



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

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

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Para optar al Grado Académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: EVELIN JOELY MONTERO VALENCIA

TUTORA: LIC. KAREN ACOSTA M.Sc.

Riobamba – Ecuador

2018

© 2018, Montero Valencia Evelin Joely

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 CIHMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo experimental “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DE *Phaedranassa tunguraguae***” de responsabilidad de la señorita Evelin Joely Montero Valencia, 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**

BQF. John Quispillo, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DERECHOS DE AUTORÍA

El Trabajo de Titulación 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.

Evelin Joely Montero Valencia

C.I. 180485576-3

DEDICATORIA

A mis padres por todo el apoyo y amor incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida estudiantil y por su ejemplo de superación personal y bondad infinita con el prójimo.

Evelin.

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por la vida y por haber permitido que los acontecimientos y personas lleguen a mí para convertir mis anhelos en dichas realidades.

A mis padres Marcelo y Narcisa por haberme guiado con infinito amor desde mis primeros pasos hasta el día de hoy, por ser mi mayor ejemplo de vida, por la paciencia y comprensión que me han brindado.

A mi hermana Jessica por ser mi compañera incondicional, mi apoyo y pilar a lo largo de mi vida estudiantil.

A mis abuelitos Nelson y Elsia, por todo el amor y apoyo que me han brindado en cada etapa de mi existencia.

Extiendo mi más profundo agradecimiento a la Lic. Karen Acosta M.Sc. por haber sido mi guía en la elaboración de este trabajo, por haber compartido sus conocimientos conmigo a lo largo de mi formación profesional, por haber estado presta a colaborar en todo momento y sobre todo por su amistad.

Un agradecimiento sincero al BQF. Diego Vinueza M.Sc. y al BQF. John Quispillo M.Sc. por el apoyo brindado para el desarrollo del presente trabajo de titulación. Gracias a todos quienes conforman el grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia de la ESPOCH (GIPRONAF) por el espíritu de colaboración.

Gracias al Dr. Jaume Bastida de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona y a la Dra. Nora Oleas de la Universidad Tecnológica Indoamérica.

Evelin.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACHE	Acetilcolinesterasa
Aβ	Beta - amiloide
APOE	Apolipoproteína E
ATC	Acetilcolina
BIFRENES	La Biodiversidad Iberoamericana como Fuente de Recursos Naturales para su Explotación Sostenible
BTC	Butirilcolina
BuChE	Butirilcolinesterasa
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CYTED	Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
DTNB	Ácido 5,5 – ditio – bis – (2-nitrobenzoico)
EA	Enfermedad de Alzheimer
FDA	Food and Drugs Administration (Administración de alimentos y medicamentos)
IC₅₀	Concentración inhibitoria máxima media
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
SNC	Sistema nervioso central
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xiv
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	6
1.1 Enfermedad de Alzheimer	6
1.1.1 Historia	6
1.1.2 Descripción	6
1.1.3 Factores de riesgo.....	7
1.1.4 Acetilcolina y Alzheimer	8
1.1.5 Tratamiento	8
1.2 Acetilcolinesterasa	9
1.2.1 Estructura	10
1.2.2 Inhibidores de la acetilcolinesterasa	10
1.3 Butirilcolinesterasa.....	11
1.4 Familia Amaryllidaceae	11
1.4.1 Características	11
1.4.2 Etnobotánica.....	12
1.5 <i>Phaedranassa</i>	13
1.6 <i>Phaedranassa tunguraguae</i> Ravenna	15
1.7 Alcaloides de Amaryllidaceae	16
1.7.1 <i>Galantamina</i>	17

1.7.1.1	<i>Síntesis</i>	18
1.7.2	<i>Licorina</i>	19
1.8	Método de Ellman	20

CAPITULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	22
2.1	Lugar de Investigación	22
2.2	Materiales, equipos y reactivos	22
2.2.1	<i>Equipos</i>	22
2.2.2	<i>Materiales</i>	23
2.2.3	<i>Reactivos</i>	24
2.4	Identificación botánica	25
2.5	Preparación del material vegetal	26
2.6	Extracción de alcaloides	26
2.7	Identificación de alcaloides por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)	27
2.8	Preparación de soluciones	27
2.8.1	<i>Preparación de reactivos</i>	27
2.8.3	<i>Preparación de sustratos</i>	28
2.8.4	<i>Galantamina (compuesto de referencia)</i>	28
2.8.5	<i>Muestra de alcaloides de <i>Phaedranassa tunguraguae</i></i>	29
2.9	Ensayos de inhibición enzimática de AChE y BuChE	29
2.10	Análisis de datos	30
2.10.1	<i>Curva de inhibición enzimática para el cálculo del IC50</i>	31

CAPITULO III

3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.1	Obtención del extracto alcaloidal de <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	32
3.2	Identificación de Alcaloides de <i>Phaedranassa tunguraguae</i> por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas	33
3.3	Porcentaje de inhibición de AChE por el extracto de alcaloides del bulbo de <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	37
3.3.1	Primer screening de inhibición de AChE por el extracto alcaloidal del bulbo de <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	37
3.4	Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides del bulbo de <i>Phaedranassa tunguraguae</i> sobre AChE.....	38
3.5	Porcentaje de inhibición de BuChE por el extracto de alcaloides del bulbo de <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	39
3.5.1	Primer screening de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal del bulbo de <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	39
3.5.2	Segundo screening de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal del bulbo de <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	39
3.6	Determinación de la actividad inhibitoria por el extracto de alcaloides del bulbo de <i>Phaedranassa tunguraguae</i> sobre BuChE	40
	CONCLUSIONES.....	42
	RECOMENDACIONES.....	43
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1-2** Equipos empleados en cada procedimiento
- Tabla 2-2** Materiales de laboratorio empleados en cada procedimiento
- Tabla 3-2** Reactivos empleados en cada procedimiento
- Tabla 4-2** Concentraciones del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae* empleadas en el ensayo de inhibición de AChE y BuChE.
- Tabla 1-3** Resultados de la obtención del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae*
- Tabla 2-3** Alcaloides identificados en el extracto purificado del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae* mediante CG-EM.
- Tabla 3-3** Porcentajes de inhibición de AchE por el extracto alcaloidal de *P. tunguraguae* obtenidos del primer screening
- Tabla 4-3** Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *P. tunguraguae* sobre AchE
- Tabla 5-3** Porcentajes de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal de *P. tunguraguae* obtenidos del primer screening.
- Tabla 6-3** Porcentajes de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal de *P. tunguraguae* obtenidos del segundo screening.
- Tabla 7-3.** Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *P. tunguraguae* sobre BuChE

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1-1** Representación esquemática del sitio activo de acetilcolinesterasa.
- Figura 2-1** Geodistribución de la familia Amaryllidaceae
- Figura 3-1** Ocho especies endémicas de *Phaedranassa* en Ecuador
- Figura 4-1** Flores de *Phaedranassa tunguraguae*.
- Figura 5-1** Estructuras de los nueve tipos de alcaloides de Amaryllidaceae, con la numeración propuesta por Ghosal *e t al.* (1985)
- Figura 6-1** Estructura de la galantamina
- Figura 7-1** Estructura química de Licorina
- Figura 8-1** Representación esquemática del principio del método de Ellman.
- Figura 1-3** Estructura de los alcaloides aislados en el extracto de alcaloides del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae*

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A** Recolección del material vegetal
- ANEXO B** Obtención del extracto crudo del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae*
- ANEXO C** Obtención del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae*
- ANEXO D** Reactivos, enzimas, sustratos y muestras
- ANEXO E** Ensayo de inhibición de AChE y BuChE
- ANEXO F** Curva de inhibición de acetilcolinesterasa. Porcentaje de inhibición de AChE vs. concentración del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae*. (GF1, GF2, GF3)
- ANEXO G** Curva de inhibición de butirilcolinesterasa. Porcentaje de inhibición de BuChE vs. concentración del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae*. (GG1, GG2, GG3)
- ANEXO H** Acta de Movilización de *Phaedranassa tunguraguae*

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto alcaloidal del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae*, especie endémica del Ecuador perteneciente a la familia Amaryllidaceae. A partir del extracto bruto obtenido por maceración del bulbo con metanol, se realizó la extracción de alcaloides mediante un método basado en cambios de pH y uso de solventes orgánicos. Además, se identificaron los alcaloides presentes en la muestra a través de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. Complementariamente, se realizó la evaluación de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal frente a las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa por el método de Ellman con modificaciones, empleando galantamina como compuesto de referencia. Se realizaron curvas de inhibición enzimática y a partir de la ecuación de la recta obtenida se calculó el IC₅₀ como media de tres repeticiones individuales, cada una por triplicado. En el extracto de alcaloides de *P. tunguraguae* se detectó la presencia de 15 alcaloides, siendo identificados solo 8 de ellos. Licorina (46,97%) fue el alcaloide más abundante, además se determinó la presencia de 7 alcaloides no identificados con *m/z* 109, *m/z* 275, *m/z* 264, *m/z* 228, *m/z* 240, *m/z* 284, y *m/z* 294. La actividad inhibitoria enzimática del extracto alcaloidal expresada como IC₅₀ (concentración a la que se produce un 50% de inhibición), fue para acetilcolinesterasa de IC₅₀ 11.12 ± 1.87 µg/mL, menor actividad en comparación con galantamina (IC₅₀ 0.30 ± 0.01 µg/mL). Por otro lado, para butirilcolinesterasa se obtuvo un IC₅₀ 64.49 ± 1.34 µg/mL, frente a galantamina IC₅₀ 4.31 ± 0.04 µg/mL. Estos resultados demuestran que el extracto alcaloidal de *P. tunguraguae* presenta actividad inhibitoria menor a galantamina, pero relativamente destacable, exhibiendo mayor afinidad de los alcaloides por AChE. Se recomienda realizar más estudios fitoquímicos y de actividad biológica de la especie *Phaedranassa tunguraguae*.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FITOQUÍMICA>, <ALCALOIDES>, <BULBO (*Phaedranassa tunguraguae*)>, <INHIBICIÓN ENZIMÁTICA>, <COLINESTERASAS>, <ENFERMEDAD DE ALZHEIMER>, <GALANTAMINA>

SUMMARY

The objective was to evaluate the inhibitory activity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase of the alkaloidal extract of the *Phaedranassa tunguraguae* bulb, an endemic species of Ecuador belonging to the Amaryllidaceae family. From the crude extract obtained by maceration of the bulb with methanol, the extraction of alkaloids was carried out by a method based on pH changes and the use of organic solvents. In addition, alkaloids present in the sample were identified through Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. In addition, the evaluation of the inhibitory activity of the alkaloidal extract against the enzymes acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase was carried out using the Ellman method with modifications, using galantamine as a reference compound. Enzymatic inhibition curves were made and from the equation of the obtained line the IC₅₀ was calculated as an average of three individual repeats, each in triplicate. In the extract of alkaloids of *P. tunguraguae* the presence of 15 alkaloids was detected, being identified only 8 of them. Lycorine (46.97%) was the most abundant alkaloid, and the presence of 7 unidentified alkaloids was determined with m/z 109, m/z 275, m/z 228, m/z 240, m/z 284, and m/z 294. The enzymatic inhibitory activity of alkaloid extract expressed with IC₅₀ (concentration at which 50% inhibition occurs), was for acetylcholinesterase of IC₅₀ 11.12 ± 1.87 µg/mL, lower activity compared with galantamine (IC₅₀ 0.30 ± 0.01 µg/mL). On the other hand, for butyrylcholinesterase obtained an IC₅₀ of 64.49 ± 1.34 µg/mL, against galantamine IC₅₀ 4.31 ± 0.04 µg/mL. These results show that the alkaloid extract of *P. tunguraguae* has less inhibitory activity than galantamine, but relatively untouchable, showing greater affinity of the alkaloids for AChE. It is recommended to carry out more phytochemical and biological activity studies of the species *Phaedranassa tunguraguae*.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <FITOCHEMISTRY>, <ALKALOIDS>, <BULB (*Phaedranassa tunguraguae*)>, <ENZYMATIC INHIBITION>, <CHOLINESTERASES>, <ALZHEIMER DISEASE>, <GALANTAMINE>.

INTRODUCCIÓN

Identificación del problema

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que afecta gravemente la capacidad de memoria, la cognición y el comportamiento de los individuos, con un impacto negativo en la sociedad y en su economía (Alzheimer's Association, 2017, p. 1)

De acuerdo con la OMS en el mundo existen alrededor de 50 millones de personas que padecen demencia y cada año se registran un número aproximado de 10 millones de casos nuevos, siendo el Alzheimer la causa más común de demencia ya que acapara un 60% a 70% de los casos. (Organización Mundial de la Salud, 2017)

Se estima que para el año 2030 el número de personas con demencia supere los 82 millones y para el 2050 alcance los 150 millones de individuos. La demencia se convierte en una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas de edad avanzada, ya que tiene un efecto negativo a nivel económico, físico y psicológico no solo en el paciente sino también en su familia. (Organización Mundial de la Salud, 2017)

La FDA ha catalogado a los medicamentos empleados para el tratamiento del Alzheimer como prioridad de investigación debido a la preocupante tasa anual de mortalidad por esta patología y porque a pesar de los esfuerzos de la comunidad científica no se ha hallado un tratamiento claramente eficaz y seguro. (Food and Drug Administration, 2016)

La patogénesis de EA no ha sido determinada con claridad, existen varias hipótesis que intentan explicar el origen de la enfermedad. Una de ellas es la hipótesis colinérgica que relaciona el déficit del componente colinérgico con el deterioro cognitivo y la pérdida de memoria, dicho déficit se puede dar por la producción disminuida de acetilcolina o por la actividad incrementada de AChE, es por ello que los tratamientos para EA se centran en la inhibición de las enzimas que hidrolizan el neurotransmisor. (Alzheimer's Association, 2017, pp. 3-6)

Dentro de las moléculas más empleadas para el tratamiento paliativo de esta enfermedad, se encuentra la galantamina que es un alcaloide con actividad inhibitoria frente a las enzimas AChE y BuChE, este fármaco fue admitido por la FDA en el año 2001 y es biosintetizado por la mayoría de especies de la familia Amaryllidaceae. (Ortiz *et al.*, 2012)

A pesar de que ha transcurrido más de una década y se ha logrado la síntesis total de este compuesto en el laboratorio, la industria farmacéutica prefiere elaborar el medicamento extrayendo el principio activo de cultivos de plantas que producen este metabolito secundario; hasta el momento no se ha encontrado una especie que presente un alto rendimiento y logre satisfacer la demanda del mercado, por lo que se buscan plantas que contengan una mayor cantidad del alcaloide y que este tenga la calidad requerida. (Ortiz *et al.*, 2012).

Otra alternativa sería descubrir un nuevo alcaloide con mejor actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE, para en trabajos futuros someterlo a todas las fases de estudio necesarias para aprobar su uso en seres humanos.

Justificación de la investigación

La tendencia actual de la investigación académica acerca de los alcaloides de plantas de la familia Amaryllidaceae se centra en la búsqueda de especies que entre sus metabolitos secundarios contengan un alto porcentaje de galantamina, fármaco actualmente empleado en el tratamiento del Alzheimer por su efecto inhibitor de enzimas colinesterasas. (Zhan *et al.*, 2017, pp. 771-772)

Además, existe un enfoque en aislar, identificar y dilucidar químicamente nuevas moléculas que presenten un efecto inhibitorio de AChE y BuChE más efectivo en comparación con las moléculas existentes, para poder llevarlas a fases de estudios clínicos (Zhan *et al.*, 2017, pp. 771-772).

En el Ecuador existe una gran diversidad de flora, que a pesar de haber sido poco estudiada, ha sido utilizada con fines terapéuticos por las comunidades durante siglos. Los estudios de la composición química de un gran número de especies no han sido llevados a cabo, mucho menos con un enfoque en los alcaloides que estas poseen. (Acosta, 2013, p. 2)

En este sentido, una de las familias de vegetales que ha llamado la atención de los investigadores en las últimas décadas es la familia Amaryllidaceae. Cuya distribución en el país es amplia ya que existen 36 especies, siendo 15 de estas endémicas del Ecuador, pertenecientes en su mayoría a los géneros *Phaedranassa* y *Eucrosia*. (Meerow, *et al.*, 2015; Minga, *et al.*, 2015).

Las especies de Amaryllidaceae son especialmente interesantes debido a que dentro de sus metabolitos secundarios se hallan alcaloides con actividad biológica útil en la terapia de enfermedades neurodegenerativas y mentales. (Bay-Smidt *et al.*, 2011, p. 176)

Entre los géneros de Amaryllidaceae encontrados en el Ecuador está *Phaedranassa* con un total de nueve especies endémicas, siendo una de ellas *Phaedranassa tunguraguae*, cuyas poblaciones se encuentran en un solo valle de los Andes Ecuatorianos y se encuentra en peligro de extinción (Oleas, *et al.*, 2012; Minga, *et al.*, 2015).

Esta especie no ha sido estudiada hasta el momento. Si no se realizan investigaciones sobre las especies exclusivas de la flora del país se podría obviar su valor biológico perdiendo así grandes oportunidades para el desarrollo de la medicina.

La conservación de especies endémicas del Ecuador es sumamente importante no solo porque es un país mega diverso, sino porque además se calcula que posee el mayor porcentaje de deforestación en Sudamérica (Oleas, *et al.*, 2012, p. 558). Por lo cual, estudios como este resaltarán la importancia de la propagación de cultivos y cuidado de las especies en peligro de extinción por parte de las comunidades.

Dentro de los objetivos planteados por el Plan Nacional del Buen Vivir, se propuso el mejoramiento de la calidad de vida de la población; para lo cual el Ministerio de Salud Pública del Ecuador estableció una serie de programas de investigación orientados hacia el descubrimiento y desarrollo de nuevas opciones de tratamiento para las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, utilizando los recursos genéticos y la biodiversidad del país (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, 2013).

Así también el Plan Nacional de Desarrollo “Toda Una Vida” instituido en el 2017 busca garantizar el acceso de las personas a sus derechos a la largo de todo su ciclo de vida, y presenta un enfoque en los adultos mayores que tienen más necesidades por cubrir, entre ellas la salud, aspecto en el que la investigación será parte esencial para la búsqueda de opciones que permitan mejorar su calidad de vida. (Secretaría Técnica Plan Toda Una Vida, 2018)

El presente trabajo de titulación se enfoca en el estudio de la bioactividad de *Phaedranassa tunguraguae*. Se evaluará la actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE del extracto alcaloidal de la especie, dichas enzimas son clave en la enfermedad del Alzheimer ya que ejercen su acción sobre el neurotransmisor acetilcolina cuya disminución está relacionada con el proceso neurodegenerativo y la pérdida de las capacidades cognitivas.

Esta investigación aportará significativamente al conocimiento sobre la actividad biológica de especies nativas del Ecuador, y realizará la importancia del cuidado y preservación de plantas que se encuentran en peligro de extinción. Así, este estudio forma parte del aporte que deben realizar las instituciones de educación superior para el desarrollo social en cooperación con el Gobierno Ecuatoriano.

Además, la demanda de nuevas fuentes de galantamina y nuevos principios activos que puedan tener actividad inhibitoria frente a AChE y BuChE u otra acción biológica importante, y la necesidad de reconocer el valor de la flora única del Ecuador así como la urgente búsqueda de la protección de la biodiversidad crea una oportunidad para los agricultores ecuatorianos para producir cultivos de especies de Amaryllidaceae (Oleas *et al.*, 2012, p. 558)

Este estudio aporta al Programa Iberoamericano “CYTED”, siendo la línea de investigación “La Biodiversidad Iberoamericana como Fuente de Recursos Naturales para una Explotación Sostenible – BIFRENES”, por lo que los resultados servirán como referencia bibliográfica, pero sobretudo como contribución en la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General:

- Evaluar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae*

Objetivos específicos:

- Obtener el extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae* mediante el uso de solventes orgánicos y cambios de pH.
- Determinar la concentración media inhibitoria IC_{50} del extracto de alcaloides de *Phaedranassa tunguraguae* sobre acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.
- Separar e identificar los alcaloides presentes en el extracto del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae* mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Enfermedad de Alzheimer

1.1.1 Historia

Nombrada así por el médico alemán Alois Alzheimer, quién describió esta patología por primera vez en el año de 1906 en Tübingen, tras haber estudiado el caso de una paciente de 51 años que presentó síntomas como deficiencia en la cognición, lenguaje y memoria; alucinaciones, paranoia y un comportamiento agresivo, que tras haber fallecido y analizado el estado de su cerebro notó que exhibía cambios arterioescleróticos y placas seniles. El término “Enfermedad de Alzheimer” fue acuñado por Kraepelin en 1910, para referirse a esta patología (Singh *et al.*, 2013, p. 166).

1.1.2 Descripción

Es la causa más común de demencia, se estima que del 60% a 80% de casos. El cuadro patológico se caracteriza por una pérdida de las funciones cognitivas en especial el deterioro de la capacidad de memoria del cerebro. La mayoría de demencias son irreversibles ya que se asocian a una neurodegeneración progresiva (Singh *et al.*, 2013, p. 166) . Los síntomas de la demencia pueden ser (Alzheimer’s Association, 2017, p. 4):

- **Síntomas tempranos:** dificultad para recordar conversaciones recientes, nombres de personas conocidas y eventos que han ocurrido hace poco tiempo. Además se desarrolla un cuadro de depresión y apatía.
- **Síntomas tardíos:** comunicación alterada, desorientación, confusión, mal y escaso juicio, cambios en el comportamiento; y más adelante dificultad para hablar, tragar y caminar, pudiendo incluso ser letal.

La EA se caracteriza a nivel molecular por la agregación de proteínas, aumento del estrés oxidativo, anomalías mitocondriales y procesos de inflamación a nivel del tejido nervioso.(Goedert y Spillantini, 2006, p. 777). Existen dos tipos de EA (Singh *et al.*, 2013, p. 166):

- **EA esporádica:** se caracteriza por una disminución severa en la capacidad cognitiva y un aumento de la muerte de las neuronas.
- **EA familiar:** se desarrolla mucho más rápido que la esporádica, y es provocada por mutaciones en el componente de la vía amiloidea.

1.1.3 Factores de riesgo

Con excepción de los casos causados por anomalías genéticas del individuo, los expertos creen que EA al igual que otras enfermedades crónicas se desarrollan como resultado de múltiples factores, más que por una causa simple. Los factores de riesgo asociados son (Alzheimer's Association, 2017, pp. 6-7):

- **Edad:** la edad avanzada es el mayor factor de riesgo, por lo general se desarrolla a partir de los 65 años en adelante, con una prevalencia de 32% de personas afectadas a una edad de 85 años o más. Sin embargo, EA no se desarrolla normalmente con la edad, este factor no es suficiente para desencadenar la patología.
- **Historia familiar:** los antecedentes familiares de EA no son necesarios para que una persona desarrolle la enfermedad. No obstante los individuos que tienen un familiar muy cercano que padecen de EA tienen más probabilidad de presentar la patología.
- **Gen de la apolipoproteína E:** todas las personas heredan una de las tres formas del gen de APOE (e2, e3 o e4) de cada padre. La forma e3 es la más común, seguida de la e4 y finalmente la e2. Los individuos que tienen la forma e4 incrementan el riesgo de padecer EA en comparación con aquellos que poseen la forma e3, mientras que la forma e2 disminuye aún más el riesgo. Además, la forma e4 aumenta la probabilidad de desarrollar EA en edades tempranas.

1.1.4 Acetilcolina y Alzheimer

La causa exacta de EA sigue siendo desconocida e incierta, pero en general existen varias hipótesis que se han descrito para explicar la patogénesis de esta enfermedad (Singh *et al.*, 2013, p. 166). Las tres hipótesis más reconocidas son:

Hipótesis amiloide, propone que la enfermedad es producida debido a la acumulación de precipitados de proteína precursora de amiloide en el cerebro (Lobbens *et al.*, 2017, p. 4).

Por otro lado, la hipótesis de proteínas tau se enfoca en la aparición de ovillos neurofibrilares formados de proteína tau fibrilada, que serían los responsables de causar la neurodegeneración (Lobbens *et al.*, 2017, p. 4).

Finalmente la hipótesis colinérgica, sugiere que la EA se desarrolla debido a una pérdida de neuronas colinérgicas en el cerebro, afectando así a ciertas áreas relacionadas con la memoria (Lobbens *et al.*, 2017, p. 4). En el año de 1976 Peter Davies descubrió un vínculo entre los síntomas clínicos del Alzheimer y el marcado déficit del componente colinérgico en el cerebro de las personas afectadas. Este déficit se debió a una producción disminuida del neurotransmisor o a la actividad incrementada de acetilcolinesterasa (Arce *et al.*, 2009, p. 7249).

Esta disminución provoca una alteración en la sinapsis colinérgica conduciendo así a la pérdida progresiva de las habilidades intelectuales. Todo este conocimiento permitió enfocar las investigaciones en la búsqueda de tratamientos que impidan la degradación del neurotransmisor involucrado, la acetilcolina (Singh *et al.*, 2013, p. 166).

1.1.5 Tratamiento

No existe una cura conocida para la Enfermedad de Alzheimer; sin embargo, se proponen tratamientos paliativos que permitan ralentizar la evolución de esta neuropatología y por lo tanto brindar al paciente una mejor calidad de vida.

- **Tratamiento farmacológico:** en la actualidad existen seis fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, estos no detienen el daño neuronal, si no que mejoran los síntomas temporalmente gracias al incremento de

neurotransmisores en el cerebro. La efectividad de los fármacos varía entre individuos y su duración es limitada (Alzheimer's Association, 2017, p. 8).

Los fármacos que han sido estudiados con mayor amplitud son aquellos cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición reversible de las enzimas colinesterasas, encargadas de hidrolizar la acetilcolina y butirilcolina, debido a que la cantidad de estos neurotransmisores se ve seriamente afectada en la EA. (Chigurupati *et al.*, 2016, p. 9).

Entre estos principios activos está el donepezilo, rivastigmina y galantamina; pero debido a los múltiples efectos secundarios causados por estos fármacos, en la actualidad se buscan otras alternativas, como por ejemplo ciertos alcaloides indólicos, pirazolininas y sus análogos que presentan además de una actividad inhibitoria de las enzimas colinesterasas, una actividad antioxidante importante (Chigurupati *et al.*, 2016, p. 9).

- **Tratamiento no farmacológico:** tiene por objetivo mantener o mejorar las funciones cognitivas del individuo, así como la habilidad de realizar sus actividades diarias. Además permiten evitar trastornos de conducta como depresión, insomnio, apatía, agresividad y agitación. Algunos tratamientos incluyen entrenamiento de la memoria, musicoterapia y ejercicio físico frecuente (Alzheimer's Association, 2017, p. 8).

1.2 Acetilcolinesterasa

Es una enzima que pertenece a la familia de proteínas α/β hidrolasas, que es un grupo de enzimas con características estructurales similares e incluye las colinesterasas, lipasas y carboxilasas. AChE tiene como principal función la hidrólisis rápida de la acetilcolina durante el proceso de sinapsis colinérgica y la unión neuromuscular (Singh *et al.*, 2013, p. 168).

En las personas que padecen EA, la actividad de AChE incrementa, además presenta acciones no catalíticas así por ejemplo influye en la agregación del péptido A β dando lugar a la formación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares, demostrando que el sitio aniónico periférico de la enzima es responsable de esta acción (Singh *et al.*, 2013, p. 169).

1.2.1 Estructura

La estructura tridimensional de AChE fue determinada en el año de 1991, llegando a la conclusión de que posee un sitio catalítico (triada catalítica) y un sitio aniónico periférico. Posee dos sitios de unión al sustrato de ligandos separados. (Singh *et al.*, 2013, p. 168)

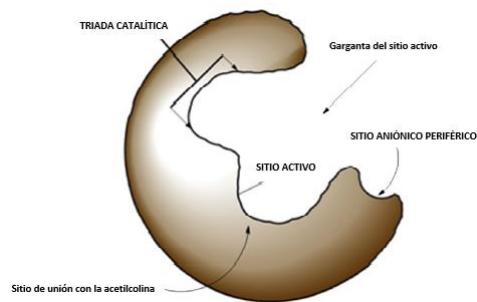


Figura 1-1. Representación esquemática del sitio activo de acetilcolinesterasa.

Fuente: (Singh *et al.*, 2013, p. 168)

1.2.2 Inhibidores de la acetilcolinesterasa

Los tratamientos paliativos del Alzheimer se han centrado en el mejoramiento de la función colinérgica; ya sea empleando agonistas de los receptores colinérgicos o administrando inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa. En la actualidad existen varias moléculas con capacidad inhibitoria de AChE, que poseen distintos mecanismos de acción y estructuras químicas empleados en el tratamiento de EA (Talesa, 2001, p. 1963).

Varios estudios han demostrado que algunos inhibidores de AChE no solo facilitan la sinapsis colinérgica sino que además interfiere con la síntesis, deposición y agregación de A β tóxico, convirtiendo a estas moléculas en una estrategia efectiva en el tratamiento de EA. (Singh *et al.*, 2013, p. 169)

Los tratamientos con inhibidores de AChE muestran mejoras de la disfunción cognitiva en general y específicamente de la capacidad de atención de los pacientes (Talesa, 2001, p. 1963).

Los inhibidores de AChE son empleados en la farmacoterapia de la EA, para el tratamiento del glaucoma, bloqueo neuromuscular durante la anestesia quirúrgica y la miastenia gravis (Singh *et al.*, 2013, p. 168).

Se ha descubierto una cifra significativa de compuestos de origen natural que tienen la capacidad de inhibir las enzimas AChE y BuChE, es por esta razón que moléculas como la huperzina A y la galantamina son empleadas como potentes inhibidores enzimáticos en el tratamiento de EA. El primer compuesto se comercializa como suplemento alimenticio, mientras que la galantamina fue el primer alcaloide de la familia Amaryllidaceae en ser aprobado como fármaco de prescripción médica para el tratamiento de esta patología (Cortes *et al.*, 2015, p. 222).

1.3 Butirilcolinesterasa

Es una enzima que se sintetiza en el hígado y se encuentra además en el intestino, pulmón, riñón, corazón y suero (Bayrak *et al.*, 2017, p. 3) y tiene como función la hidrólisis de algunos ésteres de colina, como algunos fármacos y moléculas endógenas como la acetilcolina, siendo más específica de esta, la AChE; mientras BuChE presenta una máxima actividad sobre la succinilcolina. Cuando existe una alteración de la función hepática, esta enzima disminuye en función de los hepatocitos afectados. (Vásconez & Osorio, 2000)

Se ha encontrado también que los niveles de BuChE se incrementan en individuos que padecen de hipertensión, hiperlipidemia y sobrepeso; por el contrario el nivel disminuye en pacientes que han sufrido infarto agudo de miocardio o sometidos a tratamiento con beta bloqueantes. (Rahim *et al.*, 2015, p. 2)

1.4 Familia Amaryllidaceae

1.4.1 Características

Amaryllidaceae es una familia vegetal monocotiledónea formada por 70 géneros y alrededor de 1600 especies, distribuidas por todo el mundo, con su principal localización en los trópicos en

Sudamérica y Sudáfrica, además se pueden encontrar en Australia y la región mediterránea (Acosta, 2013, p. 1) (ver figura 1)

Se caracterizan por ser hierbas perennes con un bulbo carnoso subterráneo y de flores muy coloridas y vistosas, que florecen en otoño o primavera en la mayoría de especies. (Cabral, et al., 2010)



Figura 2-1. Geodistribución de la familia Amaryllidaceae.

Fuente: (Cabral, et al., 2010)

Las subfamilias más representativas de la familia Amaryllidaceae son Amaryllidoideae, Agapanthoideae y Allioideae, siendo la primera la más numerosa; la misma que consta de los siguientes subtipos: Amaryllideae, Cytanyheae, Haemantheae y Calostemmateae (Ronsted *et al.*, 2012, p. 2)

En Ecuador especies de esta familia se pueden encontrar principalmente en las zonas secas de la sierra. Existen 36 especies pertenecientes a varios géneros, como por ejemplo, *Phaedranassa dubia*, *P. cínerea*, *P. brevifolia*, *P. tunguraguae*, *P. glauciflora*, *P. lehmanni*, *P. schizantha*, *P. dubia*, *P. viridiflora*, *Eucrosiaaurantiaca*, *Eucharis grandiflora*, *Stenomessonaurantiacum*, *Eucharisformosa*, *Eucharis candida*, *Eucharis moorei*, *Hippeastrum puniceum* y *Crinumamabile* (Meerow, 1998; Meerow *et al.*, 2015; Minga *et al.*, 2015)

1.4.2 Etnobotánica

El reino vegetal provee al ser humano miles de alternativas de tratamiento para incontables patologías y trastornos. Se ha encontrado que varias especies de la familia Amaryllidaceae han sido empleadas en medicina tradicional, como por ejemplo, la especie *Boophone disticha* (L.F) Herb. de la tribu Amaryllideae originaria de África, ha sido empleada para inducir alucinaciones,

tratar la ansiedad y dolores de cabeza intensos y para sedar a los pacientes que presentan episodios de histeria, violencia y psicosis (Neergaard *et al.*, 2009, p. 371).

De la misma manera se ha reportado que especies como *Cyrtanthus* Aiton, tribu Cyrthanteae, y *Scadoxus* Raf. de la tribu Haemantheae también se han empleado en la fitoterapia para el tratamiento de enfermedades mentales (Stafford *et al.*, 2008, p. 513).

Otras especies, originarias de África, del género *Cyrtanthus* han sido empleadas con fines terapéuticos; por ejemplo, la infusión de raíz de *Cyrtanthus obliquus* se utiliza para aliviar el dolor de estómago; el bulbo de *Cyrtanthus breviflorus* ha sido consumido por las poblaciones para eliminar lombrices intestinales y *Cyrtanthus sanguineus* se administra durante el embarazo para facilitar la labor de parto (Nair *et al.*, 2011, p. 1103).

En Ecuador se conoce el uso tradicional de algunas especies de Amaryllidaceae, como es el caso de *Crinum x amabile* Donn cuyas hojas se colocan sobre el abdomen para tratar dolores estomacales. Por otro lado, el bulbo de *Eucharis formosa* Meerow se aplica para tratar tumores y lesiones cutáneas. Así también, el macerado del bulbo de *Eucharis x grandiflora* Planch. & Linden sirve para aliviar irritaciones y dolores de los ojos. (Ríos, *et al.*, 2007, pp. 339-362)

1.5 *Phaedranassa*

Phaedranassa Herbert (1845) es un género pequeño de la familia Amaryllidaceae, comprendido por nueve especies endémicas del Ecuador, se conocen tres en Colombia y una en Costa Rica. La mayoría de las especies se limitan a pocas poblaciones, de estas, cinco se han declarado en peligro y una se considera vulnerable debido a su distribución restringida y su hábitat amenazado (Minga *et al.*, 2015, p. 50).

Las especies endémicas de *Phaedranassa* en Ecuador son *P. brevifolia*, *P. cinérea*, *P. dubia*, *P. glauciflora*, *P. lehmanni*, *P. schizantha*, *P. tunguraguae*, *P. viridiflora* y *P. cuencana* descubierta en 2015. (Meerow, 1998; Minga *et al.*, 2015)



Figura 3-1. Ocho especies endémicas de *Phaedranassa* en Ecuador.

a) *P. brevifolia*; b) *P. cinérea*; c) *P. dubia*; d) *P. gauciflora*; e) *P. schizantha*; f) *P. tunguraguae*; g) *P. viridiflora*; h) Arriba: *P. viridiflora*; abajo: posible *P. dubia* x *P. viridiflora* híbrida.

Fuente: (Oleas, 2011, p. 78)

El género *Phaedranassa* se caracteriza por ser geófito. Las plantas presentan bulbos cubiertos por una túnica marrón y raíces contráctiles. Las láminas pueden ser elípticas o lanceoladas, con un ápice agudo y una base estrecha hacia el pecíolo. Las hojas tienen una vena central diferenciada y varían en el color y tamaño dependiendo de la especie. (Meerow, 1990; citado en Oleas, 2011)

Desarrolla una inflorescencia pseudo-umbrela con 6 a 20 flores tubulares, las mismas que son actinomorfas. Cada flor presenta seis pétalos que suelen presentar una coloración verde en la base desde el ápice y al final una tonalidad roja, rosa, amarilla o naranja. Presentan 6 estambres que se anclan en la base a los pétalos. Poseen tres filamentos de coloración amarilla o verde. El ovario es inferior y tiene múltiples óvulos. El fruto consiste en una cápsula que posee muchas semillas marrón oscuro o negro, y son generalmente de forma plana. (Meerow, 1990; citado en Oleas, 2011)

1.6 *Phaedranassa tunguraguae* Ravenna



Figura 4-1. Flores de *Phaedranassa tunguraguae* Ravenna

Fuente: (Pacific Bulb Society Wiki, 2016)

Ecuador es uno de los países más ricos en biodiversidad del mundo, posee alrededor de 2000 plantas que sólo han sido encontradas en sus cordilleras andinas. A pesar de eso, la situación es preocupante ya que de acuerdo a la Lista Roja de la UICN el 78% de las especies se encuentran amenazadas en algún grado, el 46% se consideran vulnerables, un 24% están en peligro y al menos 353 especies (8%) se encuentran en peligro crítico. Entre dichas especies se encuentran las que pertenecen al género *Phaedranassa* Herbert. (León, *et al.*, 2011; Oleas, *et al.*, 2012)

La distribución geográfica de *Phaedranassa tunguraguae* se halla limitada a una zona específica de los Andes Ecuatorianos, estando ubicada aproximadamente a lo largo de 20 Km del valle del río Pastaza, también se halla en la carretera que une a Baños y Puyo; además se puede encontrar a una altura de entre 1500 y 2100m en las faldas del volcán Tungurahua, en la ciudad de Baños. *Phaedranassa tunguraguae* es la única especie del género que se encuentra en esta zona que además presenta una deforestación importante; debido a ello, esta especie ha sido incluida en la Lista Roja de las especies en peligro de extinción, de acuerdo con el criterio de IUCN (Oleas, *et al.*, 2012, p. 558).

La polinización y dispersión de las semillas de *P. tunguraguae* no ha sido estudiada; sin embargo, el color rojo de la estructura tubular de sus flores sugiere que pudiera darse gracias al síndrome de polinización de colibrí. El género *Phaedranassa* puede residir en cualquier ambiente abierto, como por ejemplo las laderas de las montañas de tipo rocoso, o a lo largo de las orillas de los ríos, en parcelas agrícolas, por lo que han logrado sobrevivir a pesar del daño ecológico causado por la globalización en las últimas décadas (Oleas, *et al.*, 2012, p. 558).

1.7 Alcaloides de Amaryllidaceae

Amaryllidaceae se caracteriza por tener entre sus metabolitos secundarios alcaloides exclusivos, que han sido aislados de todos los géneros que conforman esta familia. Estos son de tipo isoquinolina y en la mayoría de los casos no se han identificado en ninguna otra familia vegetal. (Acosta, 2013, p. 2)

La amplia diversidad de estructuras de alcaloides de Amaryllidaceae se agrupa en nueve tipos, de acuerdo a su esqueleto estructural. Siendo estos: norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, haemantamina, narciclasina, montanina, galantamina. (Bastida, *et al.*, 2006, p. 97)

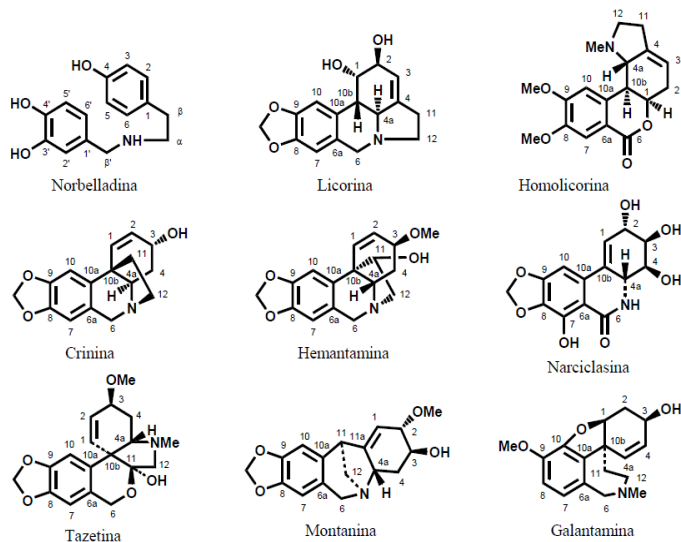


Figura 5-1. Estructuras de los nueve tipos de alcaloides de Amaryllidaceae, con la numeración propuesta por Ghosal *et al.* (1985)

Fuente: (Acosta, 2013, p. 2)

Los alcaloides de Amaryllidaceae han sido estudiados ampliamente ya que presentan usos etnobotánicos conocidos y por lo tanto diversas actividades biológicas, como acción analgésica, antibacteriana, antifúngica, antimalárica, antitumoral, antiviral entre otras (Wu *et al.*, 2014, p. 192).

El género *Hippeastrum*, por ejemplo, contiene alcaloides de los que se ha demostrado que poseen actividad citotóxica y psicoactiva; por otro lado la familia Amaryllidaceae es una fuente bien conocida de alcaloides que inhiben la actividad de AChE y en menor proporción BuChE, enzimas implicadas en la enfermedad neurodegenerativa EA (Ortiz *et al.*, 2012).

Licorina fue el primer alcaloide aislado en 1877, obtenido a partir de *Narcissus pseudonarcissus*. A partir de ello se han desarrollado múltiples investigaciones que han permitido el progreso en el estudio de especies de Amaryllidaceae, aunque aún existen fuentes fitoquímicas por examinar. En la actualidad se conocen más de 300 alcaloides de esta familia de plantas y a pesar de que sus estructuras químicas varían de forma importante entre sí, se considera que se relacionan biogenéticamente. (Bastida, *et al.*, 2006, p. 87)

1.7.1 Galantamina

Es un alcaloide exclusivo de la familia Amaryllidaceae, inhibidor altamente selectivo reversible y competitivo de AChE. Este compuesto, es además, un modulador alostérico del receptor nicotínico de acetilcolinesterasa y tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica para actuar a nivel del SNC. (Ortiz *et al.*, 2012, p. 13474)

Galantamina es producida como una sal de hidrobromuro bajo el nombre comercial de Reminyl®, expandida con fines terapéuticos para el tratamiento paliativo del Alzheimer (López *et al.*, 2002).

Sin embargo, este fármaco es efectivo únicamente durante las etapas leve a moderada de la evolución de la enfermedad. Esta es una limitación que impulsa la investigación hacia la detección de nuevas moléculas inhibidoras de AChE a partir de Amaryllidaceae (Cortes *et al.*, 2015, pp. 222-223).

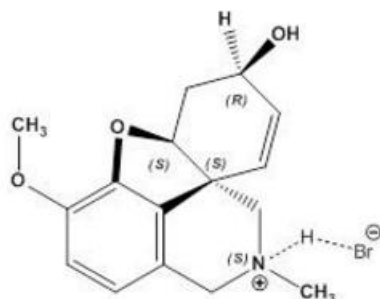


Figura 6-1. Estructura de la galantamina

Fuente: (López, 2014)

1.7.1.1 Síntesis

El alcaloide galantamina, fue aislado originalmente de la especie *Galanthus woronowii*, y aprobada por la FDA para el tratamiento paliativo de la Enfermedad de Alzheimer en el año 2001. Hasta el año 2012 se ha reportado una producción anual de 250 kg de galantamina, lo cual no satisface la demanda del mercado farmacéutico (Ortiz *et al.*, 2012).

La galantamina se puede obtener a partir de la biosíntesis en especies de la familia Amaryllidaceae pero necesita una inversión económica significativa para su aislamiento y purificación. Por tal motivo, las industrias farmacéuticas se han enfocado ampliamente en la búsqueda de diferentes rutas para la síntesis total de este alcaloide (Dong *et al.*, 2017, p. 4719).

La primera síntesis total de galantamina fue publicada por Barton y sus colaboradores en el año de 1962 y hasta el momento se han descrito más de 30 rutas de síntesis total de esta molécula; todas ellas basándose principalmente en la oxidación biomimética del fenol o en la reacción intramolecular de Heck. A pesar de estos progresos la estructura de la galantamina posee un carbono cuaternario desafiante que permite cierta actividad biológica de la molécula y por ello se convierte en un reto para los químicos el diseño de nuevas estrategias que permitan llegar a la síntesis total de la molécula y sus análogos, teniendo en cuenta factores económicos (Dong *et al.*, 2017, p. 4719).

En 2001 Guillou y su equipo de trabajo desarrollaron un esquema para la síntesis de (\pm) – galantamina obteniendo un rendimiento global de 12%. La estrategia propuesta era relativamente concisa y potencial para la aplicación en la industria. Sin embargo, el empleo de reactivos tóxicos y las condiciones extremas para las reacciones, así como la falta de disponibilidad de equipos han impedido el desarrollo de este método de síntesis a gran escala. Por este motivo, se buscan alternativas o cambios a la estrategia de Guillou que permitan obtener la molécula con la eficiencia terapéutica esperada y con un alto porcentaje de rendimiento (Dong *et al.*, 2017, pp. 4719-4720).

1.7.2 Licorina

Es un alcaloide isoquinolínico que se aísla usualmente de las especies del género *Lycoris*. Posee varias actividades biológicas que han sido ampliamente estudiadas como antiviral, antiinflamatoria, antitumoral, antibacterial, expectorante y emético (Bendaif *et al.*, 2018, p. 1).

Estudios de los efectos antitumorales de licorina han demostrado que este alcaloide tiene varios mecanismos de acción por ejemplo; suprime la proliferación celular deteniendo el ciclo celular en la fase G0/G1 en las células de la leucemia mielocítica crónica (Sun *et al.*, 2018, p. 10).

Además en los tumores de vejiga, licorina induce la apoptosis mediante la supresión de la vía de señalización AKT y su participación en la vía apoptótica. Otras moléculas derivadas de licorina inducen la apoptosis de células del cáncer de mama a través de la vía de los receptores de la muerte o vía extrínseca. (Sun *et al.*, 2018, p. 16)

Licorina ha demostrado ser un agente antibacterial eficaz frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae* e ineficaz sobre *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. (Bendaif *et al.*, 2018, p. 8)

Un estudio realizado por Bendaif, *et al.* (2018) demuestra que según ensayos *in silico* licorina muestra un buen perfil farmacocinético y que los valores obtenidos en los parámetros de la regla de Lipinski cumplen con lo recomendado para que un fármaco tenga buena biodisponibilidad oral.

Los estudios de toxicidad *in silico* demuestran que licorina no posee fragmentos causantes de mutagenicidad, tumorigenicidad, irritación, o efectos en la reproducción celular, los resultados obtenidos son comparables al perfil toxicológico de ampicilina e incluso mejores al perfil de estreptomicina el cual presenta en su molécula un grupo metilamino probablemente causante de irritación. (Bendaif *et al.*, 2018, p. 11)

En una investigación desarrollada por Cedrón, *et al.* (2010) se reporta que de entre múltiples derivados de licorina ensayados para evaluar su actividad antiplasmodial, los más efectivos serían los derivados que tenían el grupo hidroxilo libre en C-1 y C-2 o esterificados como acetatos o isobutiratos. El doble enlace entre C-2 y C-3 también sería importante.

Las características antes mencionadas hacen de licorina un buen candidato para futuros estudios y el desarrollo de un nuevo fármaco.

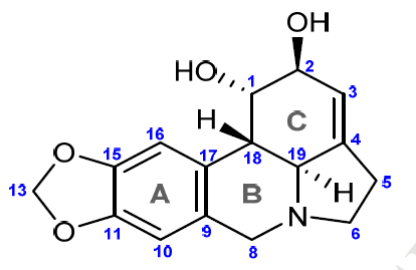


Figura 7-1. Estructura química de Licorina

Fuente: (Bendaif *et al.*, 2018, p. 7)

1.8 Método de Ellman

Antiguamente existían varios métodos para la detección de los niveles de enzimas colinesterasas en cultivos *in vitro* de células, estos resultaron exitosos para ciertas investigaciones. No obstante, este tipo de ensayos presentaba una serie de desventajas, por ejemplo, que no se lograba seguir

adecuadamente la cinética de la reacción sin separar tubos para cada intervalo de tiempo deseado, además el color que se detectaba dependía del remanente del sustrato añadido lo cual podría arrojar falsos resultados si la actividad enzimática se veía disminuida. Por esta y otras razones, se ideó un nuevo método en donde se aplicó la técnica reportada por Koelle y se utilizó el reactivo de sulfhidrilo estudiado por Ellman (Ellman *et al.*, 1961, pp. 88-89).

Esta técnica es extremadamente sensible por lo que se pueden emplear pequeñas cantidades de tejidos o muy bajas concentraciones de la enzima, además permite el estudio detallado de la cinética de la actividad de acetilcolinesterasa ya que el progreso de la hidrólisis de esta enzima es medido por la aparición del producto de la reacción. La actividad enzimática se mide a través de la detección del incremento de coloración amarilla producido por la tiocolina cuando esta reacciona con el ion ditiobisnitrobenzoato (Ellman *et al.*, 1961, pp. 88-89)

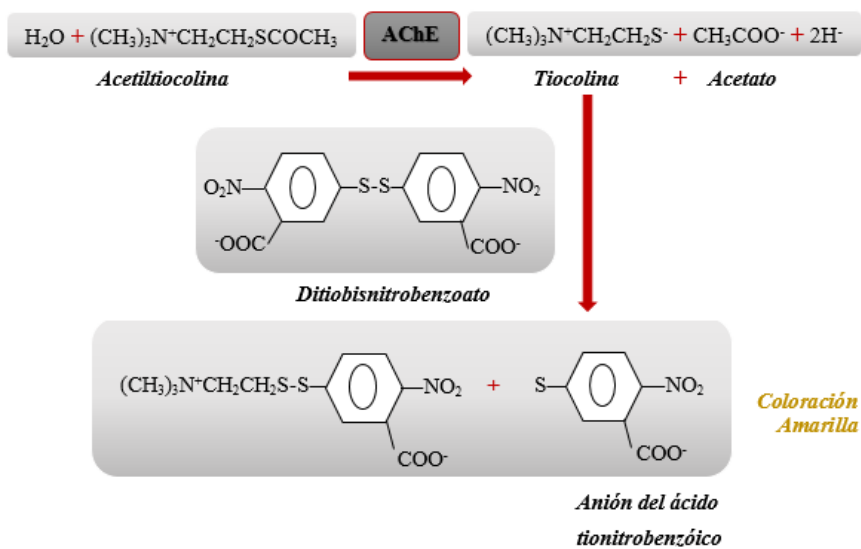


Figura 8-1. Representación esquemática del principio del método de Ellman.

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

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de Investigación

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de La Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona (España) en donde se realizó la identificación de los alcaloides por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

2.2 Materiales, equipos y reactivos

2.2.1 Equipos

Tabla 1-2. Equipos empleados en cada procedimiento

PROCEDIMIENTO	EQUIPO
Preparación del material vegetal	Estufa con extracción de aire RedLine by Binder
	Molino Arthur H. Thomas C.O
	Balanza analítica HDM
Obtención del extracto alcaloidal	Sonicador
	Rotavapor
	Sorbona
	pH-metro
Preparación de reactivos	Agitador magnético
	Sorbona
	pH-metro
	Agitador Vórtex

Conservación de reactivos	Refrigerador
	Congeladora (-20°C)
Determinación de la actividad inhibitoria de las enzimas colinesterasas	Lector de microplacas Thermo Scientific
	Computador
	Cronómetro
	Microcentrífuga para tubos Eppendorf
	Agitador Vórtex
Identificación de alcaloides	Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas

Realizado por: Evelin Montero, 2018

2.2.2 Materiales

Tabla 2-2. Materiales de laboratorio empleados en cada procedimiento

CANTIDAD	MATERIAL	PROCEDIMIENTO
3	Balón de aforo de 100mL	Preparación de reactivos
1	Balón de aforo de 500mL	
1	Probeta de 100mL	
1	Pipeta graduada de 10mL	
1	Pipeta graduada de 5mL	
2	Matraz de 1000mL	
1	Espátula	
1	Microespátula	
4	Frascos ámbar de 500mL	
1	Frasco ámbar de 1000mL	
1	Probeta de 1000mL	
1	Probeta de 100mL	
1	Papel filtro	
2	Vaso de precipitación de 500mL	
2	Vaso de precipitación de 250mL	
1	Balón para rotavapor de 1000mL	
1	Balón para rotavapor de 250mL	
1	Embudo de separación de 500mL	
1	Frasco de vidrio tipo vial de 5mL	

1	Desecador	Determinación de la actividad inhibitoria de las enzimas colinesterasas
1	Balón de aforo de 50mL	
1	Microespátula	
150	Tubos Eppendorf 5mL	
150	Tubos Eppendorf 0,5mL	
1	Tubo plástico graduados de 50mL	
2	Tubos plásticos graduados de 4mL	
14	Tubos plásticos graduados de 2mL	
1000	Puntas azules para micropipeta	
1500	Puntas amarillas para micropipeta	
1	Microplaca de 96 pocillos	
1	Dispensador de líquidos para pipeta multicanal	
-	Papel aluminio	
1	Piseta	

Realizado por: Evelin Montero, 2018

2.2.3 Reactivos

Tabla 3-2. Reactivos empleados en cada procedimiento

ENSAYO	REACTIVO
Obtención del extracto crudo	Metanol CH ₃ -OH
Extracción de alcaloides	Ácido sulfúrico H ₂ SO ₄ (2% V/V)
	Éter etílico (C ₂ H ₅) ₂ O
	Hidróxido de amonio NH ₄ OH (25% V/V)
	Acetato de etilo C ₄ H ₈ O ₂
	Sulfato de Sodio Anhidro Na ₂ SO ₄
	Goma arábiga
Determinación de la actividad inhibitoria de las enzimas colinesterasas	Ácido clorhídrico HCl 0,5N
	Hidróxido de sodio NaOH 0,5N
	Fosfato dipotásico K ₂ HPO ₄ 8mM
	Bifosfato de sodio NaH ₂ PO ₄ 2,3mM
	Cloruro de Sodio NaCl 0,15M
	Fosfato de disodio Na ₂ HPO ₄

	Ácido 5,5,-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) DTNB
	Yoduro de acetilticolina ATC
	Yoduro de butirilcolina
	Acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus electricus</i>
	Butirilcolinesterasa de suero de equino
	Galantamina
	Agua de grado farmacéutico

Realizado por: Evelin Montero, 2018

2.3 Recolección del material vegetal

Para la recolección del material vegetal se procesó el Acta de Movilización de Especímenes de Vida Silvestre No. 14-2017-DPAT-V.S dentro del Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos No. MAE-DNB-CM-2015-0054, del proyecto de investigación científica denominado; "LA BIODIVERSIDAD DE AMARYLLIDACEAE COMO FUENTE DE RECURSOS NATURALES PARA SU EXPLOTACIÓN SOSTENIBLE".

Con dicha autorización, se recolectaron 3 bulbos de la especie *Phaedranassa tunguraguae*, la misma que se encontraba en estado de floración, localizada en la ciudad de Baños, Provincia de Tungurahua – Ecuador

2.4 Identificación botánica

La identificación botánica de la especie *Phaedranassa tunguraguae* fue realizada por la Dra. Nora Óleas, botánica responsable del Herbario de la Universidad Tecnológica Indoamérica, Quito-Ecuador.

2.5 Preparación del material vegetal

El bulbo de *Phaedranassa tunguraguae* fue limpiado cuidadosamente y cortado en trozos pequeños de 1,5 cm aproximadamente, se dejó secar el material vegetal a 50°C por 36 horas en una estufa con extracción de aire. Una vez seco, el material fue triturado en un molino de cuchillas giratorias Arthur H. Thomas C.O.

A continuación, se pesaron 20 gramos de material seco y se maceró con 800 mL de metanol por un período de 50 horas, sometiendo la muestra a baño de ultrasonido en intervalos de 1 a 2 horas. Se filtró para obtener el extracto bruto líquido y se sometió a evaporación del solvente a presión reducida a una temperatura de 50°C, obteniendo así el extracto crudo.

2.6 Extracción de alcaloides

Se acidificó el extracto crudo utilizando 150 mL de H₂SO₄ (2% v/v), y se agregó éter etílico para desengrasar el extracto bruto ácido, la limpieza se realizó por 4 veces; obteniendo al finalizar una fase acuosa ácida, que contiene los alcaloides, y otra fase orgánica con metabolitos que no son de interés como ceras, mucílagos y clorofilas. (Acosta, 2013, p. 7)

La fase acuosa ácida se basificó utilizando NH₄OH (25% v/v) hasta alcanzar un pH de 10. Posteriormente, se realizó la extracción de los alcaloides usando para ello acetato de etilo en 4 repeticiones, en este caso los alcaloides se retienen en la fase orgánica, a la cual se le debe añadir sulfato de sodio anhidro y goma arábiga con el fin de absorber el agua que se quedó en la muestra. Se filtró el extracto y se sometió a evaporación por presión reducida a una temperatura de 50°C, obteniendo finalmente el extracto puro de alcaloides.

A continuación, se disolvió el extracto alcaloidal que se encontraba en el balón para rotavapor, con aproximadamente 4 mL de metanol y se colocó la muestra en un vial de vidrio para facilitar su manipulación. Por último se evaporó el metanol colocando la muestra en la estufa RedLine by Binder por un período de 24 horas. La muestra se conservó en un desecador a temperatura ambiente y protegida de la luz.

2.7 Identificación de alcaloides por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

Para realizar la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas se partió del extracto puro de alcaloides. El equipo que se empleó fue el Cromatógrafo de Gases Agilent, modelo 6890, acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico, modelo 5975, el mismo que opera a 70eV a 230°C en la fuente iónica.

La columna de la que dispone el cromatógrafo es SAPIENS-XS-MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), teniendo como fase estacionaria la fenilmetilsilicona al 5%.

La fluctuación de temperatura se dio de la siguiente manera:

- Incremento inicial desde 55°C hasta 100°C (60°C/min)
- Dos minutos a 100°C
- Incremento desde 100°C hasta 180°C (15°C/min)
- Un minuto a 180°C
- Incremento desde 180°C hasta 300°C (5°C/min)

La temperatura a la que se trabajó en el inyector fue de 280°C con un flujo de helio de 0,8 ml/min, y se usó el método *splitless*. Como alcaloide de referencia se empleó codeína. Para el análisis de los datos se utilizó un software llamado AMDIS 2.71 (NIST), este permitió verificar la pureza de las señales y realizar el cálculo de los índices de retención. (Bay-Smith, *et al.*, pp. 172 - 173)

2.8 Preparación de soluciones

2.8.1 Preparación de reactivos

PBS.- para elaborar esta solución se empleó fosfato dipotásico (K_2HPO_4) a una concentración de 8 mM, bifosfato de sodio (NaH_2PO_4) 2,3 mM, cloruro de sodio (NaCl) 0,15 M y agua de grado farmacéutico. Se ajustó el pH a 7,5 utilizando hidróxido de sodio (NaOH) 0,5N.

Para preparar la solución salina se empleó fosfato de disódio (Na_2HPO_4) a una concentración de 0,04 M y se ajustó el pH a 7,5 con ácido clorhídrico (HCl) 0,5N.

Las dos soluciones se conservaron en frascos ámbar de 500 mL a 4°C.

El DTNB se preparó a una concentración de 2mg/mL y se conservó en tubos Eppendorf a -20°C. El DTNB empleado fue D-8130, adquirido en la empresa Sigma-Aldrich.

2.8.2 Preparación de enzimas

Para AChE se empleó una concentración final de 0,195 U/mL y para BuChE la concentración fue de 0,260 U/mL. Se colocaron en tubos Eppendorf de 0,5 mL y se conservaron a -20°C.

Las enzimas empleadas fueron, AChE de anguila eléctrica *Electrophorus electricus* (C3389) y BuChE de suero de equino (C7512). Reactivos adquiridos en la empresa Sigma-Aldrich.

2.8.3 Preparación de sustratos

El sustrato de AChE se preparó empleando yoduro de ATC a una concentración de 1,7 mg/200µL. Por otro lado, el sustrato de BuChE consistió en yoduro de BTC 1,9 mg/200µL. Los sustratos se conservaron en tubos Eppendorf a una temperatura de -20°C.

Los sustratos empleados fueron yoduro de acetilcolina (A5751) y yoduro de butirilcolina (20820). Adquiridos en la empresa Sigma-Aldrich.

2.8.4 Galantamina (compuesto de referencia)

Para preparar la solución madre de galantamina se partió de comprimidos con una composición de 10 mg del fármaco por unidad. Se colocó la tableta en un tubo plástico tapa rosca y se agregó PBS hasta un volumen de 8 mL, se agitó por varios minutos para obtener la dilución completa de la galantamina y se centrifugó a 3600 RPM por 20 minutos. Finalmente se filtró el sobrenadante y se aforó a 10 mL con PBS, obteniendo así una concentración de 1 mg/mL.

A partir de la solución madre se elaboraron otras de distintas concentraciones: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 100 y 1000 μM . Se conservaron a una temperatura de 4°C.

2.8.5 Muestra de alcaloides de *Phaedranassa tunguraguae*

Partiendo del extracto puro de alcaloides se preparó una solución madre de 10 mg/mL. Para la homogenización de la muestra con el solvente y la completa disolución de los alcaloides, se aplicaron baños de ultrasonido en combinación con agitador vórtex.

Se dejó reposar la muestra con el fin de que las partículas insolubles se precipiten, para los ensayos se tomó el sobrenadante. Las diluciones utilizadas en los ensayos de inhibición enzimática se prepararon a partir de la solución madre, empleando PBS como disolvente.

Tabla 4-2. Concentraciones del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae* empleadas en el ensayo de inhibición de AChE y BuChE

Nº dilución	Conc. ($\mu\text{g/mL}$) del extracto para AChE	Conc. ($\mu\text{g/mL}$) del extracto para BuChE
1	100	200
2	50	150
3	20	100
4	10	50
5	5	20
6	1	10

Realizado por: Evelin Montero, 2018

Las diluciones se conservaron en tubos Eppendorf a 4°C.

2.9 Ensayos de inhibición enzimática de AChE y BuChE

Para los ensayos de inhibición enzimática se utilizaron microplacas de 96 pocillos marca Eppendorf.

Se empleó el método de Ellman et al. con algunas modificaciones, (Ellman *et al.*, 1961; Ortiz *et al.*, 2016) para ello se colocaron en los pocillos correspondientes a las muestras 50 μ L del extracto alcaloidal o del estándar galantamina disuelto en PBS y 50 μ L de AChE o BuChE disueltas en la misma solución, según el ensayo que se estuvo realizando.

Para preparar el blanco muestra se colocaron en los pocillos 50 μ L de la muestra y 150 μ L de PBS; para el control se tomaron 50 μ L de PBS y 50 μ L de enzima; finalmente para el blanco control se colocaron 100 μ L de PBS.

Las muestras se incubaron por 30 minutos a 21°C. Posteriormente, se añadieron 100 μ L del sustrato disuelto en solución salina, tanto en la muestra como en el control y blanco control. Las absorbancias se leyeron a 405 nm después de cinco minutos en el lector de microplacas Thermo Scientific.

2.10 Análisis de datos

Para el análisis se empleó Microsoft Excel en donde se procesaron las absorbancias obtenidas de las lecturas por triplicado para determinar el porcentaje de inhibición enzimática para cada muestra. La fórmula que se aplicó fue la siguiente:

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

En donde:

M: lectura de la muestra

C: lectura del control

BM: lectura del blanco muestra

BC: lectura del blanco control

2.10.1 Curva de inhibición enzimática para el cálculo del IC₅₀

La curva de inhibición enzimática se obtuvo a partir del gráfico porcentaje de inhibición (eje de ordenadas) vs. concentración del extracto alcaloidal (eje de abscisas), en dicha curva se añadió la línea de tendencia logarítmica y con la ecuación de la misma se realizó el cálculo del IC₅₀ cuyo valor representa la concentración del extracto de alcaloides a la cual existe un 50% de inhibición de las enzimas.

El IC₅₀ es el resultado \pm desviación estándar de tres repeticiones individuales, cada una por triplicado.

CAPITULO III

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados de la identificación y la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *Phaedranassa tunguraguae*, obtenidos a partir de los métodos descritos anteriormente.

3.1 Obtención del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae*

La extracción de alcaloides se basa en el carácter básico de estos metabolitos y en su presencia de forma natural en las plantas formando sales con ácidos orgánicos o como combinaciones solubles con otras sustancias, logrando disolverse bastante bien en soluciones acuosas o hidroalcohólicas (Arango, 2008, pp. 9-11). Es por ello que se consideró al metanol como el solvente adecuado para obtener el extracto crudo.

Tabla 1-3. Resultados de la obtención del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae*

Material Vegetal	Peso inicial de muestra seca (g)	Volumen de metanol (mL)	Extracto rico en alcaloides (mg)	%Rendimiento
Bulbo de <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	20	800	30,7	0,15 %

Realizado por: Evelin Montero, 2018

Gracias al método de extracción de alcaloides basado en cambios de pH y el uso de solventes orgánicos, se consiguió un rendimiento del 0,15% de alcaloides a partir de 20 gramos de bulbo seco de *Phaedranassa tunguraguae*. Se debe tomar en cuenta que los resultados podrían variar dependiendo del método de extracción.

3.2 Identificación de Alcaloides de *Phaedranassa tunguraguae* por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas

Tras haber realizado la identificación de los alcaloides de *Phaedranassa tunguraguae* por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas, se obtuvieron los resultados descritos a continuación en la tabla 2-3.

Tabla 2-3: Alcaloides identificados en el extracto purificado del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae* mediante CG-EM.

ALCALOIDE	Rt	RI	% Total
Licorina	25.733	2795.8	46.97
<i>Codeína*</i>	21.009	2472.7	20.61
<i>Sternbergina</i>	26.242	2831.4	4.95
<i>m/z 275 deaceticantabricina?</i>	22.554	2574.8	3.68
<i>Galantina</i>	24.795	2730.1	2.42
<i>Cantabricina</i>	23.505	2639.9	2.30
<i>m/z 294</i>	28.122	2963.1	1.39
<i>8-O-dimetilmaritidina</i>	21.965	2535.9	1.26
<i>m/z 228</i>	25.399	2772.4	1.26
<i>m/z 284</i>	27.991	2953.9	0.79
<i>m/z 264</i>	24.470	2707.4	0.73
<i>2-metoxipratosina</i>	29.867	3035.2	0.45
Galantamina	20.313	2426.7	0.36
<i>m/z 109 tipo homolicorina</i>	21.439	2501.1	0.35
<i>Dihidrolícorina</i>	25.528	2781.5	Trazas
<i>m/z 240</i>	25.874	2805.7	Trazas

Rt: tiempo de retención; **RI:** índice de retención; **%TOTAL:** porcentaje respecto al contenido total de alcaloides; **m/z:** relación masa/carga.

* Compuesto de referencia

Fuente: Universitat de Barcelona

Realizado por: Luciana Tallini, 2018

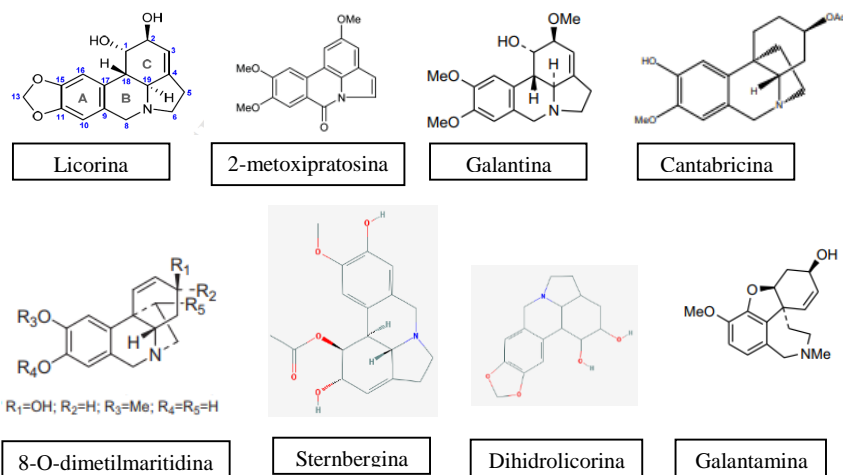


Figura 1-3. Estructuras de los alcaloides identificados en el extracto de alcaloides del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae*.

Fuente: (McNulty, J. *et al.* 2010; Nair, J., Aremu, A. y Van Staden, J. 2011; Ortiz, J. *et al.* 2012; Wu, W., *et al.* 2014)

En el extracto purificado de *Phaedranassa tunguraguae* se han aislado un total de 16 alcaloides y se han identificado 9 de ellos, de los cuales dos abarcan el mayor porcentaje, siendo licorina el más abundante con 46,97%.

Licorina ha sido ampliamente estudiada debido a las diversas actividades biológicas que presenta, sin embargo este alcaloide no tiene una buena actividad inhibitoria de enzimas colinesterasas, en este sentido se ha reportado en numerosos estudios que licorina es un alcaloide desprovisto de inhibición, (McNulty *et al.*, 2010, p. 5292) con un IC50 de 213 (Nair, *et al.*, 2011, p. 1105). Por lo tanto la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae* no se debe a la presencia del alto porcentaje de licorina.

Existen otros alcaloides de tipo licorina que poseen actividad inhibitoria de AChE muy efectiva, como el 1-O-acetil-licorina con IC50 0,93 (Nair, *et al.*, 2011, p. 1105). Estos presentan su actividad inhibitoria gracias a la presencia de un anillo aromático C junto con el nitrógeno cuaternario (Castillo *et al.*, 2017, p. 3).

La abundancia del alcaloide licorina en la naturaleza, en especies como *Phaedranassa tunguraguae*, es un fuerte incentivo para el desarrollo de un análogo con potencial actividad inhibitoria selectiva de AChE. Se ha comprobado que estas moléculas análogas a licorina, en especial las C1 y C2 sustituidas, son de baja toxicidad lo cual hace su estudio mucho más prometedor (McNulty *et al.*, 2010, p. 5292).

Se podría considerar a *Phaedranassa tunguraguae* como una fuente significativa de licorina, esto es importante porque se ha demostrado que esta molécula posee varias actividades biológicas; antiviral, antiinflamatoria, antitumoral, antibacterial, expectorante y emético (Bendaif *et al.*, 2018, p. 1).

En este sentido, estudios de los efectos antitumorales de licorina, han demostrado que este es efectivo en el tratamiento de la leucemia mielocítica crónica (Sun *et al.*, 2018, p. 10), además podría influir positivamente sobre los tumores de vejiga, el cáncer de mama y de pulmón (Sun *et al.*, 2018, p. 16)

Licorina ha demostrado ser un agente antibacterial eficaz frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae* (Bendaif *et al.*, 2018, p. 8).

Una investigación muestra que según ensayos *in silico* licorina cumple con los parámetros evaluados para considerar que tiene una buena biodisponibilidad oral. Los estudios de toxicidad *in silico* demuestran que no posee fragmentos causantes de mutagenicidad, tumorigenicidad, irritación, o efectos en la reproducción celular. (Bendaif *et al.*, 2018, p. 11)

Las características antes mencionadas hacen de licorina un buen candidato para futuros estudios y el desarrollo de un nuevo fármaco, y convierten a *Phaedranassa tunguraguae* en una opción para la extracción de este alcaloide.

Además, se reconocieron otros alcaloides en porcentajes minoritarios (<5%), como sternbergina con 4,95%, seguido de galantina con 2,42%, cantabricina con 2,30% y 8-O-dimetilmaritidina con 1,26%.

De los alcaloides antes nombrados, se ha reportado el potencial inhibitorio de AChE de galantina con un IC₅₀ 7,75 μM, sternbergina con un IC₅₀ 0,99 μM. (Sarıkaya *et al.*, 2013, p. 278) y 8-O-dimetilmaritidina con IC₅₀ 57,4 μM (Cahlíková *et al.*, 2015, p. 1190). Estos valores permiten deducir

que dichos alcaloides influyeron ampliamente en la obtención de los resultados finales en los ensayos de inhibición enzimática.

Se identificaron también dos alcaloides con porcentajes menores al 0,5%, estos fueron galantamina con 0,36%, 2-metoxipratosina con 0,45% y finalmente dihidrolicorina (trazas).

Aunque el extracto de alcaloides del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae* presenta un mínimo porcentaje de galantamina, este alcaloide posee un potente efecto inhibitorio reversible de AChE y BuChE y es modulador alostérico del receptor nicotínico de AChE (Storch et al., 1995; Grossberg, 2003), actualmente es uno de los fármacos más empleados en el tratamiento de la EA (Grossberg, 2003; Korábečny et al., 2017).

El beneficio clínico de galantamina es su capacidad para mejorar los síntomas clave de la enfermedad, teniendo por lo tanto un efecto positivo en la cognición, el funcionamiento global y la ejecución de las actividades cotidianas del individuo (Cahlíková et al., 2012, p. 573)

Dentro de los compuestos presentes en el extracto alcaloidal de *P. tunguraguae* también se detectó la presencia de siete moléculas no identificadas, m/z 109, m/z 275, m/z 264, m/z 228, m/z 240, m/z 284, y m/z 294; que en conjunto representan el 8,2%.

No se encontraron estudios fitoquímicos previos de *Phaedranassa tunguraguae*. Sin embargo, en comparación al perfil de alcaloides de otras especies como *Phaedranassa dubia*, *Phaedranassa cinerea*, y *Phaedranassa schizantha* muestra una composición que difiere ampliamente. (Vinueza, 2014; Inca, 2017; Salazar, 2017)

Como se evidencia en un estudio realizado sobre *Phaedranassa dubia* en el que ésta presentó licorina (54,10%) y assoanina (13,77%) como principales alcaloides (Inca, 2017, p. 36) . Por otro lado, una investigación sobre *Phaedranassa cinerea* reportó a galantamina como el componente mayoritario con 10,24% (Salazar, 2017, p.42). De la misma manera, un trabajo realizado sobre *Phaedranassa schizantha*, señaló que la especie presenta un alto porcentaje de hemantamina (20,5%) (Vinueza, 2014, p. 36).

3.3 Porcentaje de inhibición de AChE por el extracto de alcaloides del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae*

3.3.1 Primer screening de inhibición de AChE por el extracto alcaloidal del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae*

Para este ensayo se emplearon cuatro concentraciones iniciales con el fin de monitorizar el comportamiento de los alcaloides de *P. tunguraguae* frente a AChE. Los porcentajes de inhibición obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3-3. Porcentajes de inhibición de AChE por el extracto alcaloidal de *P. tunguraguae* obtenidos del primer screening

Extracto de alcaloides ($\mu\text{g/mL}$)	% de Inhibición de AChE*
1	$6,86 \pm 0,88$
10	$43,20 \pm 1,66$
50	$76,47 \pm 1,07$
100	$83,66 \pm 0,72$

*El resultado es el promedio de tres repeticiones
Realizado por: Evelin Montero, 2018

A partir de los resultados reportados en la tabla 3-3 se infirió que el valor del IC_{50} del extracto de alcaloides de la especie se encontraba entre 10 $\mu\text{g/mL}$ (43,20%) y 50 $\mu\text{g/mL}$ (76,47%).

Esta información sirvió como pauta para determinar las seis concentraciones definitivas a utilizar en los ensayos posteriores, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, las cuales permitirán obtener la ecuación de la recta, que será utilizada para determinar el valor del IC_{50} . (Cahlíková *et al.*, 2012, p. 573)

3.4 Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae* sobre AChE

Tabla 4-3. Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *P. tunguraguae* sobre AChE

COMPUESTO	IC ₅₀ AChE* (µg/mL)
Galantamina (compuesto de referencia)	0,30 ± 0,01 r ² = 0,99
Alcaloides de <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	11,12 ± 1,87 r ² = 0,99

*El resultado es el promedio de tres repeticiones
Realizado por: Evelin Montero, 2018

La actividad inhibitoria del extracto de alcaloides sobre las enzimas, expresada como IC₅₀, tuvo un valor de 11,12 ± 1,87 µg/mL para AChE como se muestra en la tabla 4-3. No existen estudios previos sobre la especie *P. tunguraguae* pero en investigaciones realizadas sobre otras especies del mismo género se reporta que *Phaedranassa dubia* presenta un IC₅₀ 25,48 ± 0,39 µg/mL (Inca, 2017, p. 46), y *Phaedranassa cinérea* muestra un IC₅₀ 37,60 ± 0,07 µg/mL (Salazar, 2017, p. 57). Estos valores exhiben una mayor actividad inhibitoria sobre AChE en los alcaloides de *P. tunguraguae* en comparación a otras especies del mismo género.

No obstante, si se compara dicha actividad con especies de otros géneros de Amaryllidaceae como algunas encontradas en Argentina, *Habranthus jamesonii* SJ, *Rhodophiala mendocina* NQN, que presentan un IC₅₀ 2,0 ± 0,11 µg/mL y 2,0 ± 0,20 µg/mL respectivamente (Ortiz *et al.*, 2012, p. 13475), se puede observar claramente que estas poseen una actividad inhibitoria mucho mayor a la obtenida por *P. tunguraguae*.

Por otro lado, investigaciones de algunas especies demuestran actividades inferiores, así por ejemplo, *Nerine filamentosa* IC₅₀ 21,6 ± 1,1 µg/mL y *Nerine filifolia* IC₅₀ 18,5 ± 0,8 µg/mL (Cahlíková *et al.*, 2012, p. 573)

En cuanto a galantamina, para AchE se obtuvo un IC₅₀ 0,30 ± 0,01 µg/mL, este valor es similar al obtenido por Ortiz et al (2012) IC₅₀ 0,29 ± 0,07 µg/mL. Estos resultados demuestran que el extracto alcaloidal tiene una actividad inferior al compuesto de referencia, pero que es relativamente destacable.

3.5 Porcentaje de inhibición de BuChE por el extracto de alcaloides del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae*

3.5.1 Primer screening de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae*

Se seleccionaron cuatro concentraciones iniciales 1, 10, 50 y 100 µg/mL para evaluar el comportamiento de los alcaloides frente a BuChE. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 5-3. Porcentajes de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal de *P. tunguraguae* obtenidos del primer screening.

Extracto (µg/mL)	% Inhibición de BuChE*
1	0
10	0
50	26,41 ± 1,26
100	45,59 ± 0,92

*El resultado es el promedio de tres repeticiones
Realizado por: Evelin Montero, 2018

Los valores reportados en la tabla 5-3 indican que con la concentración máxima empleada (100 µg/mL) se logró apenas un 45,59% de inhibición enzimática, por lo que es necesario incrementar la concentración de alcaloides para los ensayos posteriores ya que para el cálculo del IC₅₀ se requieren al menos dos concentraciones que provoquen más del 50% de inhibición y dos por debajo del mismo; con el fin de garantizar el acoplamiento de los datos a la línea de tendencia.

3.5.2 Segundo screening de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae*

Debido a los resultados antes expuestos se seleccionaron cuatro nuevas concentraciones para evaluar nuevamente el grado de inhibición enzimática provocada por los alcaloides de *P. tunguraguae*. A continuación se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 6-3. Porcentajes de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal de *P. tunguraguae* obtenidos del segundo screening.

Extracto de alcaloides (µg/mL)	% de Inhibición de BuChE
20	24,81 ± 0,90
50	42,68 ± 0,90
150	67,83 ± 0,87
200	77,85 ± 0,88

*El resultado es el promedio de tres repeticiones

Realizado por: Evelin Montero, 2018

En la tabla 6-3 se observa que la concentración a la que se obtendrá un 50% de inhibición enzimática se encontraría entre 50 µg/mL (42,68%) y 150 µg/mL (67,83%). Estos nuevos resultados sirven como guía para determinar las concentraciones definitivas a emplearse en los ensayos posteriores, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 µg/mL.

3.6 Determinación de la actividad inhibitoria por el extracto de alcaloides del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae* sobre BuChE

Tabla 7-3. Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *P. tunguraguae* sobre BuChE

COMPUESTO	IC ₅₀ BuChE* (µg/mL)
Galantamina (compuesto de referencia)	4,31 ± 0,04 r ² = 0,98
Alcaloides de <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	64,49 ± 1,34 r ² = 0,99

*El resultado es el promedio de tres repeticiones

Realizado por: Evelin Montero, 2018

El ensayo de actividad inhibitoria del extracto sobre BuChE obtuvo un valor de IC₅₀ 64,49 ± 1,34 µg/mL lo que exhibe una mayor actividad frente a otras especies del género *Phaedranassa*, como en el caso de *P. dubia* que presentó un IC₅₀ 114,96 ± 4,94 µg/mL (Inca, 2017, p. 46) y *P. cinerea* IC₅₀ 108.51 ± 8,98 µg/mL (Salazar, 2017, p. 57). Esto se debe al distinto perfil de alcaloides que poseen las especies.

Sin embargo, en comparación con las especies antes mencionadas *Nerine filamentosa* IC_{50} $13,0 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$ y *Nerine filifolia* IC_{50} $58,6 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$ (Cahlíková *et al.*, 2012, p. 573) el extracto alcaloidal de *P. tunguraguae* es menos activo.

La inhibición de BuChE es indispensable ya que esta enzima puede hidrolizar fácilmente la acetilcolina. Cuando la EA es severa los niveles de BuChE se ven anormalmente incrementados, por lo que es importante que existan compuestos que inhiban ambas enzimas. (Cahlíková *et al.*, 2012, p. 571)

Como se puede apreciar en la tabla 7-3 la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *P. tunguraguae* es mucho mayor para AChE. En ese sentido, se ha demostrado en varios estudios que los alcaloides de la familia Amaryllidaceae inhiben bastante bien AChE y en menor medida BuChE, ya que muestran mayor selectividad por la primera enzima. (Ortiz *et al.*, 2016, p. 1241)

En comparación al compuesto de referencia que presentó un IC_{50} $4,31 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ para BuChE, la fracción de alcaloides de *P. tunguraguae* tiene menor actividad inhibitoria.

CONCLUSIONES

Se realizó la extracción de los alcaloides del bulbo seco y triturado de la especie *Phaedranassa tunguraguae* mediante un método basado en el uso de solventes orgánicos y el cambio de pH, con un rendimiento de 0,15%

Aplicando el método de Ellman con modificaciones, se evaluó la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *P. tunguraguae* sobre AChE y BuChE, obteniendo valores de IC₅₀ 11,12 ± 1,87 µg/mL y 64,49 ± 1,34 µg/mL, respectivamente, datos que demuestran una menor actividad frente al compuesto de referencia cuyos valores fueron de IC₅₀ 0,30 ± 0,01 µg/mL para AChE y 4,31 ± 0,04 µg/mL para BuChE y una mayor actividad inhibitoria enzimática frente a otras especies de *Phaedranassa*.

Empleando como método la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se reconocieron 8 alcaloides y se detectó la presencia 7 moléculas aun no identificadas en la fracción alcaloidal del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae*; licorina representó el mayor porcentaje con 46,97%. Se encontraron también alcaloides como sternbergina con 4,95%, galantina con 2,42%, cantabricina con 2,30% y 8-O-dimetilmaritidina con 1,26%.

RECOMENDACIONES

Debido a la escasez de investigaciones sobre *P. tunguraguae* se recomienda realizar más estudios fitoquímicos y de actividad biológica, así se podrá resaltar su valor y cuidar su existencia única en el país.

Puesto que se descubrió un alto contenido de licorina en los bulbos de *P. tunguraguae* se recomiendan estudios posteriores con este alcaloide y sus derivados que han demostrado tener muchas actividades biológicas importantes para el ser humano.

Para elucidar las estructuras de los 7 alcaloides no identificados se recomienda un análisis de resonancia magnética nuclear, en especial de m/z 275 que se encontró en un 3,68%.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, K., *Identificación de los alcaloides de Stenomesson aurantiacum (Kunth) Herb.* [en línea], (Tesis) (Maestría) Universitat de Barcelona, España. 2013 pp. 1-26. [Consulta: 28 Enero 2018] Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1541/1/T-SENESCYT-00674.pdf>.

ADSERSEN, A., et al. "Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 113, no. 1, (2007) pp. 179-182. ISSN 03788741. DOI 10.1016/j.jep.2007.05.006.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION, Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia* [en línea] 2017, pp. 1-50. [Consulta: 13 Diciembre 2017] ISSN 15525279. DOI 10.1016/j.jalz.2017.02.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2017.02.001>.

ARANGO, G.J., *Alcaloides y compuestos nitrogenados.* Medellín - Colombia. Universidad de antioquia, 2008. pp. 2-10.

ARCE, M.P., et al. "Neuroprotective and cholinergic properties of multifunctional glutamic acid derivatives for the treatment of Alzheimer's disease". *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 52, no. 22, (2009) pp. 7249-7257. ISSN 00222623. DOI 10.1021/jm900628z.

BASTIDA, J., LAVILLA, R. y VILADOMAT, F., "Chapter 3 Chemical and Biological Aspects of Narcissus Alkaloids." *Alkaloids: Chemistry and Biology*, vol. 63, no. 6, (2006) pp. 87-179. ISSN 10994831. DOI 10.1016/S1099-4831(06)63003-4.

BAYRAK, Ç., et al. The first synthesis of 4-phenylbutenone derivative bromophenols including natural products and their inhibition profiles for carbonic anhydrase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Bioorganic Chemistry*, vol. 72, (2017) pp. 359-366. ISSN 10902120. DOI 10.1016/j.bioorg.2017.03.001.

BAY-SMIDT, M.G.K., et al. "Phylogenetic selection of target species in Amaryllidaceae tribe Haemantheae for acetylcholinesterase inhibition and affinity to the serotonin reuptake transport protein." *South African Journal of Botany* [en línea], 2011, vol. 77, no. 1, pp. 175-183. [Consulta: 10 Enero 2018] ISSN 02546299. DOI 10.1016/j.sajb.2010.07.016. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2010.07.016>.

BENDAIF, et al. "Antibacterial activity and virtual screening by molecular docking of lycorine from *Pancreatium foetidum* Pom (Moroccan endemic Amaryllidaceae)". *Microbial Pathogenesis* [en línea], 2018. vol. 115, pp. 138-145. [Consulta: 20 Enero 2018] ISSN 10961208. DOI 10.1016/j.micpath.2017.12.037. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.037>.

CABRAL, E., et al. "Amaryllidaceae . In: Monocotiledóneas Diversidad Vegetal Biotaxonomía de Spermatofitas". *Corrientes*: vol. 23, no. 12 (2010.), pp. 89 - 94.

CAHLÍKOVÁ, L., et al. "Alkaloids from some amaryllidaceae species and their cholinesterase activity". *Natural Product Communications* [en línea], 2012., vol. 7, no. 5, pp. 571-574. [Consulta: 12 diciembre 2017] ISSN 1934578X. Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84861493826&partnerID=tZOtx3y1>.

CAHLÍKOVÁ, L., et al. "In Vitro Inhibitory Effects of 8-O-Demethylmaritidine and Undulatine on Acetylcholinesterase and Their Predicted Penetration across the Blood-Brain Barrier". *Journal of Natural Products*, vol. 78, no. 6, (2015) pp. 1189-1192. ISSN 15206025. DOI 10.1021/acs.jnatprod.5b00191.

CASTILLO, W.O., et al. "Exploration of the Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Alkaloids from Amaryllidaceae Family by Molecular Docking In Silico". *Neurochemical Research*, vol. 42, no. 10, (2017). pp. 2826-2830. ISSN 15736903. DOI 10.1007/s11064-017-2295-8.

CHIGURUPATI, S., et al. "Identification of novel acetylcholinesterase inhibitors:

Indolopyrazoline derivatives and molecular docking studies". *Bioorganic Chemistry* [en línea], 2016, vol. 67, pp. 9-17. [Consulta: 2 Enero 2017] ISSN 10902120. DOI 10.1016/j.bioorg.2016.05.002. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.05.002>.

CORTES, N., et al. "Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [en línea], 2015, vol. 102, pp. 222-228. [Consulta: 2 Enero 2017] ISSN 1873264X. DOI 10.1016/j.jpba.2014.09.022. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.022>.

DONG, B., et al. "Short and efficient synthesis of Guillou's Galanthamine intermediate". *Tetrahedron* [en línea], vol. 73, 2017, no. 32, pp. 4719-4722. [Consulta: 3 Noviembre 2017] ISSN 14645416. DOI 10.1016/j.tet.2017.06.019. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2017.06.019>.

ECUADOR. SECRETARIA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO, *Plan Nacional del Buen Vivir 2013-2017*. [En línea] 2013. [Consulta: 8 Noviembre 2017] Disponible en: <http://www.buenvivir.gob.ec/objetivo-3.-mejorar-la-calidad-de-vida-de-la-poblacion>

ECUADOR. SECRETARIA TÉCNICA PLAN TODA UNA VIDA, *Plan Nacional de Desarrollo "Toda Una Vida" 2017 - 2021*. [En línea] 2017. [Consulta: 15 Febrero 2018] Disponible en: <http://www.todaunavida.gob.ec/valores-mision-vision/>

ELLMAN, G.L., et al. "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". *Biochemical Pharmacology* [en línea], 1961, vol. 7, no. 2, pp. 88-95. [Consulta: 20 Noviembre 2017] ISSN 00062952. DOI 10.1016/0006-2952(61)90145-9. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION *Artículos en Español*. [En línea] 2016 [Consulta 11 Octubre 2017] Disponible en:

<https://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ConsumerUpdatesEnEspanol/ucm520530.htm>

GOEDERT, M. y SPILLANTINI, M.G., "A century of Alzheimer's disease" *Science*, vol. 314, no. 5800, (2006) pp. 777-781. ISSN 00368075. DOI 10.1126/science.1132814.

GROSSBERG, G.T., "Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Getting on and staying on." *Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental*, vol. 64, no. 4, (2003) pp. 216-235. ISSN 0011393X. DOI 10.1016/S0011-393X(03)00059-6.

INCA, S., "*Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de Phaedranassa dubia*" (tesis) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador. 2017. pp. 36-47

KORÁBEČNÝ, J., et al. "Newly developed drugs for Alzheimer's disease in relation to energy metabolism, cholinergic and monoaminergic neurotransmission". *Neuroscience* [en línea], 2017, [Consulta: 20 Enero 2018] ISSN 18737544. DOI 10.1016/j.neuroscience.2017.06.034. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.06.034>.

LEÓN-YÁNEZ, S., et al. *Libro Rojo*. Segunda edición. Quito - Ecuador: Publicaciones del Herbario QCA, 2011 Pontificia Universidad Católica del Ecuador. ISBN 9789942033932.

LOBBENS, E.S.B., et al. "Screening of plants used in the European traditional medicine to treat memory disorders for acetylcholinesterase inhibitory activity and anti amyloidogenic activity". *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], 2017, vol. 200, pp. 66-73. [Consulta: 10 Diciembre 2018] ISSN 18727573. DOI 10.1016/j.jep.2017.02.020. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.020>.

LÓPEZ, S., et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life Sciences*, vol. 71, no. 21, 2002. pp. 2521-2529. ISSN 00243205. DOI 10.1016/S0024-3205(02)02034-9.

LÓPEZ, J., *Artículos de divulgación* - De una planta nivosa del Cáucaso a un medicamento contra la enfermedad de alzhéimer. [En línea] 2014. [Consulta: 7 Diciembre 2017] Disponible en: <http://www.info-farmacia.com/medico-farmaceuticos/informes-tecnicos/de-una-planta-nivosa-del-caucaso-a-un-medicamento-contra-la-enfermedad-de-alzheimer>

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, vol. 20, no. 17, pp. 5290-5294. [Consulta: 20 Enero 2018] ISSN 0960894X. DOI 10.1016/j.bmcl.2010.06.130. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.06.130>.

MEEROW, A. et al., Amaryllidaceae. *in* G. Harling and L. Andersson, editors. Flora of Ecuador, Vol. 41. University of Gotenborg; Riksmuseum, 1990 pp. 123 -132.

MEEROW, A. et al., The families and genera of vascular plants. Flowering plants monocotyledons. Liliace (except Orchidaceae) . In: Amaryllidaceae Kubitzki, K.. Berlin: Springer-Verlag, 1998 pp. 83-110.

MEEROW, A., JOST, L. y OLEAS, N., "Two new species of endemic Ecuadorean Amaryllidaceae (Asparagales, Amaryllidaceae, Amarylloideae, Eucharideae)". *PhytoKeys* [en línea], 2015, vol. 48, pp. 1-9. [Consulta: 4 Noviembre 2017] ISSN 1314-2003. DOI 10.3897/phytokeys.48.4399. Disponible en: <http://phytokeys.pensoft.net/articles.php?id=4399>.

MINGA, D., et al. "A new species of Phaedaranassa (Amaryllidaceae) from Ecuador". *Phytotaxa*, vol. 192, no. 1, (2015) pp. 50-53. ISSN 11793163. DOI 10.11646/phytotaxa.192.1.6.

NAIR, J.J., AREMU, A.O. y VAN STADEN, J., "Isolation of narciprimine from *Cyrtanthus contractus* (Amaryllidaceae) and evaluation of its acetylcholinesterase inhibitory activity". *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], (2011) vol. 137, no. 3, pp. 1102-1106. [Consulta: 12 Enero 2018] ISSN 03788741. DOI 10.1016/j.jep.2011.07.028. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.028>.

NEERGAARD, J.S., et al. "Alkaloids from *Boophone disticha* with affinity to the serotonin transporter". *South African Journal of Botany* [en línea], 2009, vol. 75, no. 2, pp. 371-374. [Consulta: 15 Enero 2018] ISSN 02546299. DOI 10.1016/j.sajb.2009.02.173. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2009.02.173>.

OLEAS, N., Landscape Genetics of *Phaedranassa* Herb . (*Amaryllidaceae*) in Ecuador. (Tesis) (Doctoral) Florida International University. Florida - Estados Unidos 2011. pp. 50-54

OLEAS, N.H., MEEROW, A.W. y ORTEGA, J. "Population Dynamics of the Endangered Plant, *Phaedranassa tunguraguae*, from the Tropical Andean Hotspot." *Journal of Heredity*, vol. 103, no. 4, (2012) pp. 557-569. [Consulta: 20 Octubre 2017] ISSN 00221503. DOI 10.1093/jhered/ess020.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD *Centro de Prensa*. [En línea] 2017 [Consulta 19 Enero 2018] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>

ORTIZ, J.E., et al. "Wild argentinian amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids." *Molecules*, vol. 17, no. 11, (2012) pp. 13473-13482. ISSN 14203049. DOI 10.3390/molecules171113473.

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*, vol. 79, no. 5, (2016) pp. 1241-1248. ISSN 15206025. DOI 10.1021/acs.jnatprod.5b00785.

PACIFIC BULB SOCIETY Wiki, [En línea] 2016. [Consulta 2 Octubre 2017] Disponible en: <http://pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Phaedranassa>

PAGLIOSA, L. et al., Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine*, Vol. 17, (2010) pp. 698 - 701.

RAHIM, F., et al. Synthesis, molecular docking, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory potential of thiazole analogs as new inhibitors for Alzheimer disease. *Bioorganic Chemistry* [en línea], 2015, vol. 62, pp. 106-116. [Consulta 1 Febrero 2018] ISSN 10902120. DOI 10.1016/j.bioorg.2015.08.002. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.08.002>.

RÍOS, M., et al. *Plantas Útiles del Ecuador*. Quito - Ecuador. Ediciones Abya - Yala, 2007. pp. 338-362.

RONSTED, N., et al. Can phylogenetics predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of Amaryllidaceae. *BMC Evolutionary Biology*, vol. 12, no. 182, (2012) pp. 24-29. DOI 10.1186/1471-2148-12-182.

SALAZAR, C. "Determinación de actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Phaedranassa cinerea*" (tesis) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador 2017. pp. 42-52

SARIKAYA, B.B., et al. "Phytochemical investigation of *Galanthus woronowii*". *Biochemical Systematics and Ecology* [en línea], 2013, vol. 51, pp. 276-279. [Consulta: 23 Enero 2018] ISSN 03051978. DOI 10.1016/j.bse.2013.09.015. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2013.09.015>.

SINGH, M., et al. "Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection". *European Journal of Medicinal Chemistry* [en línea], 2013, vol. 70, pp. 165-188. [Consulta: 21 Diciembre 2017] ISSN 17683254. DOI 10.1016/j.ejmech.2013.09.050. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.050>.

STAFFORD, G.I., et al. "Review on plants with CNS-effects used in traditional South African medicine against mental diseases". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 119, no. 3, (2008) pp. 513-537. ISSN 03788741. DOI 10.1016/j.jep.2008.08.010.

STORCH, A., et al. "Physostigmine, galanthamine and codeine act as «noncompetitive nicotinic receptor agonists» on clonal rat pheochromocytoma cells". *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, vol. 290, no. 3, (1995) pp. 207-219. ISSN 09224106. DOI 10.1016/0922-4106(95)00080-1.

SUN, Y., et al. "Lycorine possesses notable anticancer potentials in on-small cell lung carcinoma cells via blocking Wnt/ β -catenin signaling and epithelial-mesenchymal transition (EMT)". *Biochemical and Biophysical Research Communications* [en línea], 2018, vol. 495, no. 1, pp. 911-921. [Consulta: 25 Enero 2018] ISSN 10902104. DOI 10.1016/j.bbrc.2017.11.032. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.032>.

TALESA, V.N., "Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease". *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 122, no. 16, (2001) pp. 1961-1969. ISSN 00476374. DOI 10.1016/S0047-6374(01)00309-8.

VÁSCONEZ, L. y OSORIO, J., Variación de la Actividad de la Enzima Butirilcolinesterasa en Usuarios de Anticonceptivos Hormonales. *Anales de la Facultad de Medicina*, Vol.61 n°4, (2000) pp. 271-277.

VINUEZA G., " Tamizaje fitoquímico e identificación de alcaloide de *Phaedranassa schizanta Baker.* " (tesis) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador. 2014. p. 33.

WU, W.M., et al. "Two new alkaloids from the bulbs of *Lycoris sprengeri*" *Journal of Asian Natural Products Research*, vol. 16, no. 2, (2014) pp. 192-199. ISSN 10286020. DOI 10.1080/10286020.2013.864639.

ZHAN, G., et al. "Amaryllidaceae alkaloids with new framework types from *Zephyranthes candida* as potent acetylcholinesterase inhibitors" *European Journal of Medicinal Chemistry* [en línea], 2017, vol. 127, pp. 771-780. [Consulta: 30 Enero 2018] ISSN 17683254. DOI 10.1016/j.ejmech.2016.10.057. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.057>.

ANEXOS

ANEXO A. Recolección del material vegetal



Especie *Phaedranassa tunguraguae*
recolectada en la ciudad de Baños –
Tungurahua, Ecuador.

ANEXO B. Obtención del extracto crudo del bulbo de *Phaedranassa tunguraguae*



Maceración, con intervalos de
sonicación para optimizar el proceso



Recuperación del solvente por
aplicación de presión y temperatura

ANEXO C. Obtención del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae*



Limpieza y desengrasado del extracto
bruto ácido.

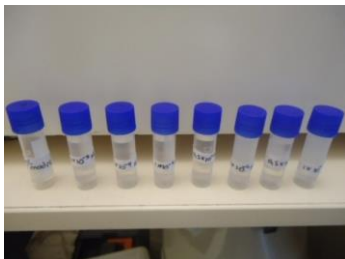


Adición de sulfato de sodio anhidro y
goma arábica para absorber el agua
restante de la muestra.



Extracto puro de alcaloides de
Phaedranassa tunguraguae

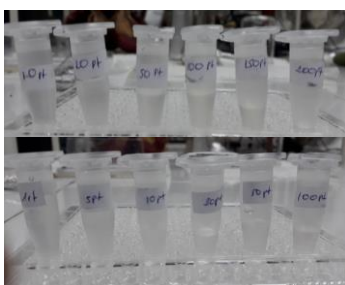
ANEXO D. Reactivos, enzimas, sustratos y muestras.



Soluciones de galantamina a distintas concentraciones



PBS y solución salina en sus envases de almacenamiento



Extracto alcaloidal a distintas concentraciones utilizadas en los ensayos de inhibición de BuChE y AChE



Solución madre (10mg/mL) del extracto de alcaloides de *Phaedranassa tunguraguae*

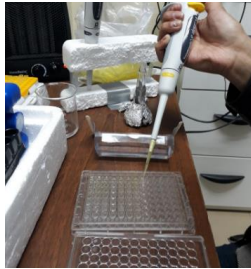


Preparación de sustratos



Almacenamiento de enzimas y sustratos

ANEXO E. Ensayo de inhibición de AChE y BuChE



Preparación de la microplaca de 96 pocillos



Lector de microplaca y computador en el que se procesaron los resultados

ANEXO F. Curva de inhibición de acetilcolinesterasa. Porcentaje de inhibición de AChE vs. concentración del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae*. (GF1, GF2, GF3)

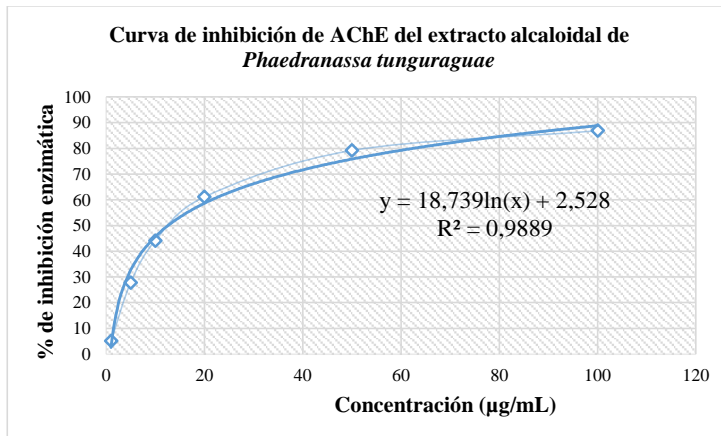


Gráfico 1F. Ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal. Primera repetición.

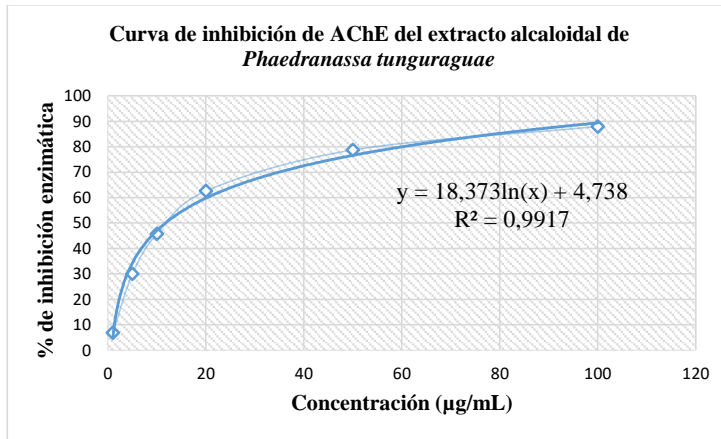


Gráfico 2F. Ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal. Segunda repetición.

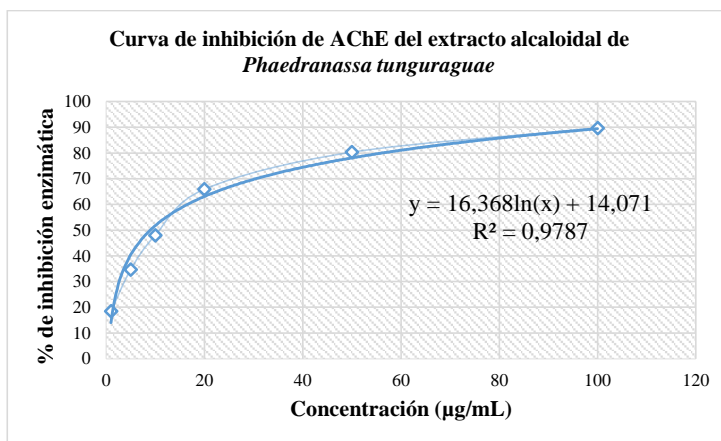


Gráfico 3F. Ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal. Tercera repetición.

ANEXO G. Curva de inhibición de butirilcolinesterasa. Porcentaje de inhibición de BuChE vs. concentración del extracto alcaloidal de *Phaedranassa tunguraguae*. (GG1, GG2, GG3)

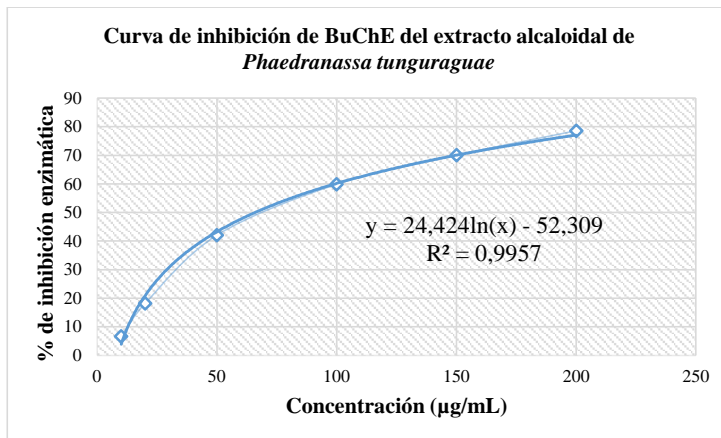


Gráfico 1G. Ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal. Primera repetición.

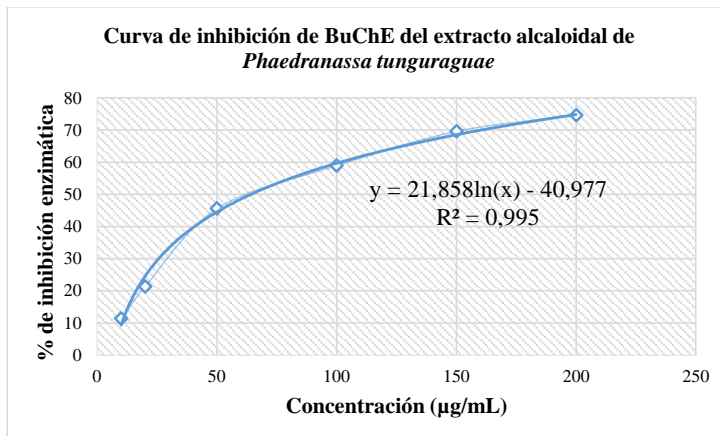


Gráfico 2G. Ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal. Segunda repetición.

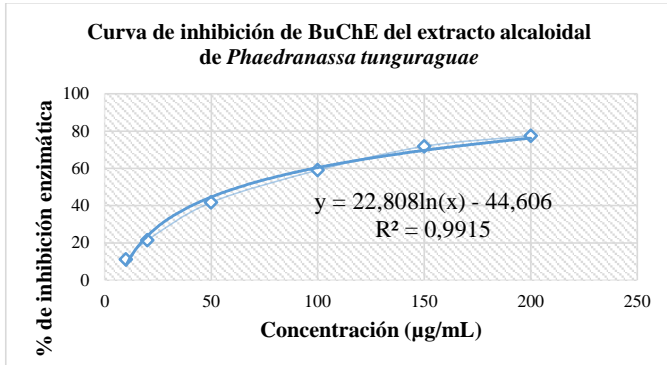


Gráfico 3G. Ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal. Tercera repetición.

ANEXO H. Acta de Movilización de *Phaedranassa tunguraguae*



DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE TUNGURAHUA
UNIDAD DE PATRIMONIO NATURAL- VIDA SILVESTRE

ACTA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE VIDA SILVESTRE No. 14-2017-DPAT-V.S

En la ciudad de Ambato, a los 10... días del mes de ...agosto... de 2017, el Señor Edwin Lozada L. RESPONSABLE DE VIDA SILVESTRE- UNIDAD DE PATRIMONIO NATURAL DE TUNGURAHUA, autoriza al Señor (a) : Karen Lisseth Acosta León para que realice la movilización de las muestra botánicas de flora silvestre, de acuerdo al siguiente detalle:

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	NÚMERO	DESCRIPCIÓN	OBSERVACIONES
Amaryllidaceae	Phaedranassa tunguraguae (Amaryllidaceae)	3	bulbos	Las muestras botánicas serán movilizadas dentro del contrato Marco de Acceso a Recurso genético N° MAE-DNB-CM-2015-0054, denominado "LA BIODIVERSIDAD DE AMARYLLIDACEAE COMO FUENTE DE RECURSOS NATURALES PARA SU EXPLOTACIÓN SOSTENIBLE".
TOTAL		3		

Las muestras de flora silvestre se moviliza en calidad de:

Custodia temporal () Trabajo investigativo (X)
Comercio ()
Taxidermia ()

Se moviliza desde:..... la Ciudad de Baños, Cantón Baños de Agua Santa, Provincia de Tungurahua.....

Hasta: Universidad Tecnológica Indoamérica (calles Machala y Sabanilla s/n, Ciudad de Quito, Provincia de Pichincha.....

Fecha de movilización..... lunes 14 de agosto de 2017.....

Vehículo, Marca..... Cooperativa de Transportes y Turismo Baños...placas.....

Portador :.....Karen Lisseth Acosta León..... Cédula:100308901-6.....

Edwin Lozada López
VIDA SILVESTRE TUNGURAHUA



Karen Lisseth Acosta León
RECIBO CONFORME