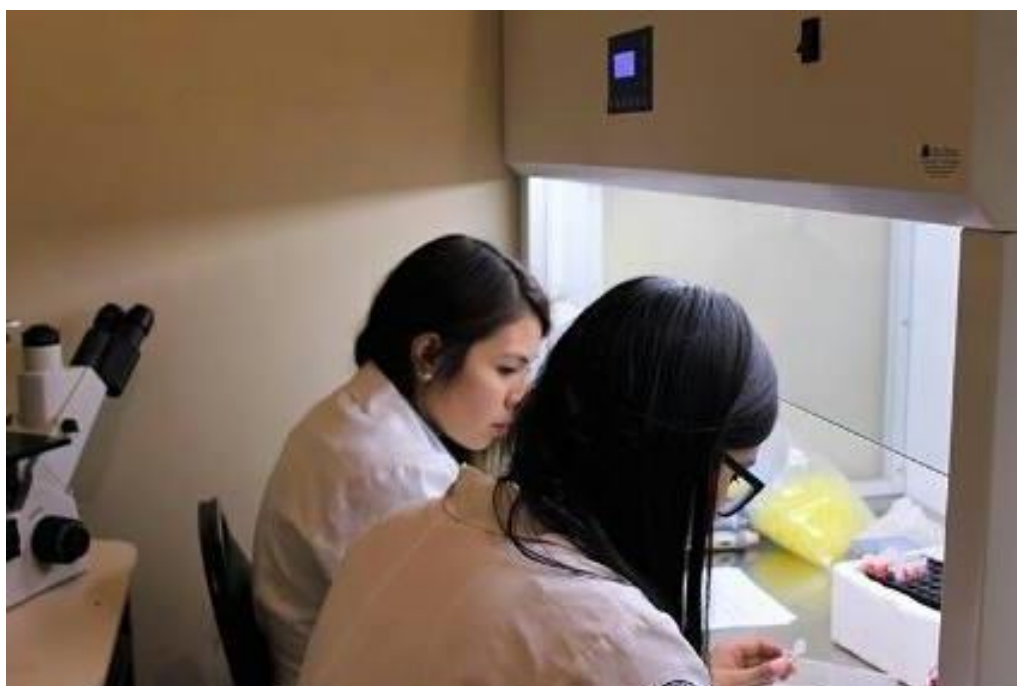
ANEXO E: Alcaloides extraídos mediante protocolo de cambio de pH y concentrados.



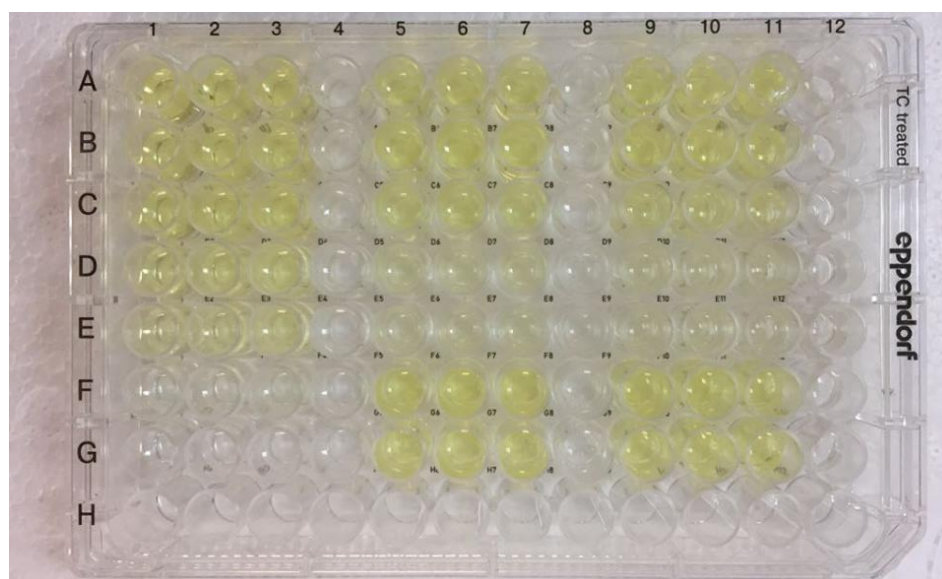
ANEXO F: Almacenamiento de extracto de alcaloides.



ANEXO G: Preparación de reactivos y placa en el laboratorio de Biología molecular, UNACH.



ANEXO H: Microplaca después de la lectura



ANEXO I: Reporte de lectura de espectrofotómetro ELISA.

BioTek Instruments												
Assay: Quick Read				Date: 26/06/17				Lot: _____				
Wavelength: 405				Time: 19:22:04				Operator: _____				
				Temp: _____				Plate ID: _____				
COMMENTS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
CALL												
CalcOD	0.456	0.457	0.442	0.066	0.433	0.454	0.440	0.068	0.461	0.437	0.453	0.069
Well	SMP1	SMP9	SMP17	SMP25	SMP33	SMP41	SMP49	SMP57	SMP65	SMP73	SMP81	SMP89
RSLT												
B												
CALL												
CalcOD	0.419	0.418	0.423	0.045	0.440	0.437	0.447	0.043	0.433	0.431	0.431	0.043
Well	SMP2	SMP10	SMP18	SMP26	SMP34	SMP42	SMP50	SMP58	SMP66	SMP74	SMP82	SMP90
RSLT												
C												
CALL												
CalcOD	0.423	0.422	0.423	0.046	0.339	0.359	0.338	0.047	0.311	0.302	0.309	0.052
Well	SMP3	SMP11	SMP19	SMP27	SMP35	SMP43	SMP51	SMP59	SMP67	SMP75	SMP83	SMP91
RSLT												
D												
CALL												
CalcOD	0.337	0.332	0.340	0.044	0.224	0.216	0.224	0.079	0.201	0.199	0.197	0.090
Well	SMP4	SMP12	SMP20	SMP28	SMP36	SMP44	SMP52	SMP60	SMP68	SMP76	SMP84	SMP92
RSLT												
E												
CALL												
CalcOD	0.279	0.278	0.291	0.045	0.202	0.206	0.201	0.112	0.207	0.201	0.199	0.127
Well	SMP5	SMP13	SMP21	SMP29	SMP37	SMP45	SMP53	SMP61	SMP69	SMP77	SMP85	SMP93
RSLT												
F												
CALL												
CalcOD	0.115	0.117	0.121	0.047	0.455	0.457	0.465	0.047	0.463	0.472	0.462	0.045
Well	SMP6	SMP14	SMP22	SMP30	SMP38	SMP46	SMP54	SMP62	SMP70	SMP78	SMP86	SMP94
RSLT												
G												
CALL												
CalcOD	0.075	0.073	0.074	0.045	0.434	0.432	0.438	0.047	0.442	0.453	0.470	0.046
Well	SMP7	SMP15	SMP23	SMP31	SMP39	SMP47	SMP55	SMP63	SMP71	SMP79	SMP87	SMP95
RSLT												
H												
CALL												
CalcOD	0.043	0.044	0.044	0.044	0.044	0.046	0.043	0.044	0.044	0.043	0.044	0.044
Well	SMP8	SMP16	SMP24	SMP32	SMP40	SMP48	SMP56	SMP64	SMP72	SMP80	SMP88	SMP96
RSLT												

ANEXO J: Ejemplo de tratamiento de datos.

Phaedranassa cinerea					% de Inhibición AChE			Prom % inhib	DE	Conc	IC 50
Muestra (ug/mL)	Triplicado A	Triplicado B	Triplicado C	Blanco	A	B	C				µg/mL
5	0.361	0.367	0.393	0.045	13.739763	12.101911	5.004550	10.28207461	4.643257806	5	
10	0.315	0.327	0.329	0.050	27.661510	24.385805	23.839854	25.29572338	2.066936614	10	35.0321752
20	0.279	0.272	0.286	0.052	38.034577	39.945405	36.123749	38.03457689	1.910828025	20	
50	0.211	0.214	0.215	0.056	57.688808	56.869882	56.596906	57.05186533	0.568243676	50	
75	0.189	0.183	0.186	0.058	64.240218	65.878071	65.059145	65.05914468	0.818926297	75	
100	0.163	0.162	0.164	0.060	71.883530	72.156506	71.610555	71.88353048	0.272975432	100	

5	10.2820746
10	25.29572334
20	38.0345769
50	57.0518653
75	65.0591447
100	71.8835305

Título del gráfico

$y = 20.305\ln(x) - 22.21$
 $R^2 = 0.9995$