



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

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL
EXTRACTO ALCALOIDAL DE *Phaedranassa glauciflora* SOBRE
ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: VIVIANA SOFÍA BALDEÓN SAMANIEGO

TUTOR: Lic. KAREN LISSETH ACOSTA LEÓN, M.Sc.

Riobamba – Ecuador

2018

© 2018, Viviana Sofía Baldeón Samaniego

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 del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo experimental: “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DE *Phaedranassa glauciflora* SOBRE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA**”, de responsabilidad de la señorita Viviana Sofía Baldeón Samaniego, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Lic. Karen Acosta M.Sc.

**DIRECTORA DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dra. Susana Abdo M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DERECHOS DE AUTORÍA

El trabajo de grado que presento es original y basado en el proceso de investigación y/o adaptación tecnológica establecido en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. En tal virtud los fundamentos teóricos – científicos son de exclusiva responsabilidad del autor. El patrimonio intelectual le pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Viviana Sofía Baldeón Samaniego

Cédula de Identidad: 172479541-2

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme la vida, guiar mis pasos, por llenarme de momentos felices y protegerme durante todos estos años. A mi ángel María Piedad Samaniego, por ser mi inspiración, mi luz y mi gran ejemplo de lucha y valentía.

A mis padres Marco y Mariana, quienes son el centro de mi vida y mi razón de ser feliz. A mis hermanas Gabriela y Verónica, por todo el amor, por sus abrazos cálidos y por su apoyo incondicional.

Viviana.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la Virgen, por su bondad infinita, por nunca abandonarme en esta etapa de mi vida, por darme la fuerza y la sabiduría para superar cualquier obstáculo y cumplir uno de mis más grandes sueños.

A mis padres, quienes desde que nací me han dedicado todo su tiempo, su infinito amor y paciencia. Han sido mis guías y mi ejemplo a seguir. Gracias por creer en mí y enseñarme que todo es posible cuando se hacen las cosas con esfuerzo y mucho amor. Sin duda son lo mejor que me ha pasado en la vida. Son mi bendición.

Agradezco infinitamente a mis hermosas hermanas, por todo su apoyo y complicidad, a Verito, que a pesar de la distancia siempre estuvo ahí brindándome su amor y contagiándome de su felicidad y de manera especial a mi hermana Gaby por haber estado conmigo en toda esta etapa universitaria, por su paciencia, por sus cuidados y por hacerme sentir ese calor de hogar.

A mi amiga Eve, por ser mi cómplice y por brindarme su amistad sincera durante todos estos años, gracias por compartir conmigo tantos buenos y malos momentos, te llevo siempre en mi corazón.

Doy las gracias a la Lic. Karen Acosta, quien ha sido más que mi docente, mi amiga, gracias por todas las enseñanzas brindadas durante estos años y en este trabajo de tesis, gracias por tu cariño y por apoyarme a cumplir mis sueños.

Agradezco infinitamente a la Dra. Susana Abdo, por brindarme su tiempo, su ayuda y sus valiosos consejos siempre que los necesité. Ha sido una bendición poder conocerla.

Al grupo de investigación GIPRONAF por la apertura para desarrollar mi trabajo de titulación, al Dr. Jaume Bastida de la Universitat de Barcelona (España) y la Dra. Nora Oleas de la Universidad Tecnológica Indoamérica, por su valioso aporte en esta investigación.

A todos mis amigos que estuvieron conmigo durante estos años, gracias por enseñarme algo nuevo cada día y finalmente a una persona especial, quien nunca dejó de creer en mí y me motivo a luchar con todo hasta el final, gracias por todo.

Viviana.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterasa
AChEI	Inhibidores de acetilcolinesterasa
ApoE4	Apolipoproteína E4
ATC	Yoduro de Acetiltiocolina
BTC	Yoduro de Butiriltiocolina
BIFRENES	La Biodiversidad Iberoamericana como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible
BuChE	Butirilcolinesterasa
CG – MS	Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas
CYTED	Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
DTNB	5,5'-Ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)
EA	Enfermedad de Alzheimer
FDA	Food and Drug Administration
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50
PBS	Buffer fosfato salino
PS1	Presenilina-1
PS2	Presenilina-2
SNC	Sistema Nervioso Central
SORL1	Sortilina relacionada con el receptor 1

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xiv
SUMARY.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
1.	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL
1.1.	Familia Amaryllidaceae..... 4
<i>1.1.1</i>	<i>Características Generales.....</i> 4
<i>1.1.2</i>	<i>Amaryllidaceae en Ecuador.....</i> 5
<i>1.1.3</i>	<i>Phaedranassa.....</i> 5
<i>1.1.3.1</i>	<i>Phaedranassa glauciflora.....</i> 6
<i>1.1.4</i>	<i>Alcaloides de Amaryllidaceae.....</i> 7
<i>1.1.4.1</i>	<i>Galantamina.....</i> 9
1.2	Enfermedad de Alzheimer..... 10
<i>1.2.1</i>	<i>Descripción.....</i> 10
<i>1.2.2</i>	<i>Epidemiología y Factores de Riesgo.....</i> 10
<i>1.2.3</i>	<i>Síntomas.....</i> 11
<i>1.2.4</i>	<i>Tratamiento de Alzheimer.....</i> 12
<i>1.2.5</i>	<i>Acetilcolina y la Enfermedad de Alzheimer.....</i> 12
1.3	Acetilcolinesterasa..... 13
<i>1.3.1</i>	<i>Inhibidores de la Acetilcolinesterasa.....</i> 13
1.4	Butirilcolinesterasa..... 14
1.5	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas..... 14
1.6	Ensayo de detección de Inhibidores de Colinesterasas..... 15

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO.....	16
2.1	Lugar de Investigación.....	16
2.2	Recursos Materiales.....	16
2.2.1	<i>Materiales</i>	16
2.2.2	<i>Reactivos</i>	17
2.2.3	<i>Equipos</i>	18
2.3	Recolección de la Muestra.....	19
2.4	Identificación Botánica.....	19
2.5	Preparación del Material Vegetal.....	19
2.6	Extracción de Alcaloides.....	19
2.7	Identificación de Alcaloides.....	20
2.7.1	<i>Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)</i>	20
2.8	Preparación de las soluciones utilizadas en el ensayo de Inhibición.....	20
2.8.1	<i>Muestra de estudio</i>	20
2.8.2	<i>Muestra de alcaloides de Phaedranassa glauciflora</i>	21
2.8.3	<i>Compuesto de referencia Galantamina</i>	21
2.9	Ensayo de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.....	21
2.10	Análisis de Datos.....	22
2.10.1	<i>Curva de Inhibición para la determinación del IC₅₀</i>	22

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS.....	23
3.1	Obtención del Extracto puro de alcaloides de <i>Phaedranassa glauciflora</i> ...	23
3.2	Identificación de Alcaloides mediante Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masa.....	24

3.3	Aplicación del Método modificado de Ellman et al. para la determinación de la actividad inhibitoria de colinesterasas AChE y BuChE.....	28
3.3.1	<i>Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de Phaedranassa glauciflora sobre Acetilcolinesterasa.....</i>	28
3.3.2	<i>Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de Phaedranassa glauciflora sobre Butirilcolinesterasa.....</i>	31
	CONCLUSIONES.....	34
	RECOMENDACIONES.....	35
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Listado de Materiales.....	16
Tabla 2-2:	Listado de Equipos.....	17
Tabla 3-2:	Listado de Reactivos.....	18
Tabla 1-3:	Porcentaje de rendimiento de alcaloides de <i>Phaedranassa glauciflora</i>	23
Tabla 2-3:	Alcaloides identificados mediante CG-EM del extracto purificado de bulbo de <i>P. glauciflora</i>	24
Tabla 3-3:	Porcentajes de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>P. glauciflora</i> . (Primer screening).....	28
Tabla 4-3:	Porcentajes de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>P. glauciflora</i> (Segundo screening).....	29
Tabla 5-3:	Actividad Inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>P. glauciflora</i> sobre AChE expresada como IC ₅₀	30
Tabla 6-3:	Porcentajes de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>P. glauciflora</i> . (Primer screening).....	31
Tabla 7-3:	Porcentajes de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>P. glauciflora</i> (Segundo screening).....	32
Tabla 8-3:	Actividad Inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>P. glauciflora</i> sobre BuChE expresada como IC ₅₀	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Distribución a nivel mundial de la familia Amaryllidaceae.....	4
Figura 2-1:	Especies de <i>Phaedranassa</i> halladas en Ecuador: a) <i>P. cinérea</i> , b) <i>P. dubia</i> , c) <i>P. glauciflora</i> , d) <i>P. lehmanni</i> , e) <i>P. tunguraguae</i> , f) <i>P. schizantha</i> , g) <i>P. viridiflora</i> y h) <i>P. cuencana</i>	6
Figura 3-1:	Especie vegetal <i>Phaedranassa. glauciflora</i> de la familia Amaryllidaceae, localizada en la provincia de Chimborazo.....	7
Figura 4-1:	Estructuras representativas de los 9 tipos de alcaloides de Amaryllidaceae.....	8
Figura 5-1:	Estructura química del Alcaloide de Amaryllidaceae Galantamina.....	9
Figura 6-1:	Representación gráfica del sitio activo de acetilcolinesterasa.....	13
Figura 1-3:	Alcaloides identificados en <i>Phaedranassa glauciflora</i>	25

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Recolección de la especie *Phaedranassa glauciflora*, Alausí- Chimborazo
- ANEXO B:** Acondicionamiento del material vegetal
- ANEXO C:** Obtención del Extracto Crudo
- ANEXO D:** Extracción de Alcaloides de *Phaedranassa glauciflora* Meerow
- ANEXO E:** Obtención del Extracto de alcaloides totales de *Phaedranassa glauciflora* Meerow.
- ANEXO F:** Evaluación de la actividad inhibitoria enzimática
- ANEXO G:** Curvas de inhibición de acetilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *P. glauciflora* Meerow para el cálculo del IC50, realizadas en 3 días consecutivos. (Gráfico 1,2 y 3)
- ANEXO H:** Curvas de inhibición de butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *P. glauciflora* Meerow para el cálculo del IC50, realizadas en 3 días consecutivos. (Gráfico 4,5 y 6)
- ANEXO I:** Permiso de movilización de *Phaedranassa glauciflora* Merow Nro. 012-2017.

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo determinar la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Phaedranassa glauciflora* sobre las enzimas colinesterasas AChE y BuChE. La especie vegetal de estudio pertenece a la familia Amaryllidaceae. Se realizó un proceso de maceración con metanol para obtener el extracto bruto del bulbo seco, obteniendo un porcentaje de rendimiento de alcaloides de 0,3% y la extracción de los mismos se realizó mediante un protocolo de extracción basado en cambios de pH y uso de solventes orgánicos. Para la identificación de los alcaloides presentes en el bulbo de *Phaedranassa glauciflora* se realizó una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, lo que permitió determinar los porcentajes de cada uno. La evaluación de actividad inhibitoria fue desarrollada en base a la metodología modificada de Ellman et al., teniendo como compuesto de referencia la galantamina. La CG-EM mostró un total de 10 alcaloides identificados, siendo los de abundancia significativa licorina (75,01%) y sternbergina (8,66%); además se encontraron 3 alcaloides aun no identificados (m/z 228*a; [M =331]*b, m/z 228*a; [M =289]*b y m/z 125*a). El extracto de alcaloides de *Phaedranassa glauciflora* mostró una actividad inhibitoria sobre AChE expresada como IC₅₀ de 39,94 ± 5,09 µg/mL, y el compuesto de referencia galantamina para la misma enzima presentó un IC₅₀ de 0,30 ± 0,01 µg/mL. Con respecto a la actividad inhibitoria sobre BuChE, el extracto alcaloidal presentó un IC₅₀ de 323,62 ± 3,51 µg/mL, mientras que la galantamina exhibió un IC₅₀ de 5,67 ± 0,08 µg/mL. En ambos casos, el extracto alcaloidal de la especie no supera la actividad inhibitoria del compuesto referencial galantamina, pero se puede observar que existe una mayor afinidad por la enzima AChE. Se recomienda realizar más estudios de las especies pertenecientes al género *Phaedranassa* puesto que el perfil de metabolitos que muestra, tiene actividades farmacológicas interesantes.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA> <FITOQUÍMICA>, <GALANTAMINA>, <EXTRACTO ALCALOIDAL>, <BULBO (*Phaedranassa glauciflora*)>, <AMARYLLIDACEAE>, <ACTIVIDAD INHIBITORIA COLINESTERASAS >, <ALZHEIMER (ENFERMEDAD)>.

SUMMARY

The present investigation aims to determine the inhibitory activity of the alkaloidal extract of *Phaedranassa glauciflora* on the cholinesterase enzymes AChE and BuChE. The vegetal species of study belongs to the Amaryllidaceae family. A maceration process with methanol was performed to obtain the crude extract of the dry bulb, obtaining a percentage of alkaloid yield of 0.3% and the extraction of them was carried out by means of an extraction protocol based on pH changes and use of organic solvents. To identify the alkaloids present in the bulb of *Phaedranassa glauciflora*, Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry was performed, which allowed to determine the percentages of each one. The evaluation of the inhibitory activity was developed based on the modified methodology of Ellman et al., having as a reference compound galantamine. GC-MS showed a total of 10 identified alkaloids, being those of significant abundance liquorine (75.01%) and sternbergine (8.66%); in addition 3 alkaloids not yet identified were found (m/z 228*a; [M=33]*b, m/z 228*a; [M=289]*b y m/z 125*a). The alkaloid extract of *Phaedranassa glauciflora* showed an inhibitory activity on AChE expressed as IC_{50} from $39,94 \pm 5,09 \mu\text{g/mL}$, and the galantamine reference compound for the same enzyme presented an IC_{50} from $0,30 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$. With respect to the inhibitory activity on BuChE, the alkaloidal extract presented an IC_{50} of $323,62 \pm 3,51 \mu\text{g/mL}$, while galantamine exhibited an IC_{50} of $5,67 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$. In both cases, the alkaloidal extract of the species does not exceed the inhibitory activity of the galantamine referential compound, but it can be observed that there is a greater affinity for the AChE enzyme. It is recommended to carry out more studies of the species belonging to the genus *Phaedranassa* since the metabolite profile that it shows has interesting pharmacological activities.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <PHYTOCHEMISTRY>, <GALANTAMINE>, <ALKALOID EXTRACT>, <BULB (*Phaedranassa glauciflora*)> <AMARYLLIDACEAE>, <CHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY>, <ALZHEIMER (DISEASE)>

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que provoca la muerte de las células nerviosas del cerebro. Es considerada como la principal causa de demencia asociada con el envejecimiento. Alrededor de 15 millones de personas, principalmente en los países desarrollados, padecen los síntomas de esta enfermedad. Según los datos presentados por la Asociación de Alzheimer en el 2007, la prevalencia de la enfermedad se cuadruplicará en el año 2050. (Ortiz et al., 2012, p. 13474).

Esta enfermedad además constituye un problema social y sanitario de dimensión pública, que no solo afecta a los enfermos y a su círculo familiar, sino que también produce un impacto sobre el conjunto de la sociedad debido a su carácter irreversible y la falta de un tratamiento curativo. Es necesario que tanto instituciones de salud como académicas, se involucren en el diseño de posibles alternativas para los enfermos de Alzheimer. (Romano et al, 2007, p.9)

El Alzheimer y otras demencias afectan al 5% de las personas de 65 años, pero esta cifra se va duplicando cada 4 años hasta alcanzar el 30% a los 80 años y el 50% de las personas afectadas sobre los 90 años. En el Ecuador actualmente se calcula que hay de 80 a 100 mil personas que padecen esta enfermedad. (Asamblea Nacional del Ecuador, 2014).

En esta patología, la acetilcolina es uno de los neurotransmisores involucrados debido a que se produce una disminución de su actividad. El deterioro de la memoria en pacientes con enfermedad de Alzheimer resulta de un déficit de la función colinérgica en el cerebro. Existen distintos tipos de medicamentos que actualmente están aprobados por la FDA para tratar los síntomas cognitivos de la enfermedad de Alzheimer. Dentro de los principales, se tiene a los inhibidores de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, que impiden la hidrólisis sináptica de acetilcolina, el neurotransmisor que falta en el Alzheimer y que cumple un rol significativo en los procesos de memoria y aprendizaje. Estos medicamentos al mantener altos niveles de acetilcolina en el cerebro, permiten que se dé la comunicación entre las células nerviosas. (Romano et al, 2007, p.9).

En base a lo descrito anteriormente, se ha buscado nuevas fuentes de inhibidores de AChE, principalmente en el reino vegetal. La familia Amaryllidaceae contiene alrededor de 70 géneros y 1600 especies (Acosta, 2013, p.1) que poseen alcaloides específicos con propiedades farmacológicas interesantes y de los cuales la galatamina es uno de los metabolitos más destacado. (Elisha et al., 2013, p. 44). Este alcaloide ejerce acción sobre el sistema nervioso central, puede atravesar la barrera hematoencefálica, es altamente selectivo hacia la enzima AChE y logra potenciar la función colinérgica central. (Ortiz et al, 2012, p. 13474).

La tendencia de la investigación académica es realizar estudios que sean de gran utilidad para la sociedad, sobre todo cuando se trata de investigaciones relacionadas con mejorar la salud. Una de las líneas de investigación que destaca en este ámbito, es el descubrimiento de nuevas fuentes biológicas que tienen sustancias con propiedades farmacológicas interesantes.

El Ecuador es un país rico en vegetación, con un sin número de especies vegetales que no han sido estudiadas hasta la actualidad, como el caso de *Phaedranassa glauciflora* Meerow, especie perteneciente a la Familia de Amaryllidaceae que tiene la probabilidad de poseer una alta cantidad de galantamina y otros metabolitos con actividad inhibitoria de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, favorable en la enfermedad de Alzheimer.

La importancia de este trabajo de investigación se centra en el estudio del potencial farmacológico que presenta una especie propia del país, siendo este un significativo recurso que puede ser utilizado para nuestro beneficio. Durante muchos años la riqueza natural ha sido aprovechada por todas las culturas que han pasado a través de los tiempos, y se han valido de las innumerables propiedades farmacológicas que presentan las plantas para el tratamiento de enfermedades. Por esto, hoy en día son un recurso en el cual la ciencia invierte con el fin de encontrar y potencializar los beneficios que nos ofrecen.

Este estudio contribuye de manera positiva a la comunidad científica por medio del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo “CYTED”, siendo la línea de Investigación “La Biodiversidad Iberoamericana como Fuente de Recursos Naturales para una Explotación Sostenible – BIFRENES”, que está trabajando en la búsqueda de especies de la familia de Amaryllidaceae que contengan un alto porcentaje del metabolito galantamina que tiene actividad farmacológica registrada para la enfermedad de Alzheimer ya que se investiga la inhibición de AChE y BuChE, lo que evita que se degraden los neurotransmisores y avance la enfermedad.

A futuro, los resultados determinados en este estudio servirán, por un lado, como referencia bibliográfica para posteriores investigaciones y también para proporcionar alternativas para el control o tratamiento a un mayor número de personas que padecen de esta enfermedad.

El objetivo de este trabajo experimental es encontrar nuevas fuentes de producción de galantamina y otros alcaloides potenciales para el tratamiento de Alzheimer mediante un estudio que determine la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto alcaloidal de *Phaedranassa glauciflora*, localizada en la Sierra ecuatoriana en la Provincia de Chimborazo; y de esta manera contribuir con la comunidad científica y ser un aporte para el beneficio de la salud de la población.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *Phaedranassa glauciflora* sobre acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

Objetivos Específicos

- Realizar la extracción de alcaloides de la especie *Phaedranassa glauciflora*, a través de un protocolo basado en cambios de pH.
- Aplicar el método de Ellman et al con modificaciones, para el estudio de inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.
- Comparar la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Phaedranassa glauciflora* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, respecto a galatamina.
- Identificar los alcaloides que contiene el extracto obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Familia Amaryllidaceae

1.1.1 Características Generales

Amaryllidaceae es una familia de plantas monocotiledóneas caracterizadas por ser perennes, herbáceas, casi todas con raíces modificadas a manera de bulbos y con flores vistosas. A nivel mundial, se encuentran distribuidas en zonas tropicales, dentro de las cuales tenemos América del Sur, Sudáfrica, la Región Mediterránea, el Cáucaso y Australia como centros principales (Figura 1-1). Esta familia cuenta con aproximadamente 70 géneros y 1600 especies (Acosta, 2013, p.1), dentro de los cuales podemos mencionar: *Pancreatium*, *Narcissus*, *Zephyranthes*, *Eucharis*, *Phaedranassa*, *Stenomesson*, *Hymenocallis*, *Crinum*, entre otros. (Meerow, 1990, pp. 1-52).

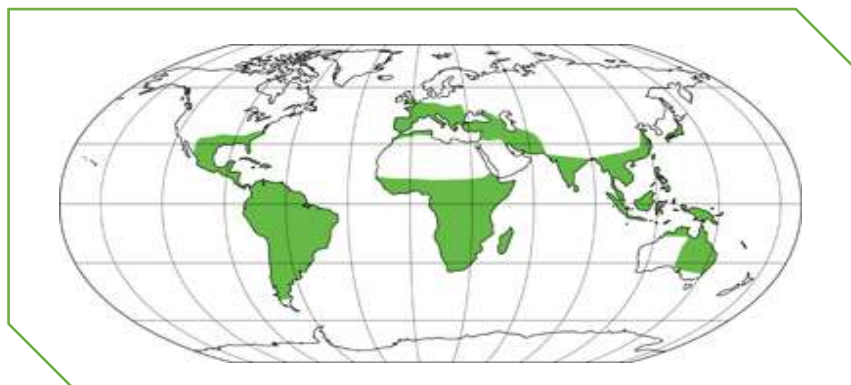


Figura 1-1: Distribución a nivel mundial de la familia Amaryllidaceae.

Fuente: (Acosta, 2013, p.1)

Amaryllidaceae está conformada por tres subfamilias de las cuales Amaryllidoideae es la más distintiva, seguido de Agapanthoideae y Allioideae. Amaryllidoideae es una subfamilia ampliamente distribuida de 59 géneros y alrededor de 850 especies. (Rønsted et al, 2012, p.2).

Si bien es cierto, las plantas de la Familia Amaryllidacea son bien conocidas por su valor ornamental pero también cabe destacar, los alcaloides que producen, puesto que numerosos estudios han demostrado que varios de estos metabolitos exhiben propiedades biológicas y/o

farmacológicas interesantes. Sin embargo, los efectos más ampliamente estudiados son los de inhibición no específica como antiviral y antitumoral. (López et al, 2002, p. 2521)

1.1.2 Amaryllidaceae en Ecuador

El Ecuador es un país que posee una gran diversidad climática y distintos hábitats propicios para el crecimiento de Amarilidaceas. Esta familia de plantas se encuentra distribuida entre los 0 y 4000 m de altitud, en bosques andinos, bosques del litoral y en valles secos interandinos. Debido a que tienen una distribución muy restringida y hábitat amenazado, algunas de sus especies se encuentran en peligro de extinción por lo que se debería controlar su explotación. (Minga et al., 2015, p.50)

En el país, se han descrito alrededor de 36 especies de esta familia pertenecientes a varios géneros como lo son: *Phaedranassa glauciflora*, *P. dubia*, *P. schizantha*, *P. tunguraguae*, *P. viridiflora*, *Eucrosia aurantiaca*, *Eucrosia mirabilis*, *Eucharis candida*, *Eucharis formosa*, *Eucharis grandiflora*, *Eucharis ruthiana*, *Stenomesson auratiacum*, *Crinum amabile* e *Hippeastrum puniceum*. (Meerow et al., 2015, p.1) (Catalogue of life, 2018).

1.1.3 Phaedranassa

Phaedranassa es un pequeño género de Amaryllidaceae establecido por Herbert (1845), conocido en el Altiplano ecuatoriano como "cebolla ashpa" en quichua (cebolla falsa), "cebolleta" o "papa de lobo" en español. Según la organización Trópicos, se han descrito 22 especies de este género. (Oleas, 2011, p.1).

Las especies de *Phaedranassa* son geófitas. Sus bulbos son de color verde grisáceo cubiertos por una túnica marrón y raíces contráctiles. Tienen una o dos hojas pecioladas que, por lo general, se encuentran ausentes en la floración. Su lámina puede ser elíptica o lanceolada con un ápice agudo y una base atenuada que se estrecha hacia el pecíolo. A lo largo de su longitud, las hojas poseen una vena central prominente y tanto el tamaño como el color varían entre las especies. (Meerow, 1990, citado en Oleas, 2011, p.3).

Las flores de *Phaedranassa* son actinomorfas y perfectas. Tienen seis pétalos que son de color verde en la base desde el ápice y con un área intermedia de color rojo, rosa, amarillo o naranja. Las flores tienen seis estambres libres que se están anclados en base a los pétalos, posee 3 filamentos estaminales y sus anteras son de color verde o amarillo. El ovario es inferior de múltiples óvulos. Su fruto es una cápsula loculicida con muchas semillas planas de color negro o

marrón oscuro. Todos estos caracteres florales son utilizados para identificar las diferentes especies. (Oleas, 2011, p.3).

Actualmente en Ecuador se hallan 9 especies endémicas de este género: *Phaedranassa brevifolia*, *P. cinérea*, *P. dubia*, *P. glauciflora*, *P. lehmanni*, *P. schizantha*, *P. tunguraguae*, *P. viridiflora* (Meerow y Snijman, 1998) y *P. cuencana*. Se conocen tres especies en Colombia y una en Costa Rica. En la mayoría de las especies hay pocas poblaciones, de estas, 5 están declaradas en peligro de extinción y una vulnerable debido a su distribución limitada y hábitat amenazado (Minga et al., 2015, p.50).



Figura 2-1: Especies de *Phaedranassa* halladas en Ecuador: a) *P. cinérea*, b) *P. dubia*, c) *P. glauciflora*, d) *P. lehmanni*, e) *P. tunguraguae*, f) *P. schizantha*, g) *P. viridiflora* y h) *P. cuencana*

Fuentes: (Pacific Bult Society, 2016) (Minga et al., 2015, p. 51).

***1.1.3.1 Phaedranassa glauciflora* Meerow**

Phaedranassa glauciflora Meerow es una planta bulbosa endémica de Ecuador, conocida comúnmente como cebollín. Se caracteriza por tener filamentos estaminales rosados, las flores tienen más de 45 mm y son glaucosas. Crece de manera silvestre en acantilados secos junto a plantas del género *Tillandsia* y varias *Cactaceae* a 2380 m de altura. Se localiza en la provincia de Chimborazo a 5 km de Alausí (The New York Botanical Garden, 2017); además se la puede encontrar en los valles del Azuay, creciendo en los alrededores de la ciudad de Cuenca (Minga et al., 2015).

Existen 6 subpoblaciones de esta planta registradas hasta la fecha, las cuales se encuentran en tierras de cultivo y pastos, agrupadas en un área de menos de 100 m². Tres poblaciones se encuentran dentro de la red de áreas protegidas de Ecuador, todas en áreas del Parque Nacional

Sangay. La destrucción del hábitat es la única amenaza conocida para la especie. Debido a ello y a su población limitada, *P. glauciflora* es categorizada como una especie en peligro de extinción incluida en lista roja, según los criterios de la de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. (Red List, 2017).



Figura 3-1: Especie vegetal *Phaedranassa glauciflora* Meerow de la familia Amaryllidaceae, localizada en la provincia de Chimborazo.

Elaborado por: Viviana Baldeón, 2017.

1.1.4 Alcaloides de Amaryllidaceae

Una característica particular de Amaryllidaceae es la presencia de un grupo exclusivo de alcaloides de tipo isoquinolina, aislados de varias plantas de todos los géneros de esta familia, obteniendo un amplio grupo de estos metabolitos que no se encuentran en ninguna otra familia de plantas. En la actualidad, más de 300 alcaloides han sido aislados de la familia de plantas de Amaryllidaceae y a pesar de que su estructura química varía entre sí, se considera una relación biogenética entre los mismos. (Bastida et al, 2006, p. 89).

Los alcaloides que caracterizan al grupo de las amarilidáceas se clasifican en nueve grupos distintos en función del sistema heterocíclico, a los cuales se atribuye la variedad de actividades biológicas de dicha familia. Estos alcaloides son: norbelladina, licorina, homolocatorina, crinina, hemantamina, narciclisina, tazetina, montanina y galantamina (ver Fig. 4-1) (Osorio, 2008, p.9).

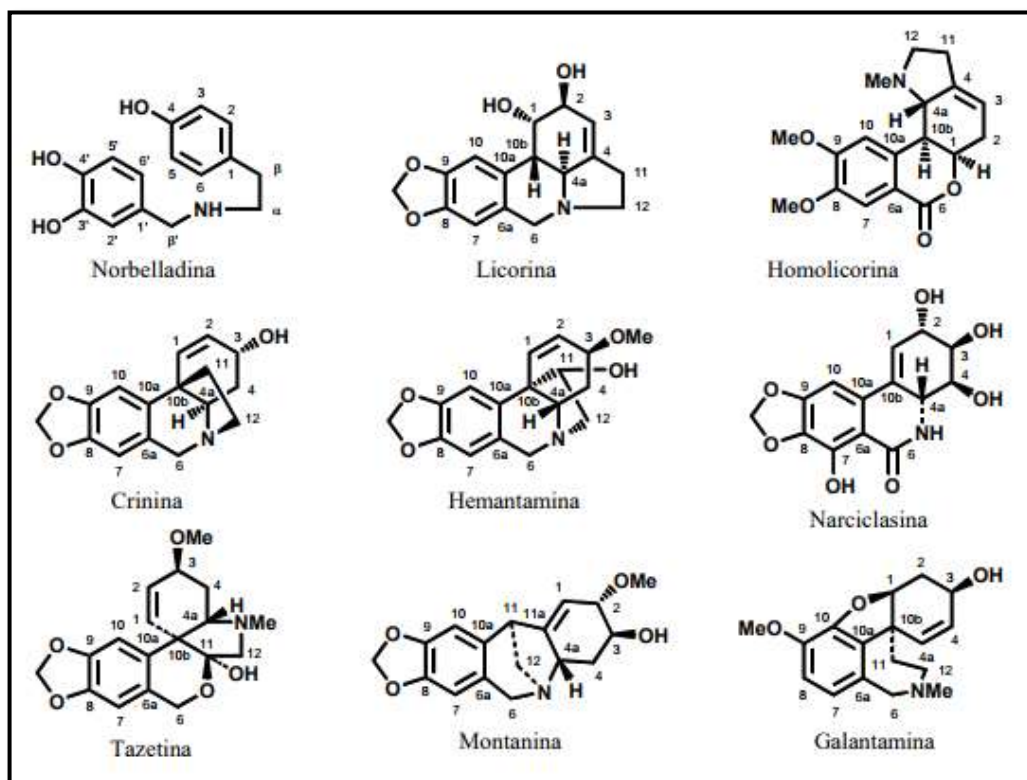


Figura 4-1: Estructuras representativas de los 9 tipos de alcaloides de Amaryllidaceae.

Fuente: (Osorio, 2008, p.9).

Las características químicas más importantes que presentan estos alcaloides son (Bastida y Viladomat, 2002, p. 42):

1. Una estructura base $C_6-C_1-N-C_2-C_6$ donde la parte C_6-C_1 deriva del aminoácido L-fenilalanina, mientras que la fracción $N-C_2-C_6$ deriva de L-tirosina.
2. Un pK entre 6 y 9, siendo bases moderadamente débiles.
3. Poseen un solo átomo de nitrógeno, que puede ser secundario, terciario e, incluso, cuaternario. El número de átomos de C suele variar entre 16 y 20, en dependencia de los sustituyentes del sistema cíclico.

Debido al potencial farmacológico que presentan estos alcaloides, se han realizado durante los últimos años, números estudios a nivel mundial. Varios estudios *in vitro* han encontrado que estos compuestos tienen actividades antivirales, antibacterianas y antifúngicas. Otros alcaloides de Amaryllidaceae, tales como licorina, augustina y crinamina tienen actividad antipalúdica los cuales también muestran *in vitro* actividad antitumoral. Los alcaloides del tipo galantamina tienen actividad inhibidora de acetilcolinesterasa; haciendo de la galantamina la segunda medicina más usada en el tratamiento del Alzheimer. (Acosta, 2014, p. 179)

Las mezclas de alcaloides de los extractos de Amaryllidaceae por lo general, son complejas debido a la cantidad de compuestos que contienen, que suelen ser un número de 10 a 15. Por esta razón, para dar respuesta a fracciones de este tipo se ha visto la gran utilidad que presenta la cromatografía de gases con columna capilar. (Acosta, 2013, p.3)

1.1.4.1 Galantamina

La Galantamina (Figura 5-1), un alcaloide terciario aislado por primera vez en 1952 del bulbo de *Galanthus woronowi*, biosintetizado exclusivamente por especies de la familia Amaryllidaceae, es un IAChE competitivo, de acción prolongada, reversible, muy selectivo respecto a BuChE y es un modulador alostérico del receptor neuronal nicotínico para la acetilcolina, lo que permite potenciar la respuesta de la acetilcolina con efecto independiente de la inhibición de la acetilcolinesterasa. Tiene la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica y actuar dentro del sistema nervioso central (Ortiz et al., 2012, p. 13474). La galantamina se une de forma reversible al sitio activo de la acetilcolinesterasa y presenta una selectividad 53 veces mayor por AChE comparada con la enzima BuChE. (Carretero, 2003, p. 142).

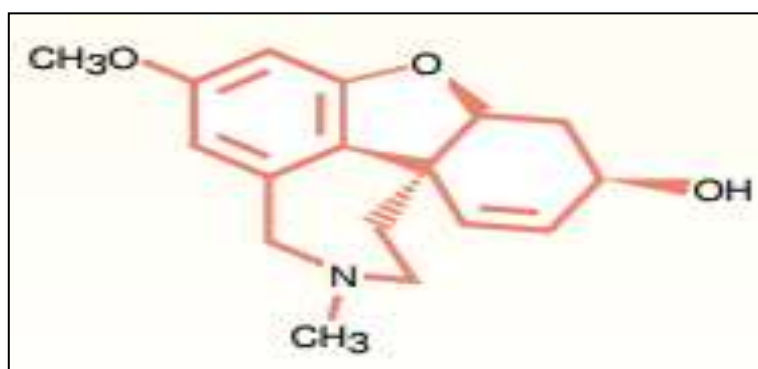


Figura 5-1: Estructura química del Alcaloide de Amaryllidaceae Galantamina.

Fuente: (Elgorashi *et al.*, 2006)

Debido a su acción prolongada se ha demostrado que puede producir efectos beneficiosos incluso después de que un tratamiento con la galantamina haya finalizado. (López et al., 2002, p. 2522). Es el primer alcaloide de Amaryllidaceae aprobado como medicamento recetado en el tratamiento de la Alzheimer (McNulty et al., 2010, p. 5290). Al realizar una comparación entre el hidrobromuro de galantamina y los inhibidores originales de AChE, la fisostigmina o tacrina, se puede observar que la galantamina presenta perfiles farmacológicos superiores y una tolerancia mayor.

Su capacidad para mejorar la actividad colinérgica en el SNC al bloquear la enzima AChE hace que sea utilizada como tratamiento para estadios leves y moderados del Alzheimer y otros trastornos de la memoria como la demencia. Con respecto a su toxicidad, en varios estudios experimentales la galantamina no ha presentado potencial mutagénico ni genotóxico.

1.2 Enfermedad de Alzheimer

1.2.1 Descripción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo, lento y progresivo, que conlleva a la muerte de las neuronas, y se caracteriza por el deterioro paulatino de las funciones cognitivas e intelectuales, dando como consecuencia la pérdida de la memoria que se traduce en la imposibilidad de la persona para llevar una vida cotidiana normal generando posibles cuadros de ansiedad y depresión. (Carretero, 2003, p. 114)

El Alzheimer representa del 60 al 80 por ciento de los casos de la demencia, siendo la causa más común de la misma. Este trastorno neurodegenerativo multifacético está caracterizado a nivel molecular por la agregación de proteínas, incremento del estrés oxidativo, anormalidades mitocondriales y procesos neuroinflamatorios. Las áreas cerebrales involucradas son el prosencéfalo basal, la corteza y la amígdala, quienes participan en los procesos de aprendizaje, memoria, atención y regulación emocional. (Singh et al., 2013, p. 166).

Existen dos formas de manifestación del Alzheimer: EA Esporádica y EA Familiar. La EA Esporádica se caracteriza por un declive progresivo y severo en la cognición dándose un aumento de la muerte celular neuronal, y la EA Familiar se desarrolla mucho más rápido y es causada por mutaciones en los componentes de la apolipoproteína E4 (ApoE4), la presenilina-1 y presenilina-2 (PS1 y PS2) y la sortilina relacionada con el receptor 1 (SORL1) (Singh et al., 2013, p. 166).

El Alzheimer empeora al pasar el tiempo y otros síntomas que se van presentando en esta enfermedad son confusión, desorientación en lugares conocidos, colocación de objetos fuera de lugar, y problemas con el habla y/o la escritura. (Alzheimer's Association, 2017).

1.2.2 Etiología y Factores de Riesgo

Hasta la actualidad, la etiología de la Enfermedad de Alzheimer es desconocida. Se cree que es producida por una combinación de susceptibilidad genética sumada a la exposición a factores

ambientales, donde hay una interacción de factores de riesgo y protectores, y con un impacto diferente en función a la carga genética (p.ej.: presencia de ApoE4). Desde el punto de vista genético, casi la totalidad de los casos son de origen esporádico y solo un 5% se deben a formas familiares. (Fontán, 2012, p.36)

El envejecimiento, es el factor de riesgo más aceptado en esta enfermedad, ya que datos estadísticos indican que una de cada nueve personas mayores de 65 años tiene Alzheimer. La prevalencia de esta enfermedad se duplica cada 5 años, a pesar de ello diversos estudios epidemiológicos sugieren otros factores de riesgo, después de los 65 años. (Alzheimer's Association, 2017).

Otro factor de riesgo es la historia familiar. Investigaciones científicas han comprobado que las personas que tienen un padre, hermano o hermana con Alzheimer tienen dos o tres veces más probabilidades de desarrollar la enfermedad. El riesgo aumenta conforme más miembros de la familia la padecen. Se ha identificado un gen que aumenta el riesgo de Alzheimer, pero esto no es garantía del desarrollo de la enfermedad en la persona que lo posee. Por otro lado, se ha revelado que algunos genes no muy comunes casi garantizan el que una persona desarrolle Alzheimer. Estos genes han sido encontrados en unos pocos cientos de familias extensas alrededor del mundo y sólo son responsables por menos de 1 por ciento de todos los casos de Alzheimer (Alzheimer's Association, 2017).

Una de las tres formas del gen de la apolipoproteína E (e2, e3 o e4) es heredado por las personas de cada padre. Los individuos que poseen la forma e4 incrementan el riesgo de padecer EA en comparación con los que heredan la forma e3, mientras que los que presentan la forma e2 disminuyen el riesgo de desarrollar Alzheimer. (Alzheimer's Association, 2017).

Hoy en día, se ha determinado que 5,4 millones de personas estadounidenses tienen la enfermedad de Alzheimer. Para el año 2050, se estima que el número de personas con esta enfermedad puede alcanzar a los 16 millones (Alzheimer's Association, 2017).

1.2.3 Síntomas

En la enfermedad de Alzheimer el síntoma más común es la pérdida de memoria, a lo que se le asocia alteraciones de otras funciones mentales que gradualmente imposibilitan al sujeto cumplir normalmente con sus actividades diarias, creando un estado de dependencia que muchas veces puede causar depresión y ansiedad. (Martínez, 2017, p.8).

Los síntomas más comunes de la enfermedad son (Martínez, 2017, p.8):

- ✚ Alteraciones del estado de ánimo y de la conducta
- ✚ Pérdida de memoria, que puede llegar al no reconocimiento de la familia y pérdida de las habilidades normales.
- ✚ Dificultad de orientación
- ✚ Problemas de lenguaje
- ✚ Problemas para llevar a cabo actividades motoras y alteraciones cognitivas
- ✚ Incapacidad para aprender nueva información.

En cuanto a los síntomas que se presentan en las fases finales del Alzheimer, tenemos el deterioro de la musculatura y la movilidad, que pueden derivarse en incontinencia urinaria o incontinencia fecal. (Martínez, 2017, p.8).

1.2.4 Tratamiento del Alzheimer

No existe cura para la enfermedad de Alzheimer, por lo que todo tratamiento aplicado es paliativo, teniendo como objetivos: disminuir el avance de la enfermedad, manejar los problemas de comportamiento, confusión y agitación y apoyar a los miembros de la familia y otras personas que brindan cuidados. (Romano et al., 2007, p. 10)

Existen ciertas vitaminas que ayudan al mantenimiento de las funciones cognitivas en estos pacientes como vitaminas B12, B6 y ácido fólico. Por otro lado, se ha probado la eficacia de fármacos anticolinérgicos que inhiben la acción de la acetilcolinesterasa, enzima encargada de hidrolizar la acetilcolina que es un neurotransmisor faltante en el Alzheimer y que incide sustancialmente en la memoria y otras funciones cognitivas. Con todo esto se ha mejorado el comportamiento del enfermo en cuanto a la apatía, la iniciativa y la capacidad funcional y las alucinaciones, mejorando su calidad de vida. (Romano et al., 2007, p.10)

1.2.5 Acetilcolina y la Enfermedad de Alzheimer

La acetilcolina es el neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático, el cual participa en la regulación de diversas funciones como fenómenos de activación cortical, el paso de sueño a vigilia y procesos de memoria y asociación. (Flores and Segura, 2005, p. 315).

En la enfermedad de Alzheimer, el deterioro de las funciones de los neurotransmisores juega un papel muy importante, donde la acetilcolina presenta una baja actividad en la corteza cerebral ya sea por una producción disminuida de dicho neurotransmisor o por una alta actividad de

acetilcolinesterasa. Esta disminución altera los procesos de sinapsis colinérgica lo que provoca la pérdida continua y progresiva de las habilidades intelectuales, afectando en mayor medida a los receptores nicotínicos (implicados en el control voluntario del movimiento, el sueño, el dolor, etc.) y en menor medida los receptores muscarínicos (involucrados con la memoria y el aprendizaje) (Singh et al., 2013, p. 166).

1.3 Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima del grupo de las hidrolasas presente en la mayoría de los seres vivos, que tiene una estructura tridimensional donde se puede observar un sitio catalítico y un sitio aniónico periférico; además posee dos sitios de unión al sustrato de ligandos separados (Ver Fig. 6-1) (Singh et al., 2013, p. 167).

Se encuentra localizada en las hendiduras sinápticas, lugar donde hidroliza la acetilcolina, siendo responsable de la regulación de la concentración de la misma. Esta degradación de AChE se da en la unión neuromuscular en las sinapsis colinérgicas periféricas y centrales (Carretero, 2003, p.115).

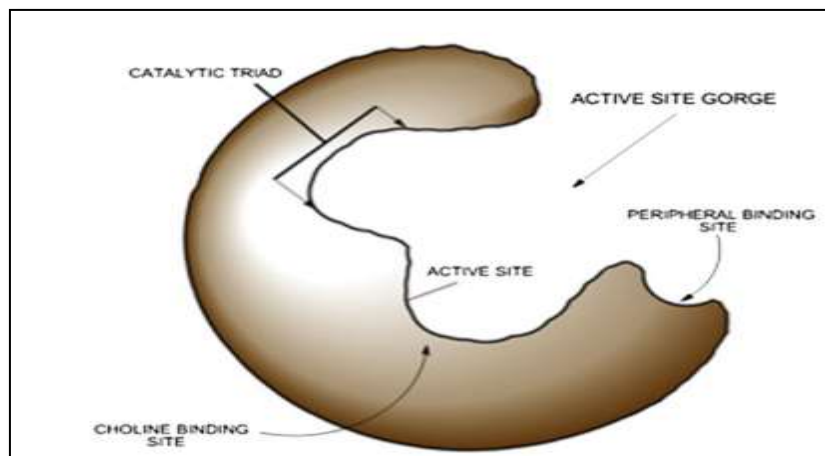


Fig. 6-1: Representación gráfica del sitio activo de acetilcolinesterasa.

Fuente: (Singh et al., 2013)

1.3.1 Inhibidores de la Acetilcolinesterasa

Los inhibidores de la Acetilcolinesterasa (AChEI) son la única clase de compuestos que hasta la fecha han demostrado ser eficaces en el tratamiento de los síntomas cognitivos y funcionales de la enfermedad de Alzheimer (Liston et al., 2004, p.9).

El mecanismo de acción de estos compuestos es actuar sobre el centro activo de la enzima AChE impidiendo la unión de una molécula de colina o su hidrólisis, a través del bloqueo del sitio por

su alta actividad reaccionando irreversiblemente con la serina próxima al centro catalítico. (Grossberg, 2003, p. 221)

El uso de AChEI tiene como objetivo disminuir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, aumentando así la concentración del neurotransmisor acetilcolina permitiendo un aumento de la transmisión sináptica y de esta manera mejorar los procesos cognitivos y estímulos musculares, que da como resultado una mejor calidad de vida de los pacientes con Alzheimer (Viegas et al, 2005, p. 917).

Estos inhibidores representan el punto clave en la terapia para esta enfermedad y únicamente cuatro de estos medicamentos han sido aprobados para el tratamiento sintomático de la enfermedad en estadio leve a moderado. Los medicamentos aprobados son tacrina (una aminoacridina), donepezil (una bencilpiperidina), rivastigmina (un carbamato) y galantamina (un alcaloide terciario). Estos compuestos tienen una eficacia similar por lo que su diferenciación clínica está basada en las diferencias en sus perfiles de tolerabilidad y facilidad de uso. (Viegas et al, 2005, p.918).

1.4 Butirilcolinesterasa

La butirilcolinesterasa (BuChE) es una enzima estructural y funcionalmente relacionada con la acetilcolinesterasa. Se sintetiza en el hígado, siendo su función la de hidrolizar algunos ésteres de colina, como procaína, tetracaína y aspirina. Esta enzima cataliza también la hidrólisis de acetilcolina, siendo más específica la acetilcolinesterasa, mientras que la butirilcolinesterasa muestra máxima actividad sobre la succinilcolina. Cuando se da una alteración hepática, su concentración disminuye en relación directa con los hepatocitos alterados (Vásquez y Osorio, 2000, p. 272).

1.5 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

Estas técnicas analíticas constituyen una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas. (Gutiérrez y Droguet, 2002, p. 35)

Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases es una técnica separativa que permite separar, detectar y cuantificar todos los componentes de mezclas muy complejas. El dato de identificación que reporta de estos compuestos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Lamentablemente, cuando se analiza muestras con un alto número de componentes, este dato no es suficiente para una identificación sin equivocaciones. (Gutiérrez y Droguet, 2002, p. 37)

Espectrometría de Masas

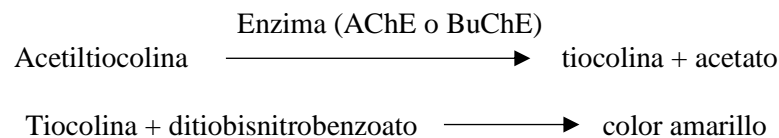
Esta técnica analítica identifica de forma casi inequívoca las sustancias puras, pero ni logra identificar los compuestos de una mezcla sin separarlos previamente, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. (Gutiérrez y Droguet, 2002, p. 37)

Debido a esto, ha sido pertinente acoplar ambas técnicas, CG (“Cromatografía de Gases”) y EM (“Espectrometría de Masas”), obteniendo la técnica CG-EM que permite la separación e identificación de mezclas complejas. Ambas trabajan en fase gaseosa y requieren de una cantidad muy pequeña de muestra para analizarla, estas características la hacen compatibles y perfectas para su acoplación. (Gutiérrez y Droguet, 2002, p. 37)

1.6 Ensayo de detección de Inhibidores de Colinesterasas

Método de Ellman et al.

Es un método fotométrico utilizado para medir la actividad de las colinesterasas mediante un aumento de coloración. Este color es producido por la tiocolina, hidrolizada por la enzima AChE o BuChE, que al reaccionar con el ion ditiobisnitrobenzoato produce un color amarillo. Las reacciones que surgen se muestran a continuación (Ellman et al, 1961, p.88):



Este color se mide en el espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 412 nm. Este método es sensible, se puede aplicar en concentraciones muy bajas de la enzima y su análisis es rápido. (Ellman et al, 1961, p.88)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de Investigación

La investigación del presente trabajo fue realizada en el Laboratorio de Productos Naturales en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo donde se llevó a cabo el proceso de extracción de alcaloides y el ensayo de inhibición de colinesterasas. La Universitat de Barcelona (España) colaboró en esta investigación realizando los análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

2.2 Recursos Materiales

2.2.1 Materiales

Tabla 1-2: Listado de Materiales

MATERIALES
Procedimiento: Preparación de Reactivos
Frascos tipo viales 5 mL
Espátula
Pipeta graduada 5 mL
Balones de aforo 10, 100 mL
Probeta 100 mL
Frasco ámbar de vidrio 500 mL
Piseta
Procedimiento: Inhibición de Colinesterasas
Cubos y botellas de hielo
Gradilla para pipetas
Microplaca de 96 posillos
Papel aluminio
Puntas amarillas para mi micropipeta y pipeta multicanal

Puntas azules para micropipeta
Recipiente de plástico
Toallas de papel <i>tissue</i>
Toallas Absorbentes
Tubos eppendorf 1,5mL y 0,5 mL
Tubos plásticos con tapa rosca 15 mL
Procedimiento: Extracción de Alcaloides
Balón Rotavapor
Desecador
Embudo de separación 500 mL
Frasco ámbar de vidrio 1L
Papel Filtro
Probetas 50 mL, 10 mL
Vaso de precipitación 300 mL
Vial de vidrio 10 mL

Elaborado por: Viviana Baldeón, 2017

2.2.2 Equipos

Tabla 2-2: Listado de Equipos

EQUIPOS
Agitador Magnético
Balanza Analítica
Baño Ultrasonido
Cabina de Flujo laminar vertical
Congelador -20°C
Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas
Cronómetro
Estufa de secado RedLine
Espectrofotómetro Elisa
Molino de Trituración
pH-metro
Vórtex

Elaborado por: Viviana Baldeón, 2017

2.2.3 Reactivos

Tabla 3-2: Listado de Reactivos

REACTIVOS
Procedimiento: Extracto Bruto
Metanol CH ₃ OH
Procedimiento: Extracción de Alcaloides
Acetato de etilo (C ₄ H ₈ O ₂)
Ácido sulfúrico H ₂ SO ₄ (2% v/v)
Éter etílico (C ₂ H ₅) ₂
Hidróxido de Amonio NH ₄ OH (10% v/v/)
Sulfato de Sodio Anhidro
Goma Arábiga
Procedimiento: Lavado de Materiales
Agua Destilada
Agua grado farmacéutico
Procedimiento: Inhibición de Colinesterasas
Acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus electricus</i>
Ácido 5,5 –ditio – bis - (2- nitrobenzoico)
Ácido clorhídrico 0.5N (HCl)
Agua grado farmacéutico
Bifosfato de Sodio (NaH ₂ PO ₄)
Butirilcolinesterasa de suero equino
Cloruro de Sodio (NaCl)
Fosfato de disodio Na ₂ HPO ₄
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)
Galantamina Pura
Yoduro de Acetilcolina
Yoduro de Butirilcolina

Elaborado por: Viviana Baldeón, 2017

2.3 Recolección de la Muestra

La especie *Phaedranassa glauciflora* fue recolectada en estado de floración, en la provincia de Chimborazo en el cantón Alausí, a 2132 metros sobre el nivel del mar, en el mes de agosto de 2017, mediante un muestreo aleatorio simple para obtener aproximadamente 200 g de planta fresca.

Esta recolección se realizó bajo el contrato marco de acceso a los recursos genéticos del proyecto de investigación científica denominado: “La Biodiversidad de Amaryllidaceae como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible” MAE-DNB-CM2015-0054. Se tramitó el correspondiente permiso de movilización de especímenes de flora y fauna silvestres Nro. 012-2017 con el Ministerio del Ambiente de la ciudad de Riobamba. (Anexo I)

2.4 Identificación Botánica

La identificación fue realizada por la Dra. Nora Oleas, experta en plantas del género *Phaedranassa*, que desempeña sus funciones como botánica en el herbario de la Universidad Indoamérica (Quito – Ecuador).

2.5 Preparación del Material Vegetal

Una vez recolectada la especie vegetal, se separó el bulbo de la planta y se limpió cuidadosamente con metanol para eliminar cualquier impureza. Luego de ello, se cortó el bulbo en finos pedazos, con el fin de facilitar su secado y se lo colocó en la estufa a una temperatura de 70 ° C durante 72 horas. El material seco, se trituró en un molino de cuchilla giratoria, obteniendo partículas con una medida menor a 5mm. El bulbo seco reportó un peso 72,89 g.

2.6 Extracción de Alcaloides

Para obtener el extracto alcaloidal, primero se pesó 20 g de material vegetal seco y se maceró con 800 mL de metanol por un período de 3 días, realizando varios intervalos de baños de ultrasonido (1 a 2 horas). Finalizado el tiempo de maceración, se filtró el extracto metanólico y se evaporó el solvente con la ayuda del rotavapor a una temperatura de 50 °C. (Acosta, K., 2014, p. 8)

De esta manera, se obtuvo un extracto crudo el cual se acidificó con H₂SO₄ (2 % v/v) y se limpió con éter etílico. De esta limpieza se obtuvieron dos fases, una fase orgánica compuesta por ceras, mucílagos y clorofilas y una fase acuosa rica en alcaloides.

Esta última fase se basificó con NH₄OH (10% v/v) hasta pH 10, para la posterior extracción de alcaloides con el uso de acetato de etilo. (Acosta, K., 2014, p. 8)

En la fase orgánica quedaron retenidos los alcaloides, por lo que se añadió goma arábiga y sulfato de sodio anhidro con el fin de eliminar los restos de agua. Se filtraron los componentes añadidos y se evaporó el solvente en el rotavapor a una temperatura de 45°C. De esta manera se obtuvo un extracto de alcaloides totales. (Acosta, K., 2014, p. 8)

Dicho extracto fue disuelto con metanol y se traspasó a un frasco tipo vial, que posteriormente fue colocado en una estufa de secado por 24 horas, con el objetivo de evaporar el solvente y poder conservar los alcaloides a una temperatura de 24°C. (Acosta, K., 2014, p. 8)

2.7 Identificación de Alcaloides

2.7.1 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG – EM)

Para realizar la CG-EM, se utilizó el extracto de alcaloides disuelto en metanol. El cromatógrafo de gases utilizado fue de la marca Agilent, modelo 6890, acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico (modelo 5975) que opera en fuente iónica a una temperatura de 230 °C a 70 eV. Este equipo, dispone de una columna SAPIENS-X5-MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), utilizando como fase estacionaria la fenilmetilsilicona al 5%. (Cabezas et al, 2013, p. 70)

Se utilizó un programa de temperatura, configurado de la siguiente manera: Aumento inicial desde 55 °C a 100 °C (60 °C/min) -> 2 minutos a 100 °C -> aumento desde 100 °C a 180 °C (15 °C/min) -> 1 minuto a 180 °C -> aumento desde 180 °C a 300 °C (5 °C/min). (Cabezas et al, 2013, p. 70)

En el inyector, se trabajó a una temperatura de 280 °C y el flujo de He fue de 0,8 ml/min, usando el modo *splitless*. El alcaloide estándar de referencia en todos los análisis fue codeína. (Cabezas et al, 2013, p. 70)

Se utilizó el *software* AMDIS 2.71 (NIST) para obtener y analizar los datos espectrales, lo que permitió verificar la pureza de las señales y el cálculo de índices de retención. (Cabezas et al, 2013, p. 70)

2.8 Preparación de las Soluciones utilizadas en el Ensayo de Inhibición

2.8.1 Muestras de estudio

Las muestras de estudio utilizadas fueron el buffer fosfato salina (PBS), solución salina, enzimas AChE y BuChE y sustratos ATC y BTC, las cuales fueron congeladas a $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$, consiguiendo un período de duración aproximadamente de 6 meses.

2.8.2 Muestra de alcaloides de *Phaedranassa glauciflora*

Se preparó una solución madre del extracto puro de alcaloides de *Phaedranassa glauciflora* con concentración de 10 mg/mL, a partir de la cual se prepararon 4 diluciones con las siguientes concentraciones: 100, 50, 10 y 1 $\mu\text{g/mL}$.

2.8.3 Compuesto de referencia Galantamina

Se utilizó como compuesto de referencia galantamina pura, de la cual se preparó una solución madre 1mg/mL que equivale a una concentración de $3,48 \times 10^{-3}$, derivándose de ella las siguientes diluciones: $1 \times 10^{-7}\text{ M}$, $0,5 \times 10^{-6}\text{ M}$, $1 \times 10^{-6}\text{ M}$, $0,5 \times 10^{-5}\text{ M}$, $1 \times 10^{-5}\text{ M}$ y $1 \times 10^{-4}\text{ M}$.

2. 9 Ensayo de la Actividad Inhibitoria de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa

El ensayo de inhibición enzimática se realizó en una microplaca de acuerdo al método de Ellman et al., con algunas modificaciones. (Ortiz, et al., 2016). Para ello se añadió a los micropocillos 50 μL de AChE o BuChE disueltas en buffer fosfato salino (pH 7.5) y 50 μL del extracto alcaloidal disuelto en el mismo buffer. Se incubó las placas durante 30 minutos a una temperatura de $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se añadió 100 μL de la solución de sustrato (pH 7.5). Después de 5 minutos, se dio lectura de las absorbancias en un espectrofotómetro de microplacas a 405 nm. Se calculó la actividad inhibitoria de la enzima en porcentaje comparando con un ensayo que usa un buffer sin ningún inhibidor. Las concentraciones del extracto de alcaloides utilizadas para calcular los valores de IC_{50} fueron 1, 5, 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ en los ensayos de AChE y 50, 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g/mL}$ en los ensayos de BuChE. La galantamina, fue usada como compuesto de referencia. (Ortiz et al., 2016).

Las enzimas utilizadas fueron AChE de la anguila eléctrica *Electrophorus electricus* y BuChE de suero equino, mientras que los sustratos utilizados en cada caso fueron Yoduro de Acetiltiocolina

(ATC) y Yoduro de Butiriltiocolina (BTC). Para generar la reacción de color se utilizó ácido ditionitrobenzoico (DTNB).

2.10 Análisis de Datos

Para obtener el porcentaje de inhibición de cada concentración realizada, se procesaron las absorbancias en el programa Excel, aplicando la fórmula:

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

Donde:

M: lectura muestra

C: lectura control

BM: lectura blanco muestra

BC: lectura blanco control

2.10.1 Curva de inhibición para la determinación del IC50

La curva fue graficada relacionando la concentración del extracto alcaloidal (x) vs el porcentaje de inhibición (y), después se agregó una línea de tendencia logarítmica y con la ecuación reportada se calculó el IC50. Los resultados obtenidos son medias de 3 determinaciones individuales triplicadas.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS

3.1 Obtención del Extracto puro de alcaloides de *Phaedranassa glauciflora*

Se obtuvo un extracto purificado de alcaloides a partir de 20 g del bulbo seco y triturado de *Phaedranassa glauciflora* usando 800 mL de CH₃OH para la maceración que dio un extracto bruto el cual fue sometido a un protocolo de extracción basado en cambios de pH y solventes orgánicos dando lugar a 54,2 mg de alcaloides totales, consiguiendo así un porcentaje de rendimiento del 0,3% (Tabla 1-3). Este hallazgo no puede ser correlacionado con investigaciones anteriores de la especie, sin embargo, existen trabajos referentes a otras especies del mismo género como *Phaedranassa dubia* (Inca, 2017, p.35), que reporta un porcentaje de rendimiento del 0,2% utilizando el mismo protocolo de extracción y empleando como solvente una solución metanólica.

Tabla 1-3: Porcentaje de rendimiento de alcaloides de *Phaedranassa glauciflora*.

Extracto	Metanólico
Parte de la Planta	Bulbo de <i>P. glauciflora</i>
Volumen de Maceración	800 mL CH ₃ OH
Extracto Purificado de Alcaloides	54,2 mg
Porcentaje de Rendimiento de alcaloides (Silva, 2010, p. 106)	0,3%
$\frac{\text{Rendimiento real}}{\text{Rendimiento teórico}} \times 100$	

Elaborado por: Viviana Baldeón, 2018.

3.2 Identificación de Alcaloides mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masa

A continuación, se muestran los resultados obtenidos a través del análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) para el bulbo de *Phaedranassa glauciflora*, que ha demostrado ser una herramienta útil en la identificación de estructuras nuevas, conocidas o inusuales a partir de extractos ricos en alcaloides mediante la comparación de sus patrones de fragmentación de masa con espectros de referencia estándar en bases de datos propias. (Ortiz et al, 2016, p. 1241)

Se analizó 5,02 g secos de bulbo que corresponde a 28,06 mg de extracto rico en alcaloides de bulbo. Los porcentajes presentados son respecto a la muestra total de alcaloides purificados.

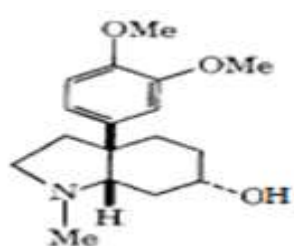
Tabla 2-3: Alcaloides identificados mediante CG-EM del extracto purificado de bulbo de *P. glauciflora*.

ALCALOIDE	Rt	RI	% TOTAL
6-epimesembranol (1)	19.589	2379.7	0.28
Mesembrina (2)	19.854	2396.5	trazas
Galantamina (3)	20.318	2427.0	<0.1
Codeína**	20.999	2472.0	8.54
Anhidrolicorina (4)	21.942	2534.3	0.25
1-O-acetilcaranina (5)	22.239	2553.9	0.18
11,12-dehidroanhidrolicorina (6)	23.487	2638.6	0.41
Hemantamina (7)	23.875	2665.7	1.19
m/z 228*a; [M =331]*b	24.912	2738.3	0.60
1-O-acetillicorina (8)	25.019	2745.8	0.61
Licorina (9)	26.087	2820.6	75.01
Sternbergina (10)	26.413	2843.4	8.66
m/z 228*a; [M =289]*b	26.849	2873.9	2.39
m/z 125*a 2-hidroxihomolicorina?	27.626	2928.3	<0.1

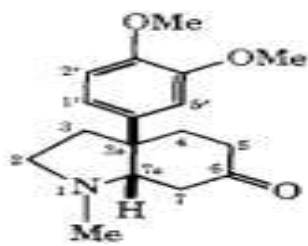
INTERPRETACIÓN: Rt (Tiempo de retención), RI (Índice de retención), % (Porcentaje de abundancia del alcaloide respecto a la mezcla total), m/z (Relación masa/carga), *a (pico base), *b (posible pico de ion molecular), ** patrón interno 0,05 mg/ml de codeína

Elaborado por: Bastidas J y Tallini L, 2018.

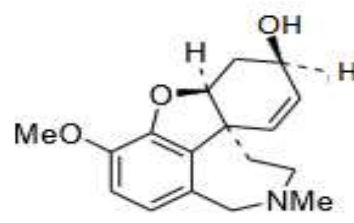
Fuente: Universitat de Barcelona



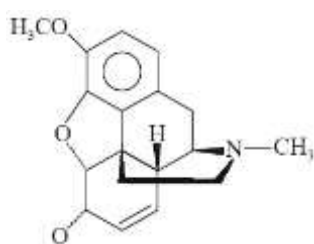
(1) 6-epimesembranol



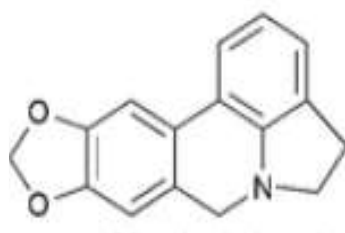
(2) mesembrina



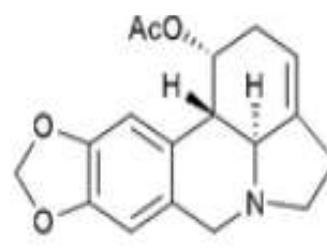
(3) galantamina



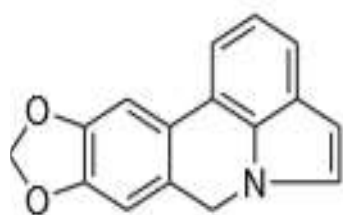
(**) codeína



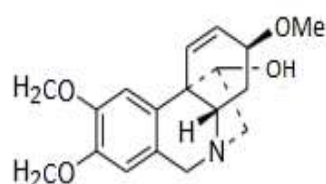
(4) anhidrolicorina



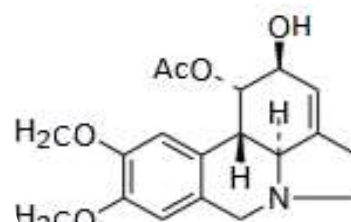
(5) 1-O-acetilcaranina



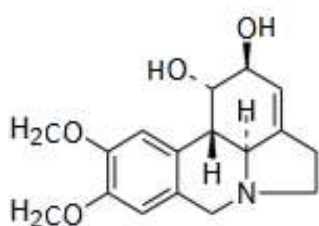
(6) 11,12-dehidroanhidrolicorina



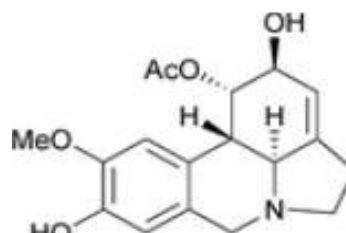
(7) hemantamina



(8) 1-O-acetillicorina



(9) licorina



(10) sternbergina

Figura. 1-3: Alcaloides identificados en *Phaedranassa glauciflora*

Fuente: (Acosta, 2014, p.182), (Zhong, 2007).

Los resultados de la CG-EM presentan un total de 10 alcaloides identificados del bulbo de *Phaedranassa glauciflora*, siendo la licorina, el alcaloide más abundante con un 75,01%. Seguido de ello, dentro de los alcaloides con abundancia significativa se encuentra sternbergina con un 8,66%. Por otro lado, existen alcaloides que presentan porcentajes menores al 2% los cuales son 6-epimesembranol, mesembrina, galantamina, anhidrolicorina, 1-O-acetilcaranina, 11,12-dehidroanhidrolicorina, Hemantamina y 1-O-acetillicorina. Cabe recalcar que también se detectaron 3 alcaloides con MS similar a los patrones de fragmentación de alcaloides que no fue posible identificar, siendo estos: (m/z 228*a; [M =331]*b, m/z 228*a; [M =289]*b, m/z 125*a 2-hidroxihomolicorina?) con una abundancia de 0,60%, 2,30% y <0,1 respectivamente. Con respecto al último compuesto, existe la posibilidad de que se trate del alcaloide 2-hidroxihomolicorina, por lo que se debe realizar un estudio complementario de la molécula con técnicas más específicas que permitan corroborar su identidad.

La presencia de los alcaloides más abundantes (Licorina y Sternbergina) tiene una importancia significativa en el ámbito biomédico tomando en cuenta los estudios previos realizados sobre estos alcaloides.

Con respecto a la licorina, estudios realizados por Lamoral-Theys et al (2009, p.6251) indican que presenta actividad antitumoral contra las células cancerígenas, siendo capaz de proporcionar un beneficio terapéutico significativo en modelos agresivos de melanoma cerebral con administraciones intravenosas y en dosis que no son tóxicas. Además, su potencial terapéutico ha sido demostrado en modelos de ratones que presentan cáncer de ovario, pulmón y leucemia. (Maomao He, 2015, p.16563). El mecanismo de la licorina frente a la leucemia muestra que puede suprimir el ciclo de crecimiento celular e inducir apoptosis en las células tumorales. (Bastida, J. et al, 2001, p. 156).

Este alcaloide posee actividad inhibitoria apreciable contra la acetilcolinesterasa que interactúa con el subsitio aniónico de la enzima, gracias a los dos grupos hidroxilo libres presentes en su estructura. Esta misma estructura tiene parecidos con los esqueletos de morfina y codeína, por lo que se le atribuye una actividad analgésica, inclusive mayor a la aspirina (Bastida, J. et al, 2001, p. 156). También tiene una acción antiarrítmica mediada por la estimulación de receptores b-adrenérgicos (Abdalla S et al, 1993, citados en Bastida, J. et al, 2001, p. 158), acción antiviral relacionada con su anillo de hexahidroindol con dos grupos hidroxilo funcionales y un mecanismo de acción que bloquea la actividad de la ADN polimerasa viral, inhibiendo la multiplicación del virus, además de presentar actividades antiinflamatoria (McNulty et al., 2009, p.914), antiplaquetaria, antifúngica contra *Candida albicans* y antiparasitaria contra *Encephalitozoon intestinalis*. (Bastida, J. et al, 2001, p. 158) y *Plasmodium falciparum* (Osorio, E. et al, 2006, p. 72).

La sternbergina es un alcaloide de tipo licorina que ha reportado actividad antitumoral pero desafortunadamente, es tóxico para el modelo celular normal, aunque el balance actividad/toxicidad no es tan negativo como en otros alcaloides de esta serie. (Bergoñón. S., 1994, pp. 175, 184).

En referencia a los alcaloides presentes en menor abundancia, diversos estudios indican que la hemantamina muestra una actividad antiinflamatoria mayor que la indometacina (AINE) (Çitoğlu et al, 1998, p.206), una actividad antineoplásica moderada sobre la leucemia de Rauscher, relacionada con la presencia de un hidroxilo en la posición 11 de su estructura (Bergoñón. S., 1994, pp. 189) y un efecto antimalárico contra *Plasmodium falciparum*. (Sener et al, 2003, p.1220).

Galantamina es un compuesto exclusivo de Amaryllidaceae, inhibidor competitivo, reversible, de acción prolongada y altamente selectivo de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y en menor proporción de butirilcolinesterasa (BuChE), usado actualmente como una potente herramienta para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. (Ortiz et al, 2016, p. 1241). Produce efectos beneficiosos inclusive después de que el tratamiento farmacológico haya culminado. Busca disminuir la actividad de AChE, aumentando así la concentración de acetilcolina y por la transmisión sináptica, de tal manera que los procesos cognitivos y los estímulos musculares mejoran, dando como resultado una mejora en la calidad de vida de los pacientes con Alzheimer. (Castellanos, F., 2014, p. 5). También presenta otras acciones farmacológicas notables como la capacidad de aliviar el síndrome de la fatiga, la impotencia masculina y la dependencia del alcohol, muestra un poder analgésico tan fuerte como la morfina, tiene efecto hipotensor, actividad antimalárica débil y se ha patentado para su uso en el tratamiento de la dependencia de la nicotina. (Bastida, J., et al, 2006, pp. 161 - 162).

Anhidrolicorina es un alcaloide derivado de la licorina, que tiene varias propiedades biológicas, como la inhibición de la biosíntesis del ácido ascórbico, actividad antibacteriana y actividad antitumoral significativa. Lamentablemente, debido a la baja solubilidad que presenta, su desarrollo y aplicación han sido limitadas. (Guo, Y., et al., 2016, p.3).

3.3 Aplicación del método modificado de Ellman et al. para la determinación de la Actividad Inhibitoria de colinesterasas AChE y BuChE.

3.3.1 Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Phaedranassa glauciflora* sobre Acetilcolinesterasa.

Primera Fase

En esta fase, se realizó un screening que permitió definir las concentraciones apropiadas que se deben utilizar para el ensayo de inhibición de AChE, de tal manera que al trazar la curva los datos puedan acoplarse adecuadamente y se obtenga una ecuación que permita calcular el IC50.

El *screening* se desarrolló con 4 concentraciones de 1, 10, 50 y 100 µg/mL que permitieron monitorear la actividad inhibitoria, obteniendo los resultados que se muestran a continuación (Tabla 3-3):

Tabla 3-3: Porcentajes de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *P. glauciflora*.

Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentajes de Inhibición de AChE
1	4,01 ± 1,09
10	17,33 ± 1,20
50	50,66 ± 1,20
100	66,13 ± 1,22

Elaborado por: Viviana Baldeón, 2017

Los resultados presentados en la Tabla 3-3 indican que el máximo porcentaje de inhibición que tiene el extracto alcaloidal de *P. glauciflora* es de 66% a una concentración de 100 µg/mL. Las concentraciones más bajas de 50, 10 y 1 µg/mL presentaron una inhibición de 50, 17 y 4% respectivamente. Con estos valores obtenidos se pueden agregar 2 concentraciones más encontradas por encima y por debajo de 50 µg/mL para ajustar la curva de regresión y determinar el IC50. (Álvarez et al, 2008, p.168)

Una vez agregadas las dos concentraciones necesarias para elaborar la curva de regresión, se muestra a continuación los porcentajes de inhibición obtenidos en cada concentración (Tabla 4-3):

Tabla 4-3: Porcentajes de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *P. glauciflora*.

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentajes de Inhibición de AChE
1	$3,72 \pm 0,89$
5	$12,76 \pm 0,22$
10	$25,32 \pm 0,22$
20	$37,76 \pm 1,78$
50	$54,62 \pm 0,33$
100	$67,50 \pm 0,33$

Elaborado por: Viviana Baldeón, 2017

En este segundo screening, se puede observar que la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ presenta un porcentaje de inhibición máximo de 67,5%. Estos valores indican el comportamiento que tiene el extracto alcaloidal frente a la enzima AChE y se logró obtener dos valores por encima del 50% de promedio de inhibición y dos valores inferiores a este, lo que permite validar el ensayo de acuerdo al método aplicado. (López et al., 2002).

Segunda Fase

En esta etapa, se evaluó la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Phaedranassa glauciflora* sobre acetilcolinesterasa. Este ensayo fue realizado en una microplaca por triplicado, durante 3 días consecutivos, evaluando el compuesto de referencia galantamina y el extracto alcaloidal al mismo tiempo. Con los resultados obtenidos se pudo calcular el IC_{50} el cual expresa la concentración que se necesita para inhibir la enzima AChE en un 50%.

El cálculo del IC_{50} se lo realizó a partir de los valores obtenidos en la ecuación de la recta que analiza las concentraciones del extracto frente a los porcentajes de inhibición (Ver Anexo G, Gráficos 1, 2 y 3) obteniendo los siguientes resultados, expresados como la media de 3 repeticiones consecutivas (Tabla 5-3):

Tabla 5-3: Actividad Inhibitoria del extracto alcaloidal de *P. glauciflora* sobre de AChE expresada como IC₅₀.

	IC ₅₀ µg/mL Acetilcolinesterasa (AChE)
<i>P. glauciflora</i>	39,94 ± 5,09 R ² = 0,98
Galantamina*	0,30 ± 0,01 R ² = 0,99

Los resultados son la media de 3 repeticiones, *compuesto de referencia.

Elaborado por: Viviana Baldeón, 2017

Los resultados de la Tabla 5-3, indican que el extracto alcaloidal del bulbo de *Phaedranassa glauciflora* presenta una actividad inhibitoria media frente a acetilcolinesterasa con un IC₅₀ de 39,94 ± 5,09 µg/mL en comparación al control positivo galantamina que muestra un IC₅₀ de 0,30 ± 0,01 µg/mL y a otros extractos de especies de Amaryllidaceae.

Este resultado se correlaciona con el perfil de alcaloides identificados mediante CG-EM que demuestra la presencia alcaloides activos (los de tipo licorina y galantamina) que inhiben la acetilcolinesterasa, lo que explica la actividad del extracto en esta especie, pero al tener como alcaloide principal la licorina, el cual es un metabolito con débil actividad inhibitoria, el resultado se expresa acorde a lo mencionado.

No existe evidencia bibliográfica específicamente de la especie *Phaedranassa glauciflora* con la que se pueda comparar los resultados obtenidos, pero existen estudios realizados por Inca, A. (2017, p. 46) sobre *Phaedranassa dubia* que muestra un IC₅₀ de 25,48 ± 0,39 µg/mL y por Salazar C. (2017, p. 51) sobre *Phaedranassa cinerea* con un valor de IC₅₀ de 37.60 ± 0.09 µg/mL, que permiten evidenciar que el género *Phaedranassa* tiene una actividad inhibitoria media frente AChE. Ante la ausencia de mayor evidencia concluyente, es pertinente la realización de más estudios de este género para confirmar este resultado. Cabe recalcar que las tres especies estudiadas son endémicas de Ecuador.

Por otro lado, se han realizado varios estudios sobre amarilidáceas que reportan la misma actividad, como *Phycell herbertiana* y *Rhodophiala mendocina*, que indican valores altos de inhibición de AChE con un IC₅₀ de 1.2 ± 0.12 µg / ml y de 2.0 ± 0.15 µg/mL, respectivamente. (Ortiz *et al.*, 2012, p. 13475).

Especies como *Hippeastrum argentinum* (IC₅₀ de 50.2 ± 0.12 µg/mL) y *Narcissus bujei* (IC₅₀ de 34.76 ± 0.32 µg/mL) presentan valores de inhibición media (Ortiz *et al.*, 2016, p. 1244) (López, S., *et al.*, 2002, p. 2527), y por último la especie *Crinum zeylanicum* indica una actividad inhibitoria baja

exhibiendo un IC₅₀ de 70,22 ± 0,24 µg/mL. Todos estos datos permiten corroborar que *P. glauciflora* a pesar de tener una débil afinidad por la enzima acetilcolinesterasa, presenta una actividad inhibitoria significativa.

3.3.2 Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Phaedranassa glauciflora* sobre Butirilcolinesterasa.

Primera Fase

Aplicando el mismo principio del apartado anterior, se establecieron 4 concentraciones que permitieron monitorear la actividad inhibitoria del extracto de *P. glauciflora* sobre BuChE y de esta manera evaluar el comportamiento del extracto en función a los porcentajes de inhibición que presenta cada concentración. Los resultados se muestran a continuación (Tabla 6-3):

Tabla 6-3: Porcentajes de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *P. glauciflora*.

Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentajes de Inhibición de BuChE
10	1,64 ± 1,27
50	14,73 ± 0,68
100	26,79 ± 1,58
200	48,41 ± 0,54

Elaborado por: Viviana Baldeón, 2017

Al analizar los resultados, se encuentra que el mayor porcentaje de inhibición de BuChE que presenta el extracto es de 48%. Se tiene por objetivo conseguir valores entre 1 y 100 % de inhibición, por lo que se debe aumentar las concentraciones del extracto ya que la máxima concentración de 200 µg/mL tiene una inhibición menor al 50%.

La Tabla 7-3, muestra a continuación los porcentajes de inhibición obtenidos al aumentar la concentraciones del extrato de *P. glauciflora*, tomando ya como referencia los 6 valores necesarios para realizar la curva de regresión (50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL).

Tabla 7-3: Porcentajes de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *P. glauciflora*.

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentajes de Inhibición de BuChE
50	14,61 \pm 0,39
100	27,23 \pm 0,39
200	42,70 \pm 0,79
300	52,84 \pm 0,90
400	61,43 \pm 1,28
500	68,99 \pm 1,04

Elaborado por: Viviana Baldeón, 2017

Una vez realizado el segundo screening, se puede observar que la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ presenta un porcentaje de inhibición máximo de 69%. De acuerdo a Ortiz, et al (2016), si la concentración del extracto tiene valores superiores a 200 $\mu\text{g/mL}$, se considera inactivo frente a la enzima. No obstante, estos valores indican el comportamiento que tiene el extracto alcaloidal frente a la enzima BuChE y a partir de estos se puede trazar la curva de regresión y obtener el IC_{50} .

Segunda Fase

De la misma manera, se ejecutó el ensayo de inhibición enzimática en una microplaca por triplicado en 3 días consecutivos, evaluando el compuesto de referencia galantamina y el extracto alcaloidal al mismo tiempo. Con los resultados se calculó el IC_{50} que exhibió la concentración necesaria para inhibir la enzima BuChE en un 50%.

La Tabla 8-3 indica los resultados obtenidos, expresados como la media de 3 repeticiones consecutivas:

Tabla 8-3: Actividad Inhibitoria del extracto alcaloidal de *P. glauciflora* sobre de BuChE expresada como IC_{50}

	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$ Butirilcolinesterasa (BuChE)
<i>P. glauciflora</i>	323,62 \pm 3,51 $R^2= 0,94$
Galantamina*	5,67 \pm 0,08 $R^2= 0,98$

Los resultados son la media de 3 repeticiones, *compuesto de referencia.

Elaborado por: Viviana Baldeón, 2017

Con respecto al resultado de la inhibición del extracto alcaloidal de *P. glauciflora* sobre butirilcolinesterasa, se obtuvo un IC_{50} de $323,62 \pm 3,51 \mu\text{g/mL}$ siendo un valor mucho mayor al compuesto de referencia galantamina (IC_{50} $5,67 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$). Al haber utilizado concentraciones del extracto mayores a $200 \mu\text{g/mL}$, que son inactivos frente a la enzima (Ortiz, et al, 2016), se puede evidenciar claramente el valor elevado del IC_{50} , lo que indica que la especie *P. glauciflora* no logra inhibir el 50% de la enzima BuChE.

Las únicas referencias bibliográficas encontradas para este género con las que se puede realizar una comparación de la actividad, son estudios de la especie *Phaedranassa dubia* que indica una débil inhibición de BuChE, con un IC_{50} de $114,96 \pm 4,94 \mu\text{g/mL}$ (Inca, A., 2017, p.46) y de la especie *Phaedranassa cinérea* que presenta un IC_{50} de $108.50 \pm 8.98 \mu\text{g/mL}$ (Salazar, C., 2017, p. 52). Estos valores nos indican que los alcaloides presentes en las especies del género *Phaedranassa* tienen poca afinidad por la butirilcolinesterasa y su actividad inhibitoria es baja.

Por otro lado, existen estudios de otros géneros de Amaryllidaceae que presentan actividad inhibitoria significativa con respecto a butirilcolinesterasa, como lo son *Nerine filamentosa* que muestra un IC_{50} de $13.0 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$ y *Narcissus poeticus* un IC_{50} de $23,0 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$ (Cahlíková et al., 2012, p.571), valores muy cercanos al rango que reporta el compuesto de referencia galantamina (entre 14 y $22 \mu\text{g/mL}$) (Ortiz, et al, 2015), evidenciando así una alta actividad inhibitoria.

La importancia de esta enzima, recae en su capacidad de sustituir la acetilcolinesterasa inhibida en forma temporal e hidrolizar la acetilcolina que este acumulada (Walsh et al., 2011, p.1231), por lo que la búsqueda científica de más plantas del género *Nerine* y *Narcissus* pueden conseguir potenciales agentes inhibidores de butirilcolinesterasa utilizados en la enfermedad de Alzheimer.

CONCLUSIONES

- Se realizó la extracción de alcaloides de la especie *Phaedranassa glauciflora*, a través de un protocolo basado en cambios de pH, obteniendo un extracto bruto de alcaloides con un rendimiento de 0,3%.
- Se identificaron 10 alcaloides del extracto del bulbo *Phaedranassa glauciflora* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa, teniendo la licorina como el alcaloide mayoritario con 75,01%, seguido de sternbergina 8,66%. En menor abundancia se detectaron alcaloides de tipo licorina y galantamina.
- Se aplicó el método de Ellman et al con modificaciones, para el estudio de inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, teniendo en cuenta las condiciones establecidas por el ensayo, lo que permite concluir que la modificación de cualquiera de estas condiciones, ya sea temperatura, tiempos de lectura, preparación de reactivos o modo de pipeteo puede influir negativamente en los resultados.
- El extracto alcaloidal de *Phaedranassa glauciflora* presentó una actividad inhibitoria baja sobre acetilcolinesterasa y escasa sobre butirilcolinesterasa expresado en un IC_{50} de $39,94 \pm 5,09$ $\mu\text{g/mL}$ para AchE y un IC_{50} de $323,62 \pm 3,51$ $\mu\text{g/mL}$ para BuChE, ambos valores superiores al compuesto de referencia galantamina que dio un IC_{50} de $0,30 \pm 0,01$ $\mu\text{g/mL}$ y un IC_{50} de $5,67 \pm 0,08$ $\mu\text{g/mL}$ para AChE y BuChE, respectivamente, lo que evidencia la débil afinidad que presenta el extracto por ambas enzimas.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar más investigaciones farmacológicas de las especies pertenecientes al género *Phaedranassa* puesto que los alcaloides que presenta tienen potenciales actividades antitumoral y antiinflamatoria, pudiendo obtenerse nuevos fármacos destinados a tratar cáncer de ovario, pulmón, leucemia, entre otros.

Es recomendable realizar estudios complementarios con técnicas analíticas más avanzadas para la identificación de las moléculas que no fueron reconocidas en la CG-EM, con el objetivo de conocer su estructura y poder estudiar sus actividades farmacológicas, tomando en cuenta su toxicidad.

Desarrollar estudios de toxicidad de los alcaloides de la especie *Phaedranassa glauciflora* puesto que es un parámetro muy importante que debe ser analizado a profundidad debido al potencial farmacológico que tienen los metabolitos de esta especie y su bibliografía es muy limitada.

BIBLIOGRAFÍA

ABDALLA, et al. "Alkaloids of *Sternbergia clusiani* and effects of lycorine on guinea-pig isolated pulmonary artery and heart". *Fitoterapia Milano*, nº 64 (1993), pp. 518-518.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. [En línea] Estados Unidos: Alzheimer's Disease Facts and Figures, 2017. [Consulta: 19 enero 2018]. Disponible en: <https://www.alz.org/>

ACOSTA, KAREN. "Identificación de los Alcaloides de *Stenomesson aurantiacum* (Kunth) Herb." [En línea] (Tesis). (Maestría). Universitat de Barcelona, España. 2013. pp. 1-34 [Citado el 24 julio 2017]. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1541/1/T-SENESCYT-00674.pdf>

ACOSTA, K, et al. "Identification of the Alkaloids of *Stenomesson Aurantiacum* (Kunth) Herb, an Amaryllidaceae Species from the Ecuadorian Andes." *Pharmacology on Line* [en línea]. 2014, (España), 12(3), pp. 205-206. [Consulta: 21 enero 2018]. Disponible en: http://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2014/vol3/PhOL_2014_3_A025_Acosta_178_025.pdf

ASAMBLEA NACIONAL DEL ECUADOR. [En línea] Ecuador: Alzheimer en el Ecuador, 2014. [Citado el 24 de julio de 2017]. Disponible en: <http://www.asambleanacional.gob.ec/es/noticia/en-ecuador-mas-de-100-mil-personas-sufren-de-alzheimer-y>

BASTIDA, J; LAVILLA, R; Y VILADOMAT, F. "Chemical and Biological Aspects of Narcissus Alkaloids". Ámsterdam-Holanda: Scientific, Elsevier, 2006, pp. 87-179.

BASTIDA, J., Y VILADOMAT, F. *Alkaloids of Narcissus. Narcissus And Daffodil: The Genus Narcissus.* [En línea]. Reino Unido, Inglaterra: Taylor and Francis, 2002. [Consulta: 24 julio 2017]. Disponible en: <http://www.e-agriculture.biz/download/Cultures/Narcissus%20and%20Daffodil%20-%20The%20Genus%20Narcissus.pdf>

BERGOÑÓN, SALVADOR. "Aislamiento y caracterización química de alcaloides del tipo Amaryllidaceae. Producción de galantamina por cultivos "in vitro" de *Narcissus confusus*." [En línea] (Tesis). (Ph.D). Universitat de Barcelona, España. 1994. pp. 1 - 292 [Citado el 21 enero 2018]. Disponible en:

http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/2629/02.SBF_2de2.pdf?sequence=2

CAHLÍKOVÁ, et al. "Alkaloids from Some Amaryllidaceae Species and Their Cholinesterase Activity". *Natural Product Communications* [En línea], 2012, (República Checa) vol. 7(5), pp.571-574. [Consulta: 21 enero 2018]. ISSN 1934578X. Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84861493826&partnerID=tZOtx3y1>

CABEZAS et al. "Análisis del contenido Alcaloidico de *Caliphruria Subedentata* Baker (Amaryllidaceae) por el método CG-EM". *Revista Latinoamericana de de Química* [En línea], 2013, (Colombia) 41(1), pp. 68-73. [Consulta: 21 julio 2017]. ISSN 0370-5943. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rlq/v41n1/v41n1a6.pdf>

CASTELLANOS, FABIO. "Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano." [En línea] (Tesis). (Máster). Universidad Nacional de Colombia, Colombia. 2014. pp. 1 - 91 [Citado el 21 enero 2018]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/39404/1/FabioAndresCastellanosC.2014.pdf>

CATALOGUE OF LIFE: 30TH JANUARY 2018 [en línea]. Países Bajos: Naturalis Biodiversity Center, 2018. [Consulta: 19 enero 2018]. Disponible en: <http://www.catalogueoflife.org/col/search/all>

CARRETERO, M. "Los Inhibidores de la Acetilcolinesterasa en el Tratamiento del Alzheimer." *Offarm* [en línea], 2003, (España), 22 (7), pp. 114 - 115. [Consulta: 24 julio 2017]. ISSN 1578-1569. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-inhibidores-acetilcolinesterasa-el-tratamiento-13050017>

CARRETERO, M. "Galantamina" *Offarm* [en línea], 2003, (España), 22, pp. 140 - 142. [Consulta: 24 julio 2017]. ISSN 1578-1569. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-galantamina--13051501>

ÇITOĞLU, G., et al. "Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine". *Phytotherapy Research* [en línea], 1998, (Estados Unidos), 12 (3), pp. 205 - 206. [Consulta: 21 enero 2018]. ISSN 1099-1573. Disponible en: [p onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199805\)12:3<205::AID-PTR203>3.0.CO;2-7/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1099-1573(199805)12:3<205::AID-PTR203>3.0.CO;2-7/abstract)

ELGORASHI, E., et al. "Quantitative Structure–Activity Relationship Studies on Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitory Effects of Amaryllidaceae Alkaloids". South African Journal of Botany [en línea], 2006, (Sudáfrica) , 72, pp. 224–231. (Consulta 25 julio 2017) ISSN 1727 - 9321. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629905000335>

ELISHA, I. L., et al. "Acetylcholinesterase inhibitory effects of the bulb of *Ammocharis coranica* (Amaryllidaceae) and its active constituent lycorine." South African Journal of Botany [en línea], 2013, (Sudáfrica), 85, pp. 44–47. Consulta: 25 julio 2017]. ISSN 1727-9321. Disponible en: https://ac.els-cdn.com/S0254629912001834/1-s2.0-S0254629912001834-main.pdf?_tid=c26abdae-0b94-11e8-ac83-00000aacb35d&acdnat=1517959598_1cde4f82c999891baf1bdc97e41fe6e6

ELLMAN, G. et al. "A New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". Biochemical Pharmacology [En línea], 1961, (Estados Unidos) 7(2), pp. 88-95. [Consulta 21 enero 2018]. ISSN 00062952. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>.

FONTÁN, L. "La Enfermedad de Alzheimer: elementos para el diagnóstico y manejo clínico en el consultorio". Biomedicina [en línea], 2012, (Uruguay), 7(1), pp. 34–43. [Consulta: 25 julio 2017]. ISSN 1510-9747. Disponible en: <http://www.um.edu.uy/docs/alzheimer.pdf>

FLORES M Y SEGURA J. "Estructura y Función de los Receptores Acetilcolina de Tipo Muscarínico y Nicotínico". Revista Mexicana de Neurociencia [en línea], 2005, (México) 6(4), pp. 315–326. [Consulta: 25 julio 2017] ISSN 1405-0242. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmexneu/rmn-2005/rmn054f.pdf>

GROSSBERG, G. T. 2003. "Cholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease : Getting on and Staying on". Current Therapeutic Research [en línea], 2003, (Países Bajos), 64(4), pp. 216–235. [Consulta: 25 julio 2017] ISSN 1879-0313 . Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24944370>

GUO, Y. et al. "Inclusion complexes of anhydrolycorine with cyclodextrins: Preparation, characterization, and anticancer activity." *Canadian Journal of Chemistry*, n°. 94 (2016), (China) pp. 1-32.

GUTIERREZ, M. Y DROGUET M. "La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas: Identificación de Compuestos causantes de mal olor". Boletín INTEXTER [en línea], 2002, (España), 122, pp. 35–41. [Consulta: 25 julio 2017]. Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf>

INCA BENÍTEZ, A. "Determinación de la actividad inhibitoria de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia*". [en línea] (Tesis). (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2017. pp. 35. [Consulta: 15 enero 2018]. Disponible en: <http://dspace.espech.edu.ec/bitstream/123456789/7927/1/56T00742.pdf>

LAMORAL-THEYS, D. et al. "Lycorine, the Main Phenanthridine Amaryllidaceae Alkaloid, Exhibits Significant Antitumor Activity in Cancer Cells That Display Resistance to Proapoptotic Stimuli: An Investigation of Structure-Activity Relationship and Mechanistic Insight". *Journal of Medicinal Chemistry* [en línea], 2009, 52 (20), pp. 6244–6256. [Consulta: 21 enero 2018]. ISSN 1520-4804. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm901031h>

LISTON, D. R., et al. "Pharmacology of selective Acetylcholinesterase Inhibitors: Implications for use in Alzheimer's Disease". *European Journal of Pharmacology* [en línea], 2004, (Países Bajos), 486(1), pp. 9–17. [Consulta: 23 julio 2017] ISSN 1879-0712. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14751402>

LÓPEZ, S. et al. "Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Amaryllidaceae Alkaloids and *Narcissus* Extracts". *Life Sciences* [en línea], 2002, (Países Bajos), 71, pp. 2521–2529. [Consulta: 23 julio 2017]. ISSN 0024-3205. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320502020349>

MAOMAO HE, et al., " Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids". *RSC Advances* [en línea], 2015, (Reino Unido), 5, pp. 16562–16574. [Consulta: 21 enero 2018]. ISSN 2046-2069. Disponible en: <http://pubs.rsc.org/-/content/articlelanding/2015/ra/c4ra14666b/unauth#!divAbstract>

MARTÍNEZ, P. et al. *Alzheimer, una enfermedad compartida* [en línea]. Know Alzheimer: 2017. Síntomas del Alzheimer, p. 8, módulo 1. [Consulta: 25 julio 2017]. Disponible en:

content/uploads/2017/01/Curso_Cuidadores_Alzheimer_completo.pdf

MCNULTY, J. et al. "Structure-Activity Studies on Acetylcholinesterase Inhibition in the Lycorine Series of Amaryllidaceae Alkaloids". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* [en línea], 2010, 20(17), pp. 5290–5294. [Consulta: 25 julio 2017]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X10009170>

MEEROW, A; & SNIJMAN, D. "Amaryllidaceae. Kubitzki, K. The families and genera of vascular plants. Flowering plants monocotyledons. Liliaceae (except Orchidaceae)". Springer - Veriag, vol. 3 (1998), pp. 83-110.

MEEROW A. W. Amaryllidaceae. Flora of Ecuador. [en línea] 1990. University of Gotenborg; Riksmuseum, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Goteborg, Stockholm: Harling & Andersson. 41(1), p. 1-52. [Consulta: 21 enero 2018]. Disponible en: http://www.inbio.ac.cr/papers/manual_plantas/Textos%20revisados/AMARYESP.htm

MEEROW, A., et al. "Two new species of endemic Ecuadorean Amaryllidaceae (Asparagales, Amaryllidaceae, Amarylloideae, Eucharideae)". *Phyto Keys*. [En línea], 2015, (Bulgaria), 48(4399), pp. 1-9. [Consulta: 21 enero 2018]. ISSN 1314-2003. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25931969>.

MINGA, D., et al. "A New Species of *Phaedranassa* (Amaryllidaceae) from Ecuador". *Phytotaxa* [En línea], 2015, (Ecuador), 192(1), pp. 50-53. [Consulta: 21 enero 2018]. Disponible en: <https://www.biotaxa.org/Phytotaxa/article/view/phytotaxa.192.1.6/11340>

MINGA, D., et al. "*Descubriendo la flor del Amancay de Cuenca*" [en línea]. Herbario Azuay, Universidad del Azuay, 2015. Cuál es la identidad de la flor del Amancay. [24 julio 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Danilo_Minga/publication/285590113_Descubriendo_la_flor_del_Amancay_de_Cuenca/links/5660ba1708ae4931cd599a39.pdf

OLEAS, NORA. "Landscape Genetics of *Phaedranassa* Herb. (Amaryllidaceae) In Ecuador." [En línea] (Tesis). (Ph.D). Florida International University, Estados Unidos. 2003. pp. 1 - 114 [Citado el 24 de julio de 2017]. Disponible en: <http://digitalcommons.fiu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1538&context=etd>

ORTIZ, J. E. ET AL. "Wild Argentinian Amaryllidaceae, A new Renewable Source of The

Acetylcholinesterase Inhibitor Galanthamine and other Alkaloids ". *Molecules* [en línea], 2012, (Argentina) 17, pp. 13473–13482. [Consulta: 21 enero 2018]. ISSN 1420-3049. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23149565>

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], 2016, (Argentina) 79 (5), pp. 1241 - 1248. [Consulta: 21 enero 2018]. ISSN 15206025. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jnatprod.5b00785>

OSORIO, D. E. et al. "Alkaloidal Natural Products With Antiprotozoal Activity". *VITAE* [en línea], 2006, (Colombia) 13 (1), pp. 61 - 84. [Consulta: 21 enero 2018]. ISSN 0121-4004. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/1698/169813260009/>

OSORIO, EDISON. "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] (Tesis). (Ph.D). Universidad de Barcelona, España. 2008. pp. 1 - 168 [Citado el 24 de julio de 2017]. Disponible en: http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2618/EJOD_TESIS.pdf

PACIFIC BULT SOCIETY. [En línea] Estados Unidos: *Phaedranassa Cinérea, P. Dubia, P. Lehmanni, P. Tunguraguae, P. Schizantha, P. Viridiflora Amaryllidaceae*, 2016. [Consulta 24 julio 2017]. Disponible en: <http://pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Phaedranassa>

RED LIST. [En línea] Reino Unido: *Phaedranassa glauciflora*, 2003. [Consulta 24 de julio 2017]. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/details/42811/0>

ROMANO, F. et al. "Enfermedad de Alzheimer". *Revista de Posgrado de La VIª Cátedra de Medicina* [En línea], 2007,(Argentina), 175, pp. 9 - 12. [Consulta: 24 julio 2017]. ISSN 1515-8764. Disponible en: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/37218372/3_175.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1517731463&Signature=6qp9qzZEK0jTc1ap0e0dqi cGzrE%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DENFERMEDAD_DE_ALZHEIMER.pdf

RØNSTED, N. et al. "Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of amaryllidaceae". *BMC Evolutionary Biology* [En línea], 2012, (Reino Unido), 12(182), pp. 1 - 12. [Consulta: 24 julio 2017]. ISSN 1471-2148. Disponible en:

<https://bmcevolbiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2148-12-182?site=bmcevolbiol.biomedcentral.com>

SENER, B., et al. "Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae". *Phytotherapy Research* [En línea], 2003, (Turqía), 17(10), pp. 1220-1223. [Consulta: 21 enero 2018]. PMID: 14669261. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14669261>

SILVA PONCE, C. Cuantificación de los alcaloides de *Berberis hallii* "Carrasquilla" sector La Josefina San Isidro del cantón Guano provincia de Chimborazo. [en línea] (Tesis). (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2010. pp. 106. [Consulta: 15 enero 2018]. Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/695/1/56T00225.pdf>

SINGH, M., et al. "Acetylcholinesterase Inhibitors as Alzheimer Therapy: From Nerve Toxins to Neuroprotection". *European Journal of Medicinal Chemistry* [En línea], 2013. (Francia), 70, pp. 165–188. (Consulta: 24 julio 2017) ISSN 1768-3254. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523413006314>

THE NEW YORK BOTANICAL GARDEN. [En línea] Estados Unidos: *Phaedranassa glauciflora.*, 2017. [Consulta 24 de julio de 2017]. Disponible en: http://sweetgum.nybg.org/science/vh/specimen_list.php?SummaryData=phaedranassa+glauciflora

VÁSQUEZ L Y OSORIO J. "Variación de la Actividad de la Enzima Butirilcolinesterasa en Usuarías de Anticonceptivos Hormonales". *Anales de la Facultad de Medicina* [en línea], 2000, (Perú) 61, pp. 271-277. (Consulta 21 julio 2017). ISSN 1025-5583. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/4362>

VIEGAS et al. "New antialzheimer drugs from biodiversity: the role of the natural acetylcholinesterase inhibitors". *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [en línea], 2005, (Países Bajos), 5(10), pp. 915–926. (Consulta 24 julio 2017). ISSN 1875-5607. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16250834>

ZHONG J. "Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids". *Natural Products Reports* [en línea], 2007, (Reino Unido), 24, pp. 886–905. [Consulta: 21 enero 2018]. ISSN 1460-4752. Disponible en: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2007/np/b502163b/unauth#!divAbstract>

ANEXOS

ANEXO A: Recolección de la especie *Phaedranassa glauciflora*, Alausí – Chimborazo.



Especie vegetal *Phaedranassa glauciflora* recolectada en estado de floración.

ANEXO B: Acondicionamiento del material vegetal



Limpieza y cortado de los bulbos para proceder a secar.

ANEXO C: Obtención del Extracto Crudo



Sonificación y Filtración del Extracto Crudo de *Phaedranassa glauciflora* Meerow

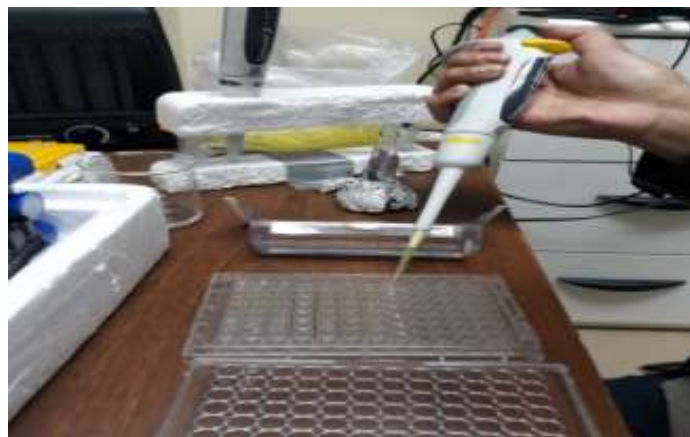
ANEXO D: Extracción de Alcaloides de *Phaedranassa glauciflora* Meerow



ANEXO E: Obtención del Extracto de alcaloides totales de *Phaedranassa glauciflora* Meerow.



ANEXO F: Evaluación de la actividad inhibitoria enzimática



Ensayo de inhibición enzimática establecido por Ellman et al. con modificaciones.

ANEXO G: Curvas de inhibición de acetilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *P. glauciflora* Meerow para el cálculo del IC50, realizadas en 3 días consecutivos.

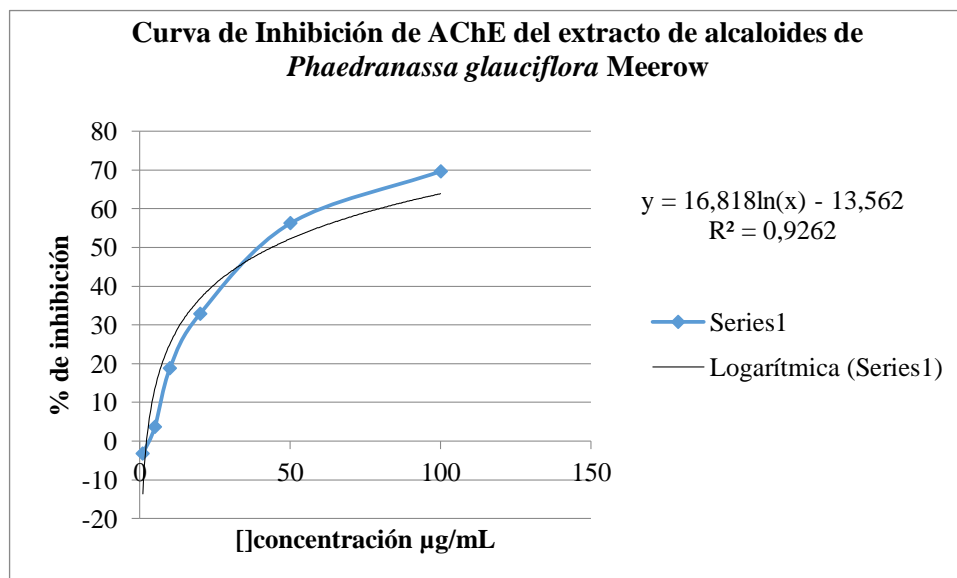


Gráfico 1. Ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal. Primer día.

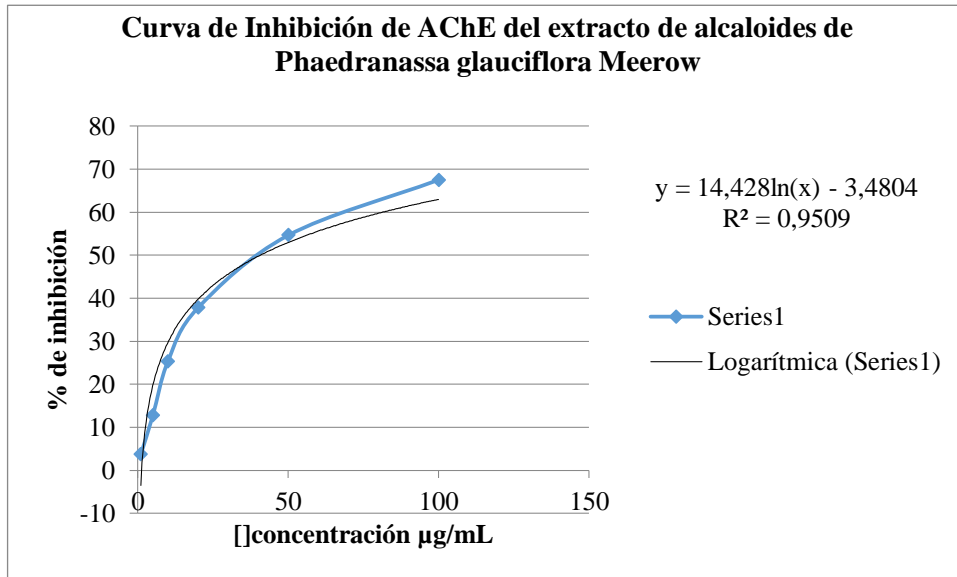


Gráfico 2. Ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal. Segundo día.

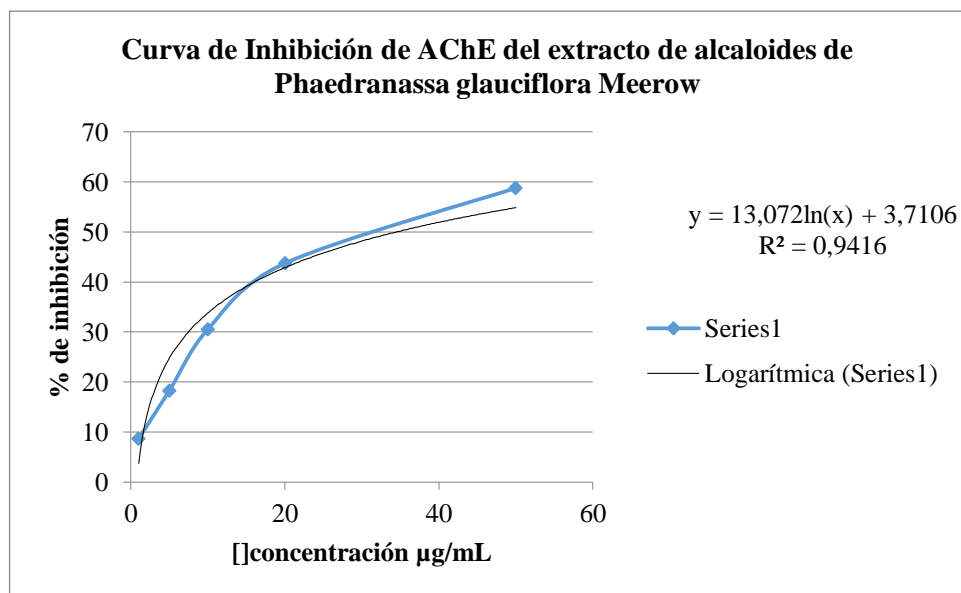


Gráfico 3. Ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal. Tercer día.

ANEXO H: Curvas de inhibición de butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *P. glauciflora* Meerow para el cálculo del IC50, realizadas en 3 días consecutivos.

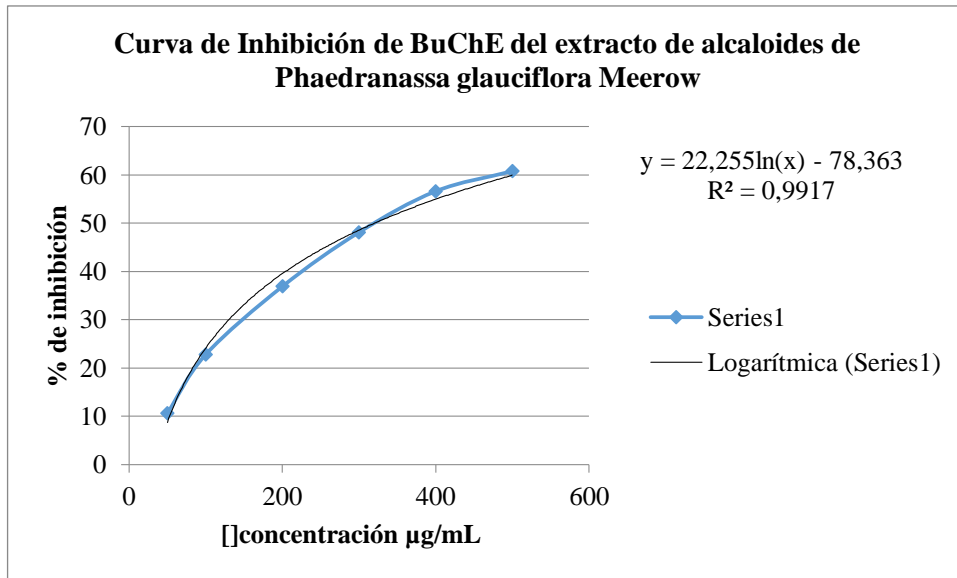


Gráfico 4. Ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal. Primer día.

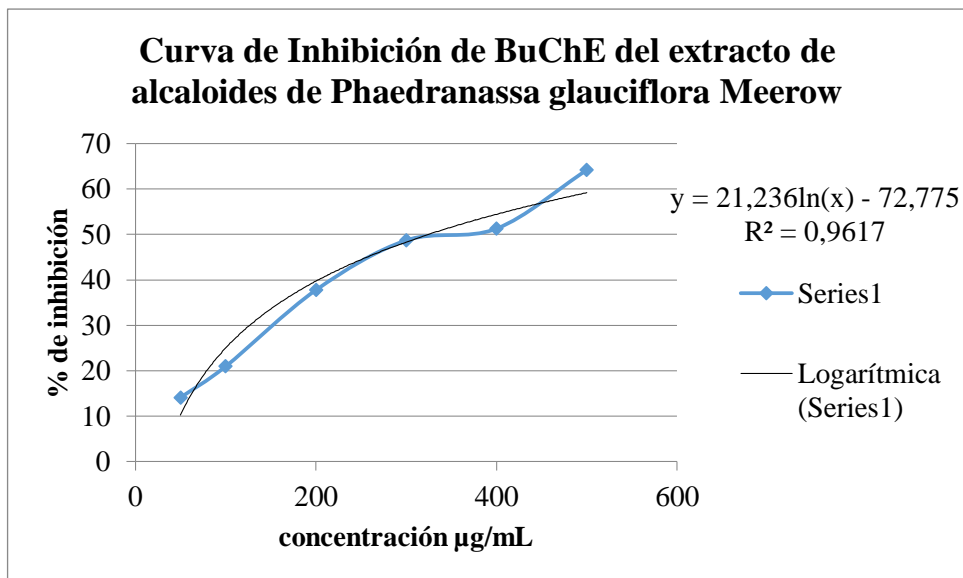


Gráfico 5. Ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal. Segundo día.

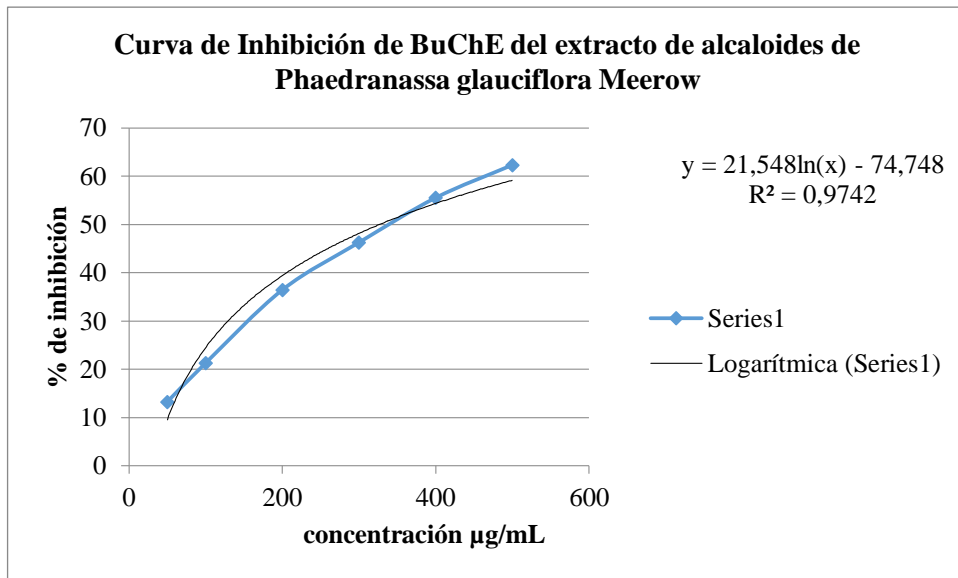


Gráfico 6. Ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal. Tercer día.

ANEXO I: Permiso de movilización de *Phaedranassa glauciflora* Meerow Nro. 012-2017




GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y FAUNA SILVESTRES
Nro. 012-2017

Fecha de emisión: 10-08-2017 15:10:00 (Fecha y hora).
 Fecha de movilización: 12-08-2017 Válido hasta: 13-08-2017 (Fecha y hora, máx 24 horas)

La Dirección Provincial del Ambiente de Chimborazo, Autoriza a: Karen Lineth Acosta León C.C. 1003089016, para la movilización de especímenes de FLORA desde la Provincia de Chimborazo, hacia: Provincia de Pichincha, cantón Quito, ciudad: Quito DM, de acuerdo al siguiente detalle:

Nombre Científico	Nombre Común	Descripción del espécimen a parte consultiva	Estado	Cantidad
<i>Phaedranassa glauciflora</i>	Cebollín	Bulbos	Frescos, envueltos en papel periódico	3
TOTAL				3

Observaciones:
 Los especímenes fueron colectados en la provincia de Chimborazo, Cantón Alusá, Parroquia de Patishi basados en el Contorno Marco de Acceso a los Recursos genéticos: MAE-DNB-CM- 2015-0054 "La Biodiversidad de *Amayllidaceae* como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible"

Movilización:
 Vehículo: Transporte Interprovincial de turno: Transportes Patria

Motivo de movilización:
 Traslado a Unidad de manejo (x) Nombre: Herbario HUTI de la Universidad Tecnológica Indoamérica
 Patente Nro. 006-2017-FLO-DPAP-MA.

Investigación (x) MAE-DNB-CM-2015-0054
 Exhibición itinerario (no) Nombre:.....
 Comercio (no)
 Otros (no)



Ministerio del Ambiente
DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO
 Ing. Marcelo Pino Cáceres
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO
 ENTREGO CONFORME



RESPONSABLE UNIDAD DE VIDA SILVESTRE
DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO
 Av. Pán de Azúcar y Ductos, Dama Alcaz
 Teléfonos: 098123
 Email: 098123
 Internet: 098123
 www.ambiente.gub.ec