



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE
ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL
EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Eucrosia mirabilis*”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para obtener el grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: DOUGLAS FERNANDO CARRILLO YÁNEZ

TUTOR: LCDA. KAREN ACOSTA, M.Sc.

Riobamba - Ecuador

2018

® 2018, Douglas Fernando Carrillo Yáñez

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de Titulación de Tipo Experimental: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Eucrosia mirabilis*”**, de responsabilidad del señor Douglas Fernando Carrillo Yánez, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Lcda. Karen Acosta., M.Sc.

2018 – 04 – 25

DIRECTORA DEL TRABAJO

DE TITULACIÓN

BQF. Aida Miranda., M.Sc.

2018 – 04 – 25

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Douglas Fernando Carrillo Yánez soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Douglas Fernando Carrillo Yánez

DEDICATORIA

A Dios, por darme la sabiduría y las fuerzas necesarias para lograr un objetivo más en mi vida, a mis padres por estar siempre junto a mí, brindándome su amor, confianza y consejos para tomar las mejores decisiones, a mis hermanas por ser el motivo de mi felicidad y por tener su apoyo incondicional.

A mis abuelitos que desde el cielo guían cada uno de mis pasos, a mis compañeros y docentes por el apoyo y los conocimientos compartidos durante mi formación profesional.

Fernando

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la vida y la sabiduría necesaria para enfrentar y superar cada obstáculo que se presentó a lo largo de toda mi vida.

A mis padres María y Gonzalo que son la razón de mi existir, son mi ejemplo a seguir, gracias por darme su amor, tiempo y consejos para tomar las mejores decisiones, por el apoyo y la fe que depositaron en mí para cumplir con este sueño.

A mis abuelitos que desde el cielo han guiado cada uno de mis pasos, a mis hermanas, amigos, primos, tíos y toda mi familia que siempre han estado en los momentos más difíciles de mi vida.

A verito, por su apoyo incondicional prestada a lo largo de mi carrera, por compartir muchos momentos de satisfacción, tristeza y sobre todo por estar junto a mí en todo momento.

Agradezco de una forma muy especial a la Lcda. Karen Acosta, M.Sc., y a la BQF. Aida Miranda M.Sc., por brindarme su confianza, tiempo, conocimientos y por tener su amistad durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Y por último quiero agradecer al PhD. Jaume Bastida profesor del departamento de Biología, Salud y Medio Ambiente de la Universidad de Barcelona - España y a la Dra. Nora Oleas profesora del departamento de biología de la Universidad Tecnológica Indoamérica (UTI) Quito-Ecuador, agradeciendo infinitamente su contribución la cual fue un pilar fundamental para poder desarrollar el presente trabajo de titulación.

Fernando

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AChEI	Inhibidores de acetilcolinesterasa
BuChE	Butirilcolinesterasa
BuChEI	Inhibidores de butirilcolinesterasa
CYTED	Programa Iberoamericana de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
ChEs	Colinesterasas
DMT	Dimetilriptamina
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis (2 nitrobenzoico)
EA	Enfermedad del Alzheimer
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
GIPRONAF	Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia
HUTI	Herbario de la Universidad Tecnológica Indoamérica
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
MeOH	Metanol
OMS	Organización mundial de la salud

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xiv
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1.	MARCO TEÓRICO	5
1.1	Familia Amaryllidaceae.....	5
<i>1.1.1</i>	<i>Características de la familia Amaryllidaceae</i>	<i>5</i>
<i>1.1.2</i>	<i>Género Eucrosia.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.2.1</i>	<i>Especie Eucrosia mirabilis</i>	<i>8</i>
<i>1.1.3</i>	<i>Alcaloides de la familia Amaryllidaceae</i>	<i>9</i>
<i>1.1.3.1</i>	<i>Características estructurales de los alcaloides de la familia Amaryllidaceae</i>	<i>10</i>
<i>1.1.3.2</i>	<i>Galantamina.....</i>	<i>11</i>
1.2	Enfermedad del Alzheimer.....	12
<i>1.2.1</i>	<i>Descripción</i>	<i>12</i>
<i>1.2.2</i>	<i>Epidemiología y Factores de Riesgo</i>	<i>14</i>
<i>1.2.3</i>	<i>Tratamiento del Alzheimer.....</i>	<i>15</i>
<i>1.2.4</i>	<i>Acetilcolina y la Enfermedad del Alzheimer</i>	<i>16</i>
1.3	Acetilcolinesterasa.....	17
<i>1.3.1</i>	<i>Inhibidores de acetilcolinesterasa (AChEI)</i>	<i>17</i>
1.4	Butirilcolinesterasa	18
<i>1.4.1</i>	<i>Inhibidores de butirilcolinesterasa (BuChEI).....</i>	<i>19</i>
1.5	Método que determina los niveles de colinesterasas	19
<i>1.5.1</i>	<i>Técnica de Ellman et al. (1961)</i>	<i>19</i>

CAPÍTULO II

2.	METODOLOGÍA	21
2.1	Diseño y tipo del proyecto de investigación	21
2.1.1	<i>Muestra de análisis</i>	21
2.1.2	<i>Población de la muestra de Estudio</i>	21
2.2	Lugar de investigación	21
2.3	Recolección del material vegetal	22
2.4	Identificación botánica	22
2.5	Materiales, reactivos y equipos	22
2.5.1	<i>Materiales</i>	22
2.5.2	<i>Reactivos</i>	24
2.5.3	<i>Equipos</i>	25
2.6	Adaptación del material vegetal	25
2.7	Obtención de alcaloides	26
2.7.1	<i>Obtención del extracto bruto</i>	27
2.7.2	<i>Obtención del extracto alcaloidal</i>	27
2.8	Identificación de alcaloides a través de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	27
2.9	Preparación de las diluciones del extracto de alcaloides y de galantamina	28
2.9.1	<i>Muestra alcaloidal</i>	28
2.9.2	<i>Galantamina (Compuesto de referencia)</i>	29
2.10	Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE)	29
2.11	Análisis de Datos	30
2.11.1	<i>Porcentaje de inhibición</i>	30
2.11.2	<i>Curva para determinar la concentración inhibitoria media (IC₅₀)</i>	31

CAPÍTULO III

3.	OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	32
3.1	Obtención del extracto alcaloidal de la especie <i>Eucrosia mirabilis</i>	32
3.2	Porcentaje de rendimiento del extracto alcaloidal de los bulbos de <i>Eucrosia mirabilis</i>	32
3.3	Identificación de alcaloides mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	33
3.4	Dimetiltriptamina	34
3.5	Hidroxi-fedrina	35
3.6	Hordenina	36
3.7	Actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto alcaloidal de la especie <i>Eucrosia mirabilis</i>	37
3.7.1	<i>Análisis de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Eucrosia mirabilis</i> con respecto a acetilcolinesterasa (AChE)</i>	38
3.7.2	<i>Análisis de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Eucrosia mirabilis</i> con respecto a butirilcolinesterasa (BuChE)</i>	42
	CONCLUSIONES	46
	RECOMENDACIONES	47
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Nómina de materiales utilizados en el trabajo de investigación.....	23
Tabla 2-2:	Nómina de reactivos utilizados en el trabajo de investigación.....	24
Tabla 3-2:	Nómina de equipos utilizados en el trabajo de investigación.....	25
Tabla 4-2:	Diluciones de galantamina	29
Tabla 1-3:	Porcentaje de rendimiento del extracto alcaloidal de los bulbos de <i>Eucrosia mirabilis</i>	33
Tabla 2-3:	Alcaloides identificados mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM) del extracto alcaloidal de los bulbos de <i>Eucrosia mirabilis</i>	34
Tabla 3-3:	Porcentajes inhibitorios de AChE del primer ensayo del extracto alcaloidal de <i>Eucrosia mirabilis</i>	38
Tabla 4-3:	Porcentajes inhibitorios de AChE del segundo ensayo del extracto alcaloidal de <i>Eucrosia mirabilis</i>	39
Tabla 5-3:	Porcentajes inhibitorios de AChE del tercer ensayo del extracto alcaloidal de <i>Eucrosia mirabilis</i>	40
Tabla 6-3:	Concentración inhibitoria media (IC ₅₀) del extracto alcaloidal de <i>Eucrosia mirabilis</i> con respecto a acetilcolinesterasa (AChE)	41
Tabla 7-3:	Porcentajes inhibitorios de BuChE del primer ensayo del extracto alcaloidal de <i>Eucrosia mirabilis</i>	42
Tabla 8-3:	Porcentajes inhibitorios de BuChE del segundo ensayo del extracto alcaloidal de <i>Eucrosia mirabilis</i>	43
Tabla 9-3:	Porcentajes inhibitorios de BuChE del tercer ensayo del extracto alcaloidal de <i>Eucrosia mirabilis</i>	44
Tabla 10-3:	Concentración inhibitoria media (IC ₅₀) del extracto alcaloidal de <i>Eucrosia mirabilis</i> con respecto a butirilcolinesterasa (BuChE)	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Distribución de la familia Amaryllidaceae en el mundo.....	5
Figura 2-1:	Especies del género <i>Eucrosia</i> : a) <i>E. aurantiaca</i> , b) <i>E. bicolor</i> , c) <i>E. dodsonii</i> , d) <i>E. stricklandii</i> , e) <i>E. mirabilis</i>	7
Figura 3-1:	Distribución de las especies del género <i>Eucrosia</i> en Ecuador	7
Figura 4-1:	Especie <i>Eucrosia mirabilis</i> localizada en la provincia de Loja	9
Figura 5-1:	Estructuras representativas de los 9 tipos de alcaloides de la familia Amaryllidaceae	10
Figura 6-1:	Estructura química de la Galantamina	12
Figura 7-1:	Estructura de los ovillos neurofibrilares y de placas amiloides en la enfermedad del Alzheimer (EA)	13
Figura 8-1:	Estructura del sitio activo de acetilcolinesterasa	17
Figura 9-1:	Esquema del principio del método de Ellman et al. (1961)	20
Figura 1-2:	Esquema del proceso de extracción de alcaloides de los bulbos de la especie vegetal <i>Eucrosia mirabilis</i>	26
Figura 1-3:	Porcentaje de alcaloides presentes en el extracto de la especie vegetal <i>Eucrosia mirabilis</i>	33
Figura 2-3:	Estructura química del alcaloide Dimetiltriptamina	35
Figura 2-3:	Estructura química del alcaloide Hidroxiefedrina.....	36
Figura 3-3:	Estructura química del alcaloide Hordenina	37

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Obtención de la muestra vegetal de *Eucrosia mirabilis*.
- ANEXO B:** Adaptación de la muestra vegetal de *Eucrosia mirabilis*.
- ANEXO C:** Obtención del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*.
- ANEXO D:** Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*.
- ANEXO E:** Curvas inhibitorias de acetilcolinesterasa (AChE) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*, obteniendo la concentración inhibitoria media (IC₅₀) representada en el Gráfico 1E, Gráfico 2E y el Gráfico 3E.
- ANEXO F:** Curvas inhibitorias de butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*, obteniendo la concentración inhibitoria media (IC₅₀) representada en el Gráfico 1F, Gráfico 2F y Gráfico 3F.
- ANEXO G:** Permiso de movilización de bulbos de la especie vegetal *Eucrosia mirabilis*.

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el porcentaje de inhibición enzimática de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) por parte del extracto alcaloidal de bulbos de la especie vegetal *Eucrosia mirabilis*, perteneciente a la familia Amaryllidaceae y originaria del Ecuador. A partir del extracto bruto líquido obtenido mediante un proceso de maceración del material vegetal con metanol se procedió a obtener el extracto alcaloidal utilizando un protocolo basado en cambios de pH y el uso de solventes orgánicos, consiguiendo un porcentaje de rendimiento de extracción de alcaloides del 0,25 %. Para determinar la identidad y el porcentaje de los alcaloides presentes en el bulbo de *Eucrosia mirabilis* se realizó Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), identificando tres alcaloides: dimetiltriptamina (67,97 %), hidroxiefedrina (5,12 %) y hordenina (2,26 %). Para el análisis de la actividad inhibitoria se empleó el método colorimétrico de Ellman et al. (1961) con modificaciones de Ortiz et al. (2016), usando galantamina como compuesto de referencia y expresando el grado de inhibición enzimática a través de la concentración inhibitoria media (IC₅₀). El extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* presentó un valor de IC₅₀ para acetilcolinesterasa de 267,62 ± 26,78 µg/mL, mientras que para galantamina fue de 0,22 ± 0,02 µg/mL. Frente a butirilcolinesterasa presentó un IC₅₀ de 126,59 ± 11,65 µg/mL, siendo el valor de IC₅₀ de galantamina de 4,32 ± 0,43 µg/mL. Los resultados obtenidos indican que *Eucrosia mirabilis* tiene una baja actividad inhibitoria frente a las colinesterasas, sin embargo, se puede evidenciar que el extracto alcaloidal tiene mayor afinidad hacia butirilcolinesterasa (BuChE). Por otra parte, los alcaloides identificados no se han encontrado en otras especies de la familia Amaryllidaceae. Se recomienda efectuar estudios fitoquímicos y farmacológicos en otras especies del género *Eucrosia*, como es el caso de *E. bicolor* o *E. aurantiaca*, endémicas de Ecuador, debido a que en la actualidad las investigaciones acerca de este género son escasas.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FITOQUÍMICA>, <AMARYLLIDACEAE>, <BULBO (*Eucrosia mirabilis*)>, <ACTIVIDAD INHIBITORIA>, <COLINESTERASAS>, <GALANTAMINA>, <DMT (Dimetiltriptamina)>, <EXTRACTO DE ALCALOIDES>, <ENFERMEDAD DE ALZHEIMER>.

SUMMARY

The aim of this research was to evaluate the enzymatic inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) by means of the alkaloidal extract of bulbs of the vegetal specie *Eucrosia mirabilis*, belonging to the Amaryllidaceae family from Ecuador. Starting from the liquid brute extract obtained through a maceration process of the vegetal material with methanol, the next step was getting the alkaloidal extract using a method based on pH changes and organic solvents, obtaining a performance percentage of alkaloid extraction of 0,25 %. In order to find out the identity and percentage of the alkaloids within the *Eucrosia mirabilis* bulb, a gas chromatography and a mass spectrometry (CG-EM) were developed, coming across three alkaloids; dimethyltryptamine (67,97 %), hydroxyephedrine (5,12 %) and hordenine (2,26 %). For analyzing the inhibitory activity, the Ellman colorimetric method was used (1961) with Ortiz modifications (2016), using galantamine as reference compound and expressing the inhibition enzymatic degree through the mid inhibitory focusing (IC_{50}). The alkaloidal extract of *Eucrosia mirabilis* shown up an IC_{50} worth to acetylcholinesterase of $267,62 \pm 26,78 \mu\text{g/mL}$, while for galantamine was $0,22 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$. On the other hand, butyrylcholinesterase presented a IC_{50} of $126,59 \pm 11,65 \mu\text{g/mL}$, becoming the IC_{50} of galantamine $4,32 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$. The obtained results indicate that *Eucrosia mirabilis* has a low inhibitory activity against the cholinesterase ones, however, it is evident that the alkaloidal extract has higher kindship towards butyrylcholinesterase (BuChE). Moreover, the identified alkaloids were not found in other species of Amaryllidaceae family. As recommendation it is necessary to bring about phytochemical and pharmacological studies in other species from *Eucrosia* genre, such as *E. bicolor* or *E. aurantiaca*, from Ecuador because of the lack of researches in this field.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <PHYTOCHEMISTRY>, <AMARYLLIDACEAE>, <BULB (*Eucrosia mirabilis*)>, <INHIBITORY ACTIVITY>, <CHOLINESTERASE>, <GALANTAMINE>, <DMT (DIMETHYLTRYPTAMINE)>, <ALKALOID EXTRACT>, <ALZHEIMER DISEASE>.

INTRODUCCIÓN

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que afecta las capacidades cognitivas y funciones motoras de una persona alterando los procesos de memoria y otras funciones mentales como la forma de pensar, recordar o de comportarse, se manifiesta principalmente en personas de la tercera edad siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo (Fernandez, C., et al., 2015, p. 6).

La Asociación de Alzheimer estimó que alrededor de 48 millones de personas padecen esta enfermedad principalmente en los países subdesarrollados (Alzheimer's association, 2017, p. 5), es considerada por la Organización Mundial de la Salud como la enfermedad más común de demencia con un 60 % a 70 % de los casos y estima que el número de personas que presenten demencia pase de 76 millones en el año (2030) y 136 millones en el año (2050) (Organización Mundial de la Salud, 2017).

En 2017, se publicaron cerca de 7000 artículos científicos sobre la demencia demostrando resultados alentadores y posibles tratamientos para combatir dicha patología; sin embargo, es indispensable formar proyectos de investigación que se enfoquen en el diagnóstico, atención, prevención, reducción del riesgo y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Organización Mundial de la Salud , 2017).

Mediante la Federación Internacional del Alzheimer (ADI) se puede constatar que la enfermedad del Alzheimer es la cuarta causa de muerte en Ecuador afectando entre 80 mil a 100 mil personas (Federación Internacional del Alzheimer, 2015). Por ello, es necesaria la participación activa tanto de establecimientos de salud como del ámbito académico en el diseño de posibles tratamientos farmacológicos, con el propósito de mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad (Prada, S., et al., 2016, p. 50).

La enfermedad del Alzheimer es un tipo de demencia progresiva e irreversible, en la actualidad no está bien definido su origen pero una posible explicación a su aparición es el deterioro de la neurotransmisión colinérgica en el cerebro, lo que genera una pérdida de la actividad de acetilcolina o la agregación de la proteína β -amiloide en las placas seniles y de la proteína thau

en los ovillos neurofibrilares generando cambios arterioescleróticos cerebrales (Prada, S., et al., 2016, p. 52).

Por lo tanto, estudios farmacológicos realizados en la actualidad se enfocan en la inhibición de enzimas hidrolíticas como acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), las cuales cumplen una función indispensable en la neurotransmisión colinérgica en el cerebro reduciendo el metabolismo de la acetilcolina la misma que actúa en la transmisión de impulsos nerviosos y a su vez es parte crucial en el funcionamiento de la memoria (Quesada, C., et al., 2014, p. 55).

La galantamina es un alcaloide considerado como un inhibidor competitivo de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), se aisló por primera vez de la especie vegetal *Galanthus woronowii* y en la actualidad se obtiene a través de biosíntesis o en especies como *Galanthus nivalis* y *Leucojum aestivum* (López, J., 2014, p. 2). En el año 2001 fue aprobado por la FDA para el tratamiento paliativo para la EA, sin embargo su producción no es suficiente para cumplir con los requerimientos que presenta la población que padece esta patología (Ortiz, J., et al., 2012, p. 1576).

A través del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) y mediante la línea de investigación denominada “La Biodiversidad Iberoamericana como Fuente de Recursos Naturales para su Explotación Sostenible” (BIFRENES) cuyo objetivo es de fomentar bases que permita el aprovechamiento sostenible de recursos naturales a través de la realización de estudios fitoquímicos que permitan obtener nuevas fuentes de galantamina o principios activos similares a este alcaloide útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA) y otras enfermedades neurodegenerativas (CYTED, 2016).

Debido a la falta de estudios fitoquímicos y farmacológicos de especies de Amaryllidaceae ecuatorianas, las cuales pudiesen ser nuevas fuentes de galantamina u otros alcaloides que presenten una elevada afinidad hacia el SNC y una alta actividad inhibitoria de las colinesterasas (AChE) y (BuChE), esta investigación pretende ampliar el campo de conocimiento sobre esta familia vegetal.

El principal objetivo del presente trabajo de investigación es analizar la actividad inhibitoria de las colinesterasas (AChE) y (BuChE) del extracto alcaloidal de los bulbos de la especie vegetal *Eucrosia mirabilis*, especie que pertenece a la familia Amaryllidaceae ubicada en los alrededores

del cantón Catamayo de la provincia de Loja - Sierra Ecuatoriana y de esta manera contribuir en la investigación científica del país y en la búsqueda de nuevas fuentes de alcaloides farmacológicamente activos que contrarresten la enfermedad del Alzheimer.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y buritrilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Eucrosia mirabilis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el extracto de alcaloides de los bulbos de *Eucrosia mirabilis* mediante un protocolo basado en cambios de pH y el uso de solventes orgánicos.
- Identificar los alcaloides presentes en el extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).
- Determinar la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* frente a acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) mediante el método colorimétrico de Ellman et al. (1961) con modificaciones de Ortiz et al. (2016).

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Familia Amaryllidaceae

1.1.1 Características de la familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae está formada por plantas monocotiledóneas que se caracterizan por ser perennes, herbáceas, la mayoría tienen bulbos que se consideran como raíces modificadas y presentan flores muy vistosas de diversos colores. En la figura 1-1 se puede observar la distribución de esta familia vegetal, se desarrolla esencialmente en zonas tropicales, encontrándose principalmente en la región mediterránea de Europa, Norte - Sur de África y América del Sur (Acosta, K., et al., 2013, p. 6). En la actualidad, en esta familia se conocen alrededor de 75 géneros y 1600 especies (Herbario Virtual del Mediterráneo Occidental, 2012, p. 45).

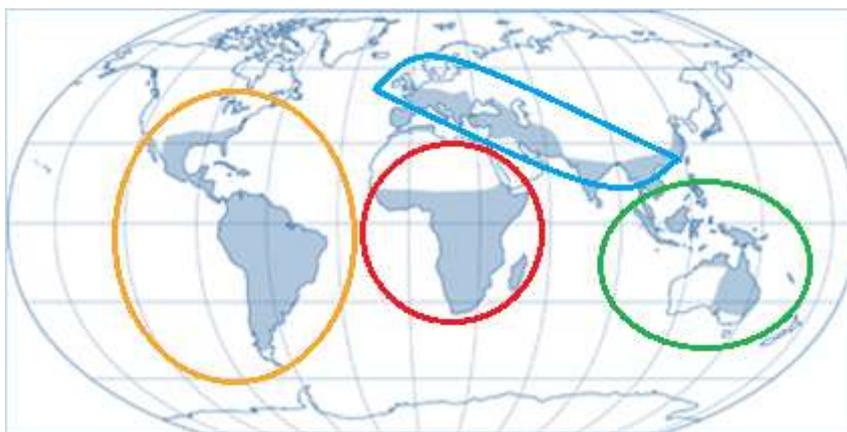


Figura 1-1: Distribución de la familia Amaryllidaceae en el mundo.

Fuente: (Acosta, K., et al., 2013, p. 8).

La familia Amaryllidaceae está conformada por tres subfamilias que son: *Amaryllidoideae*, *Allioideae* y *Agapanthoideae*, siendo la primera la más representativa constituida por géneros de gran importancia como: *Crinum*, *Cyrtanthus*, *Hippeastrum*, *Hymenocallis*, *Phaedranassa*, *Sprekelia* y *Zephyranthes* (Chase, M., et al., 2009, p. 135).

En la actualidad, en Ecuador se han descrito 36 especies de la familia Amaryllidaceae de las cuales 15 especies son nativas correspondiente a varios géneros y entre los más importantes tenemos: *Phaedranassa brevifolia*, *P. dubia*, *P. cinerea*, *P. viridiflora*, *P. tunguraguae*, *P. schizantha*, *P. glauciflora*, *Eucrosia mirabilis*, *E. aurantiaca*, *E. stricklandii*, *Eucharis grandiflora*, *Eu. bakeriana*, *Eu. candida*, *Eu. ruthiana*, *Eu. formosa*, *Crinum amabile*, *Hippeastrum puniceum* y *Stenomesson auratiacum* (Meerow, A., et al., 2008, p. 90).

1.1.2 Género *Eucrosia*

El género *Eucrosia* fue descrito por John Bellenden Ker Gawler y publicado en el Registro Botánico Edwards en el año 1817. Presenta un aspecto polimórfico, de hojas pecioladas y se encuentra en la región Andina Central, es originario de las laderas occidentales de Sudamérica (Ecuador y Perú), se encuentran en tierras bajas en zonas estacionalmente secas de vegetación (Trópicos Org., 2008, p. 6).

La floración se da en la parte alta de los tallos y se dan a finales de la primavera o principios del verano antes de que las hojas aparezcan, algunas especies presentan bulbos y estambres muy largos. Requieren un suelo bien drenado, luz brillante y una temperatura que permanezca por encima de los 10 °C (Aguirre, Z., et al., 2006, p. 163).

En la actualidad, se conocen siete especies y dos variedades de este género, tres especies son endémicas de Ecuador: *E. mirabilis*, *E. dodsonii* y *E. aurantiaca*; y dos de Perú: *E. eucrosioides* y *E. tubiflora*. Además, existen dos especies adicionales que se encuentran en ambos países *E. stricklandii* y *E. bicolor*. En la figura 2-1 se observan las especies del género *Eucrosia* encontradas en Ecuador (Bulbos de América Central y del Sur, 2015, p. 12).



Figura 2-1: Especies del género *Eucrosia*: a) *Eucrosia aurantiaca*, b) *E. bicolor*, c) *E. dodsonii*, d) *E. stricklandii*, e) *E. mirabilis*.

Fuente: (Bulbos de América Central y del Sur, 2015, p. 12).

Todas las especies de este género están restringidas en la comercialización, son relativamente poco extensas, esporádicas y no abundan en ninguna parte de su área de distribución por lo que se encuentran en peligro de extinción. Florecen principalmente en bosques caducifolios áridos-semiáridos y sabanas por debajo de 1000 m. En la figura 3-1 se puede observar la ubicación de las especies del género *Eucrosia*, hallándose principalmente en Cañar, Azuay, El Oro y Loja provincias del Ecuador (Meerow, A., et al., 2008, p. 105).

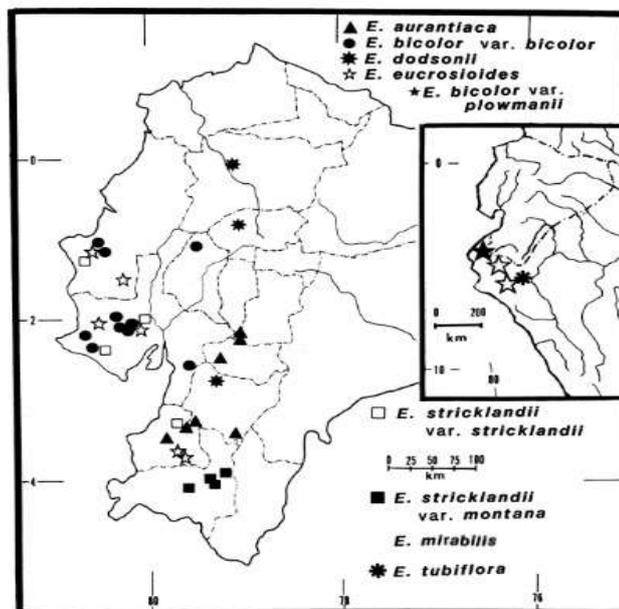


Figura 3-1: Distribución de las especies del género *Eucrosia* en Ecuador.

Fuente: (Meerow, A., et al., 2008, p. 105).

1.1.2.1 Especie *Eucrosia mirabilis*

Eucrosia mirabilis es una planta nativa del Ecuador identificado por el botánico Alan Meerow en el año 1997, puede cruzarse con *Phaedranassa*, la floración se da en los meses de Agosto a Diciembre. El tallo de la flor emerge justo antes de que aparezcan las nuevas hojas puede crecer entre 60 a 90 cm de alto y contiene hasta 30 flores amarillas en una disposición circular. Los estambres blancos son alrededor de 8 cm de largo y toda la umbel puede tener 23 cm de ancho, presenta numerosos bulbos esféricos aproximadamente entre 7 a 10 cm de diámetro (Pacific Bult Society, 2016, p. 2).

Esta especie se debe cultivar en condiciones suaves a cálidas durante todo el año, con días por encima de 16 °C y noches por encima de 10 °C. Se adapta en condiciones de sol desde la primavera hasta el otoño, se reproduce en un suelo de drenaje rápido, durante la época de invierno se da la fase de latencia caracterizado por la coloración amarilla de las hojas (Strange Wonderful Things, 2003, p. 6).

Las pocas poblaciones de esta planta se encuentra en la provincia de Loja pueden hallarse en tierras de cultivo, campos secos inferiores y en cañones rocosos, algunas de estas se encuentran dentro de la red de áreas protegidas de Ecuador principalmente en el Parque Nacional Podocarpus (Mathew, B., et al., 2012, p. 558).

La destrucción del medio en el que se encuentran es la única amenaza conocida para la especie, a través de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza la especie vegetal *E. mirabilis* es denominada como una especie en peligro de extinción encontrándose dentro de la lista roja (Red List, 2003, p. 2).



Figura 4-1: Especie *Eucrosia mirabilis* localizada en la provincia de Loja.

Fuente: (Kay, A., 2012, p. 1).

1.1.3 Alcaloides de la familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae contiene entre sus metabolitos secundarios un grupo de alcaloides de tipo isoquinolínico, la licorina fue el primer alcaloide aislado y se conocen alrededor de 300 alcaloides lo cual le confiere un gran espectro de aplicaciones terapéuticas como la inhibición de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, actividad antitumoral, antibacteriana y antifúngica (Bastida, J., 2015, p. 227).

Los alcaloides de esta familia se pueden clasificar en base al sistema heterocíclico, en la figura 5-1 se puede observar los nueve tipos de alcaloides identificados en la actualidad, cuyos compuestos representativos son: crinina, galantamina, hemantamina, homolicorina, licorina, montanina, norbelladina, narciclasina y tazetina. La existencia y el porcentaje de los alcaloides se basa en la especie de la planta que se investigue y del área geográfica donde es recolectada (Osorio, J., 2012, p. 115).

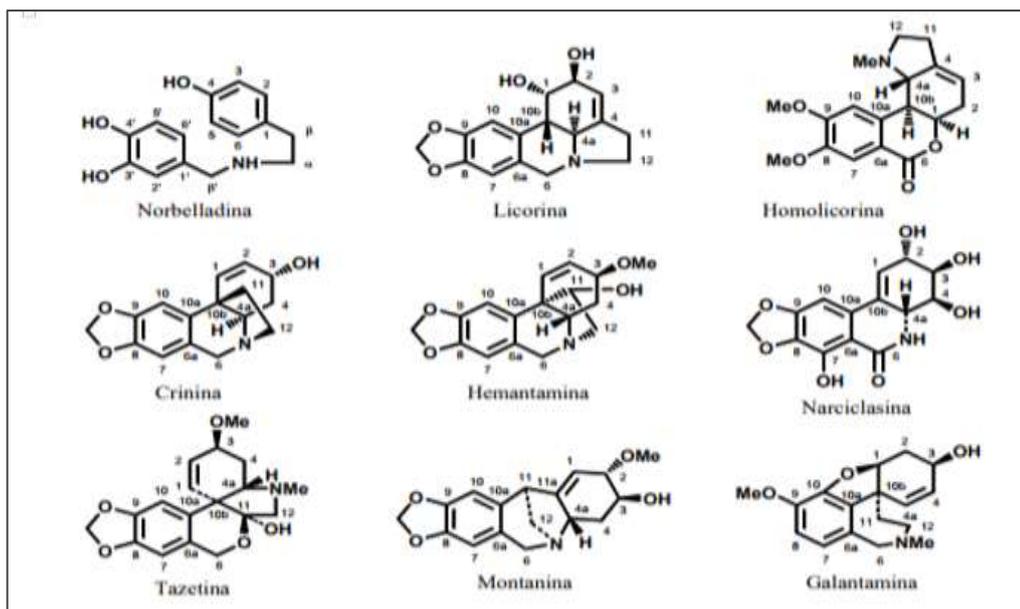


Figura 5-1: Estructuras representativas de los 9 tipos de alcaloides de la familia Amaryllidaceae.

Fuente: (Osorio, J., 2012, p. 115).

Mediante investigaciones realizadas se ha demostrado el enorme potencial de las plantas amarilidáceas (subfamilia *Amaryllidoideae*) considerándose como una fuente importante de productos bioactivos y nuevos alcaloides que poseen una alta actividad farmacológica en el sistema nervioso central, confirmando la importancia de continuar la investigación sobre especies aún no exploradas (Acosta, K., et al., 2013, p. 18).

1.1.3.1 Características estructurales de los alcaloides de la familia Amaryllidaceae

Las características químicas más significativas que presentan estos tipos de alcaloides son:

- La estructura base está conformada por: $C_6-C_1-N-C_2-C_6$, en donde el fragmento C_6-C_1 se deriva del aminoácido L-fenilalanina, mientras que el fragmento $N-C_2-C_6$ se deriva del aminoácido L-tirosina.
- Tienen un pKa entre los valores de 6 y 9, considerándose como bases moderadamente débiles.

- Presentan un solo átomo de nitrógeno (N) que puede estar en una posición secundaria, terciaria y cuaternaria.
- La cantidad de átomos de carbono (C) varían entre 16 y 20 lo que depende de los sustituyentes que presenta el sistema cíclico (Bastida, J., et al., 2015, p. 226).

Se cree que la presencia de alcaloides en las plantas es una adaptación protectora y que la familia Amaryllidaceae está conectada con el ciclo estacional del desarrollo, presentando así una variación ontogénica de alcaloides los cuales son esenciales para la supervivencia de las plantas (Bastida, J., et al., 2015, p. 227).

Se han realizado diversos estudios con el fin de obtener avances significativos en la fitoquímica de la familia Amaryllidaceae identificando otros alcaloides como pancratistatina, narciclasina, hippadina y anhidrolicorina los que generan una actividad antitumoral y los de tipo galantamina presentan una actividad inhibitoria competitiva y reversible de la acetilcolinesterasa utilizándose principalmente en el tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer (Acosta, K., et al., 2013, p. 18).

Las moléculas activas de la familia Amaryllidaceae tienen estructuras complejas por lo que en la actualidad se han empleado métodos analíticos como la Cromatografía en Capa Fina o Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas, con el fin de poder identificar y caracterizar patrones estructurales químicos y de esta manera reconocer de forma más rápida compuestos ya conocidos o si se trata de nuevas sustancias realizar de forma detallada su elucidación estructural (Pigni, N., 2013, p. 7).

1.1.3.2 Galantamina

Es un alcaloide terciario nootrópico, fue extraído por primera vez del bulbo de *Galanthus woronowi* en el año 1952, en la antigüedad fue empleada como anestésico general, posteriormente fue aislada en otras especies vegetales como *Galanthus nivalis* correspondiente a la misma familia, en la actualidad se produce mediante síntesis de laboratorio y es utilizada en la enfermedad del Alzheimer (EA) (Caramelli, P., et al., 2004, p. 382).

Es conocida por su actividad inhibitoria reversible, competitiva y específica sobre las colinesterasas (AChE y BuChE), ejerce un efecto dual a nivel del sistema nervioso central, su mecanismo de acción consiste en evitar la hidrólisis de acetilcolina (ACh) y aumentar la actividad intrínseca de este neurotransmisor frente a los receptores muscarínicos y nicotínicos (Nair, J., et al., 2011, p. 1104).

En la figura 6-1 se observa la estructura química de la galantamina, se forma partir de una adaptación fenol oxidativo orto-para, su estructura base es un dibenzofurano, presenta en los carbonos 3 y 9 sustituciones oxigenadas, además tiene un doble enlace entre los carbonos 4a y 4 (Elgorashi, E., et al., 2016, p. 228).

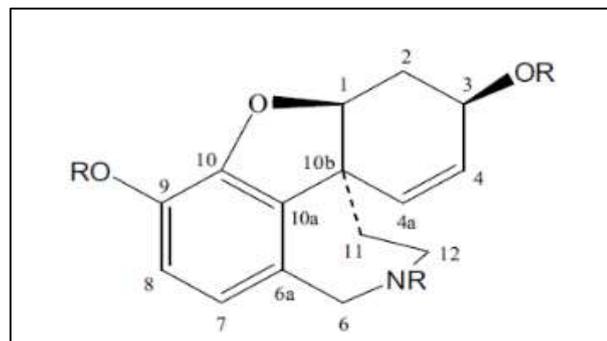


Figura 6-1: Estructura química de la Galantamina.

Fuente: (Elgorashi, E., et al., 2016, p. 228).

La galantamina es un fármaco de primera elección que atraviesa la barrera hematoencefálica y se utiliza para tratar la enfermedad del Alzheimer en etapas leve a moderada, a diferencia de la tacrina no produce hepatotoxicidad y son limitados los efectos adversos gastrointestinales. Este principio activo mejora de forma significativa la función cognitiva y es utilizado en patologías como: glaucoma, miastenia grave y neuritis (Carretero, M., 2013, p. 141).

1.2 Enfermedad del Alzheimer

1.2.1 Descripción

La enfermedad del Alzheimer (EA) es un trastorno cerebral degenerativo, se caracteriza por una degradación de las neuronas de carácter irreversible y de curso progresivo, presenta síntomas patológicos a partir de los 65 años. En el año 1976 Davies y Maloney identificaron una pérdida

continua de acetilcolina (ACh), sustancia que permite que las células nerviosas se comuniquen entre ellas e interviene en actividades mentales vinculadas al aprendizaje, memoria y pensamiento (Fernández, C., et al., 2015, p. 5).

La pérdida neuronal que presenta esta patología puede deberse a la acumulación de la proteína tau que genera la aparición de ovillos neurofibrilares y la formación de placas amiloides con acúmulos de la proteína beta amiloide como se observa en la figura 7-1, lo que produce un incremento en el estrés oxidativo, alteración en la homeostasis del calcio y presencia de procesos neuroinflamatorios (Flores, M., et al., 2011, p. 320).

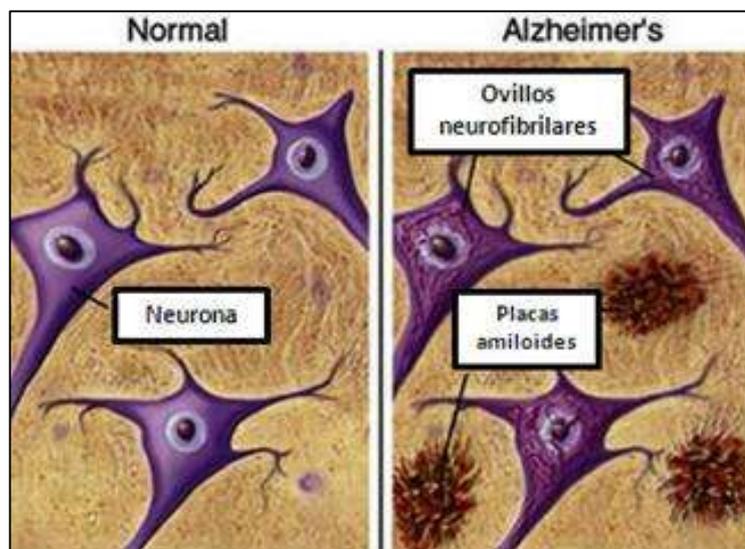


Figura 7-1: Estructura de los ovillos neurofibrilares y de placas amiloides en la enfermedad del Alzheimer (EA).

Fuente: (Flores, M., et al., 2011, p. 320).

Existen tres etapas en la enfermedad del Alzheimer:

1. **Etapa leve:** El paciente presenta pérdida de memoria, dificultad en la manera de hablar y cambios en su comportamiento, olvida palabras conocidas o el lugar donde se colocan objetos de uso diario, estos problemas son evidentes durante los exámenes médicos, cuando comparte con los amigos, familiares o compañeros de trabajo.
2. **Etapa moderada:** Se caracteriza no solo por una pérdida de memoria, sino también de razonamiento y comprensión, el deterioro avanza con bastante rapidez y los afectados pueden

llegar a perderse en lugares conocidos. La enfermedad resulta evidente para familia y allegados, el paciente presenta dificultades para efectuar tareas como hacer la compra, seguir un programa de televisión o planear una cena.

- 3. Etapa grave:** Los pacientes presentan una pérdida de masa muscular, inmovilidad, incontinencia y pierde la capacidad para hablar correctamente o repite frases incoherentes una y otra vez. No puede reconocer a sus familiares y amigos, necesitan ayuda para realizar las actividades de la vida cotidiana e incluso puede fallecer debido a infecciones secundarias como úlceras (Llibre, J., et al., 2012, p. 8).

1.2.2 Epidemiología y Factores de Riesgo

El Alzheimer es la principal causa de demencia y su incidencia depende de la edad, en base a estudios se muestra que se dan entre 10 y 15 nuevos casos de demencia por cada mil personas al año y, de estos, entre 5 a 8 corresponden a la presencia de Alzheimer, es decir, la mitad de todos los casos nuevos de demencia presentes en cada año son pacientes con Alzheimer (Locanto, O., 2015. p. 65).

El sexo es un factor de riesgo muy importante, las mujeres tienden a una incidencia mayor de EA debido a que su tiempo de vida es más prolongada con respecto a la de los hombres. Expertos han observado que en los pacientes con EA tienen antecedentes de haber padecido enfermedades como: diabetes, obesidad, presión alta y colesterol alto (Arriagada, P., et al., 2012, p. 633).

La permanencia de la EA es variable, en la actualidad, existen pacientes que mueren antes de los 4 años después de haber iniciado la enfermedad y menos del 3 % de los pacientes viven más de 14 años después del diagnóstico. Según el consorcio para establecer un registro para la enfermedad de Alzheimer (CERAD) la supervivencia promedio es de 4 y 6 años en hombres y mujeres respectivamente desde el diagnóstico (Quesada, C., et al., 2014, p. 52).

Los altos niveles de incidencia de la enfermedad de Alzheimer en los últimos 20 años se debe a una serie de factores que son: envejecimiento de la población, patologías cardiovasculares, antecedentes familiares, perfiles genéticos, estilo de vida, nivel educativo, aislamiento social y condiciones socioeconómicas (Arriagada, P., et al., 2012. p. 637).

1.2.3 Tratamiento del Alzheimer

En la actualidad no existe cura que revierta la degeneración causada por la enfermedad del Alzheimer; sin embargo, existen fármacos que se pueden utilizar en las diferentes etapas de la enfermedad evitando la progresión de la neuropatología y mejorando los síntomas cognitivos y de comportamiento (Locanto, O., 2015, p. 64).

Se puede utilizar un tipo de tratamiento no farmacológico en la que se realizan diversas actividades como la musicoterapia, ejercicio y la terapia de reminiscencia, las cuales mejoran y mantiene la función cognitiva y evita trastornos de conducta como la depresión, insomnio, ansiedad (Quesada, C., et al., 2014, p. 55).

Existen dos tipos de fármacos aprobados por la *Food Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de la EA: el primer grupo son los inhibidores de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa (donepezilo, galantamina y rivastigmina), principalmente se utilizan en demencia leve o moderada. El segundo grupo son los moduladores de la transmisión glutamatérgica el principal fármaco es la memantina, que se utiliza en demencia moderada a severa, además regula la actividad del glutamato, mensajero químico que interviene en los procesos de aprendizaje y de memoria (Quesada, C., et al., 2014, p. 56).

En la actualidad, se buscan otras moléculas que generen la misma acción inhibitoria pero con menos efectos secundarios y que presenten una mayor biodisponibilidad, dentro de esas alternativas se tienen alcaloides indólicos, pirazolininas y la selegilina, la cual actúa como inhibidor de la monoaminoxidasa con propiedades antioxidantes e incrementando las catecolaminas cerebrales (Néciga, G., et al. 2014, p. 462).

Un estudio demuestra que la vacuna (AN-1792), obtenida de forma sintética de la proteína beta amiloide, estimula al sistema inmunológico para eliminar las placas amiloideas ya formadas y evitar la aparición de otras nuevas (Rodríguez, J., et al., 2015. p. 138).

Los radicales libres (RL), estrés oxidativo y la per-oxidación de lípidos intervienen en el envejecimiento de la persona y se encuentran implicados en la neurodegeneración progresiva que

ocurre en la Enfermedad del Alzheimer (EA), la propentofilina y la vitamina E actuarían oponiéndose a este proceso debido a su efecto antioxidante (Rodríguez, J., et al., 2015, p. 139).

1.2.4 Acetilcolina y la Enfermedad del Alzheimer

La patología de Alzheimer se caracteriza por la disminución progresiva de un neurotransmisor denominado acetilcolina, se encuentra en las células llamadas neuronas colinérgicas ubicadas en las zonas del cerebro y en la médula espinal, están involucrados en una variedad de funciones como los procesos de aprendizaje, memoria, orientación espacial, el paso de sueño a vigilia entre otras (Flores, M., et al., 2011, p. 320).

La baja actividad de acetilcolina (ACh) puede debilitar las conexiones sinápticas entre las neuronas en una región del cerebro alterando la formación de recuerdos a largo plazo y la pérdida de la memoria. Además, se observa la disminución de plasticidad sináptica en la corteza prefrontal relacionada con el agotamiento de la acetilcolina en el cerebro causado por la enfermedad de Alzheimer (García, J., et al., 2013, p. 68).

La disminución de acetilcolina afecta en mayor proporción a los receptores muscarínicos los cuales intervienen en procesos de memoria y aprendizaje, en menor proporción a los receptores nicotínicos los cuales intervienen en procesos de control voluntario de movimiento, atención, dolor y ansiedad (Libre, J., et al., 2012, p. 8).

1.3 Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima que pertenece al grupo de las esterasas tiene la capacidad de hidrolizar a una molécula de acetilcolina en un milisegundo generando una disminución de los impulsos nerviosos alterando los procesos de memoria y otras funciones cognitivas. Como se observa en la figura 8-1, la acetilcolinesterasa está conformada por tres zonas: la triada catalítica, el sitio activo donde se da la unión con la acetilcolina y el sitio aniónico periférico (Singh, M., et al., 2013, p. 167).

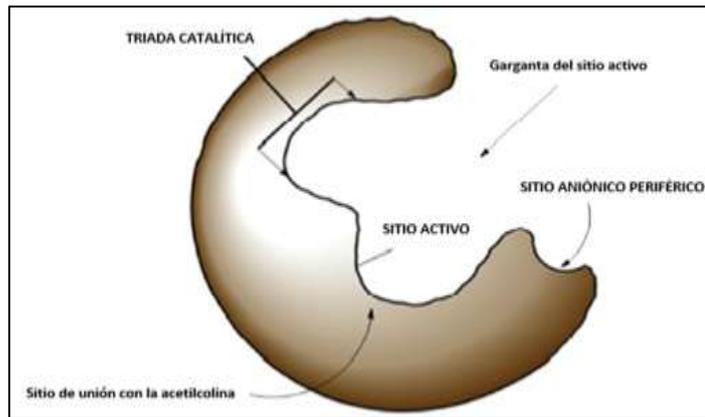


Figura 8-1: Estructura del sitio activo de acetilcolinesterasa.

Fuente: (Singh, M., et al., 2013, p. 167).

Se localiza en las hendiduras sinápticas, donde realiza el proceso de hidrolización de la acetilcolina (ACh) obteniendo dos componentes: el acetato y colina, los cuales son liberados inmediatamente para regular la concentración de este neurotransmisor en la sinapsis. La degradación de la acetilcolinesterasa (AChE) se da en la zona de unión neuromuscular tanto en las sinapsis colinérgicas periféricas como en las centrales, por lo que se puede considerar un punto específico para el diagnóstico de la EA, en conjunto con otros marcadores bioquímicos (Néciga, G., et al., 2014, p. 462).

1.3.1 Inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEI)

Los inhibidores de la AChE han demostrado ser el objetivo terapéutico más viable y el más importante para el tratamiento sintomático de la enfermedad del Alzheimer. El mecanismo de acción de los AChEI consiste en bloquear el centro activo de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) generando así una reacción irreversible con la serina, la cual se encuentra próxima al centro catalítico e impidiendo de esta manera la vinculación con una molécula de acetilcolina o su hidrólisis (Guanqun, Z., et al., 2017, p. 773).

En la actualidad, se ha evidenciado que la función principal de los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEI) consiste en aumentar la cantidad de acetilcolina y así poder generar el incremento de la transmisión sináptica, reconstituyendo los procesos cognitivos y estímulos musculares. Otra función importante es la disminución de la producción de placas amiloides y de

los ovillos neurofibrilares, características de la patología de las células cerebrales de los pacientes con EA (Viegas, C., et al., 2014, p. 917).

Los inhibidores enzimáticos aprobados como medicamentos por la *Food Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer (EA) son el donepezilo (Aricept) y galantamina (Reminyl), los cuales son más selectivos para acetilcolinesterasa (AChE) frente a butirilcolinesterasa (BuChE), mientras que rivastigmina (Exelon) inhibe ambas enzimas de manera similar, sin embargo; tienen una acción equivalente pero se diferencian en su biodisponibilidad y efectos adversos (Cortes, N., et al. 2015, p. 223).

1.4 Butirilcolinesterasa

La butirilcolinesterasa (BuChE) es una enzima que pertenece al grupo de colinesterasas (ChEs), su concentración aumenta en personas que sufren hipertensión, hiperlipidemia y sobrepeso, disminuye en personas que han presentado insuficiencia hepática, infarto agudo de miocardio o en tratamientos con beta-bloqueantes. Interviene en la hidrólisis de ésteres de colina como la cocaína dando como resultado un metabolito farmacológicamente inactivo utilizado en casos de sobredosis de esta droga (Vásquez, Ll., et al., 2015, p. 273).

La enzima BuChE se encuentra principalmente en el hígado, después de sufrir un proceso de síntesis es liberada al plasma, en cantidades menores en el músculo y en el sistema nervioso. Una de sus funciones principales es la hidrólisis de la acetilcolina; sin embargo, muestra una mayor afinidad por la succinilcolina, bloqueador neuromuscular, por lo que se considera que esta enzima es menos específica que la acetilcolinesterasa (Vásquez, Ll., et al., 2015, p. 275).

1.4.1 Inhibidores de butirilcolinesterasa (BuChEI)

Los inhibidores de la butirilcolinesterasa (BuChEI) han sido denominados como fármacos con una leve potencialidad para la enfermedad del Alzheimer siendo menos específicos con respecto al neurotransmisor acetilcolina; sin embargo, se los puede considerar como un tratamiento complementario para la EA (Sánchez, G., et al., 2014, p. 47).

En la actualidad, se han presentado pocos compuestos eficaces y específicos inhibidores de la butirilcolinesterasa entre los cuales se destaca la etopropazina y la dansilarginina. Por ello, existe la necesidad de buscar nuevos principios activos capaces de inhibir de forma selectiva y específicamente a la enzima BuChE (Sánchez, G., et al., 2014, p. 49).

Además, se ha encontrado que la inhibición de la butirilcolinesterasa afecta la formación de las placas amiloides generando una acción dual con los AChEI retardando la evolución de la enfermedad con mayor efectividad. El empleo de inhibidores de BuChE ha sido muy útil para el estudio de la estructura del centro activo de la enzima; existen diferentes compuestos que pueden unirse a cualquiera de los subsitios del centro activo de la BuChE e inhibirlos específicamente, un claro ejemplo es la cymserina (Sánchez, G., et al., 2014, p. 51).

1.5 Método que determina los niveles de colinesterasas

En la actualidad se encuentra un método que permite medir la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa responsables de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. Se debe tener en cuenta que la diferencia fundamental entre AChE y BuChE es su especificidad de sustrato, resulta obvio que cualquier método es aplicable a ambas enzimas, utilizando el sustrato y condiciones apropiadas para cada uno de ellos (Ariza, C., et al., 2011, p. 78).

1.5.1 Técnica de Ellman et al. (1961)

La técnica de Ellman et al. (1961) es la más importante generando una considerable inhibición de colinesterasas (ChE). Su mecanismo de acción se puede observar en la figura 9-1, se basa en la coloración producida por tiocolina ((2-Mercaptoetil) trimetilamonio), hidrolizada por las enzimas colinesterasas (AChE y BuChE), que al reaccionar con un cromógeno Ditiobisnitrobenzoato genera el Anión del ácido tionitrobenzónico el responsable de generar una coloración amarilla (Ariza, C., et al., 2011, pp. 79).

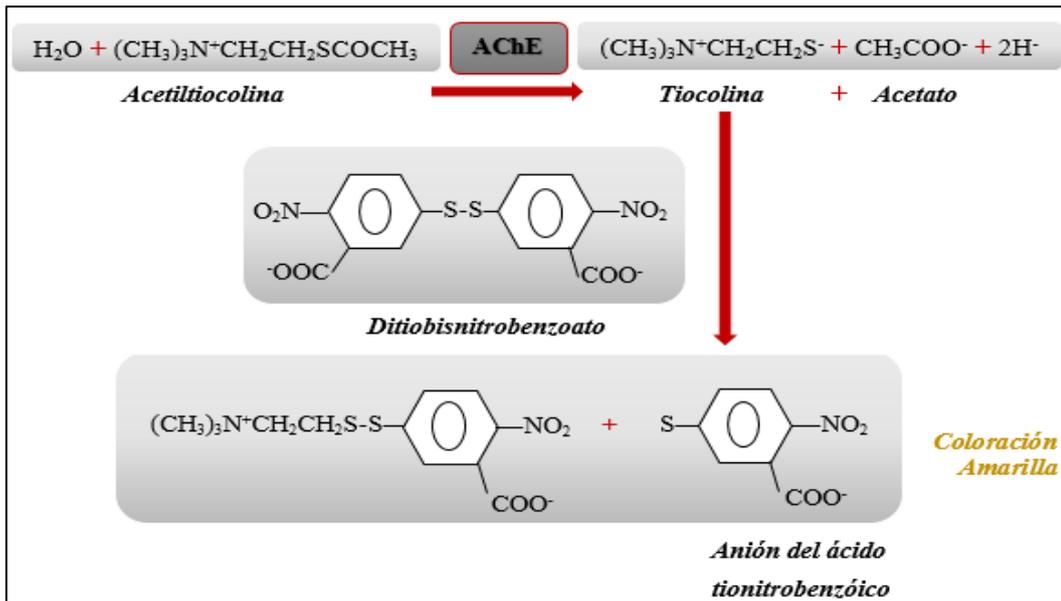


Figura 9-1. Esquema del principio del método de Ellman et al. (1961).

Fuente: (Ariza, C., et al., 2011, pp. 79).

La coloración producida es medida en un espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda entre 405 a 412 nm, es un método sensible y preciso, se puede analizar cantidades pequeñas de muestras en concentraciones muy bajas de la enzima y su análisis es de forma inmediata (Ariza, C., et al., 2011, pp. 80).

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Diseño y tipo del proyecto de investigación

El presente proyecto de investigación muestra un diseño experimental y de tipo descriptivo, se aplicó un método basado en cambios de pH y el uso de solventes orgánicos mediante el cual se obtuvo el extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*, y se procedió a analizar la actividad inhibitoria con respecto a acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE).

2.1.1 Muestra de análisis

La muestra de análisis fue el extracto alcaloidal obtenido de los bulbos de *Eucrosia mirabilis*.

2.1.2 Población de la muestra de Estudio

Bulbos de *Eucrosia mirabilis*, especie endémica de Ecuador, perteneciente a la familia Amaryllidaceae, localizada en la provincia de Loja.

2.2 Lugar de investigación

El presente trabajo experimental se efectuó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Este trabajo forma parte

del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED) que cuenta con el proyecto: “La biodiversidad Iberoamericana como Fuente de Recursos Naturales para su explotación sostenible” y con la participación del Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia (GIPRONAF) de la ESPOCH.

Además, la Universidad de Barcelona (España) colaboró en el estudio mediante la identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.

2.3 Recolección del material vegetal

Los bulbos de la planta *Eucrosia mirabilis* se recolectaron bajo el contrato marco de Acceso a Recursos Genéticos No. MAE-DNB-CM-2015-0054 dentro del proyecto de investigación científico denominado: “La biodiversidad de Amaryllidaceae como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible” y bajo el permiso de movilización No. 017-2017-UPN-VS-DPAL-MAE obtenida en la dirección provincial de Loja.

2.4 Identificación botánica

La Dra. Nora Oleas, docente encargada del herbario de la Universidad Tecnológica Indoamérica “HUTI” (Quito-Ecuador), realizó la identificación botánica de la especie *Eucrosia mirabilis*.

2.5 Materiales, reactivos y equipos.

2.5.1 Materiales

Tabla 1-2: Nómina de materiales utilizados en el trabajo de investigación.

MATERIALES	PROCEDIMIENTO
Frasco de vidrio tipo vial de 10 mL.	Extracción de alcaloides.
Frasco de vidrio ámbar de 1000 mL.	
Probeta de 10 y 50 mL.	
Papel filtro.	
Embudo y trípode.	
Balón para rotavapor.	
Embudo de separación de 500 mL.	
Vaso de precipitación de 100, 250 y 500 mL.	
Desecador.	
Balón de aforo de 10 y 100 mL.	
Pipeta graduada de 1 y 5 mL.	
Pipeta volumétrica de 10 mL.	
Probeta de 25 y 100 mL.	
Espátula y micro espátula.	
Frascos tipo viales de plástico de 5 mL.	
Frascos de vidrio ámbar de 500 mL.	
Tubos Eppendorf para microcentrífuga de 0,5 y 1,5 mL.	Análisis de la acción inhibitoria de las colinesterasas.
Tubos de plástico graduados con tapa rosca de 35 mL.	
Puntas azules, amarillas y blancas para micropipeta.	
Microplacas de 96 pocillos.	
Dispensador de líquido para pipeta multicanal.	
Bloques y botellas de hielo.	
Caja térmica expandido de Poliestireno 4, 19 L.	
Gradillas para tubos.	

Cajas porta tubos.	
Toallas absorbentes marca kleenex®.	
Papel aluminio.	
Piseta.	

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

2.5.2 Reactivos

Tabla 2-2: Nómina de reactivos utilizados en el trabajo de investigación.

REACTIVO	ENSAYO
Agua de grado farmacéutico.	Lavado de los materiales y preparación de reactivos.
Agua destilada.	
Metanol CH ₄ O.	Preparación del extracto crudo.
Ácido sulfúrico H ₂ SO ₄ (2 % V/V).	Obtención del extracto alcaloidal.
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.	
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄).	
Bifosfato de Sodio (NaH ₂ PO ₄).	Análisis de la acción inhibitoria de las colinesterasas.
Cloruro de Sodio (NaCl).	
Fosfato de disódio (Na ₂ HPO ₄).	
Ácido clorhídrico 0,5 N (HCl).	
Acetilcolinesterasa (<i>Electrophorus electricus</i>).	
Butirilcolinesterasa (suero de equino).	
Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico.	
Yoduro de Acetilcolina.	
Yoduro de Butirilcolina.	
Galantamina tabletas de 10 mg.	

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

2.5.3 Equipos

Tabla 3-2: Nómina de equipos utilizados en el trabajo de investigación.

EQUIPO	PROCEDIMIENTO
Molino H. Thomas C.O. modelo 4 Wiley Mill.	Disminución de tamaño de la muestra vegetal seca.
Estufa de secado 110 L redLINE by BINDER.	Secado de la muestra vegetal.
Balanza analítica OHAUS.	Pesaje de principios activos.
Agitador magnético DRAGON LAB MS-S.	Mezcla de reactivos.
Refrigerador a (8 grados Celsius). Congeladora (-14 grados Celsius). Congeladora (-20 grados Celsius).	Mantenimiento y conservación de reactivos, muestras y sustratos.
pH-metro Fisher Scientific.	Regulación del pH de las soluciones.
Rotavapor Heating Bath B-300 Base.	Concentración del extracto alcaloidal.
Baño de ultrasonido BRANSON 3510.	Homogeneidad de la muestra alcaloidal.
Espectrofotómetro MULTISKAN GO Thermo Scientific.	Análisis de la acción inhibitoria de las colinesterasas.
Agitador de tubos.	
Agitador de microplacas.	
Cronómetro.	
Cromatógrafo de gases acoplado a Espectrómetro de masas.	Identificación y porcentaje de los alcaloides.

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

2.6 Adaptación del material vegetal

Una vez obtenido los bulbos vegetales se procedió a lavarlos con agua destilada para eliminar cualquier impureza como materia orgánica, polvo, etc. A continuación, se fragmentaron en trozos pequeños aproximadamente de 1 cm de ancho por 2 cm de largo.

Posteriormente, se colocaron en una estufa redLINE by BINDER por 48 horas a 50 °C con el fin de desecar la muestra. Una vez seca la muestra, se procedió a triturarla en un molino de marca H. Thomas, obteniendo partículas de 2 a 3 mm, obteniendo 21,2 g de bulbo seco triturado.

2.7 Obtención de alcaloides

Para obtener el extracto de alcaloides de *Eucrosia mirabilis*, se utilizó el protocolo descrito por Fabio Cabezas que se muestra en la figura 1-2 (Cabezas, F., et al., 2013, p. 5).

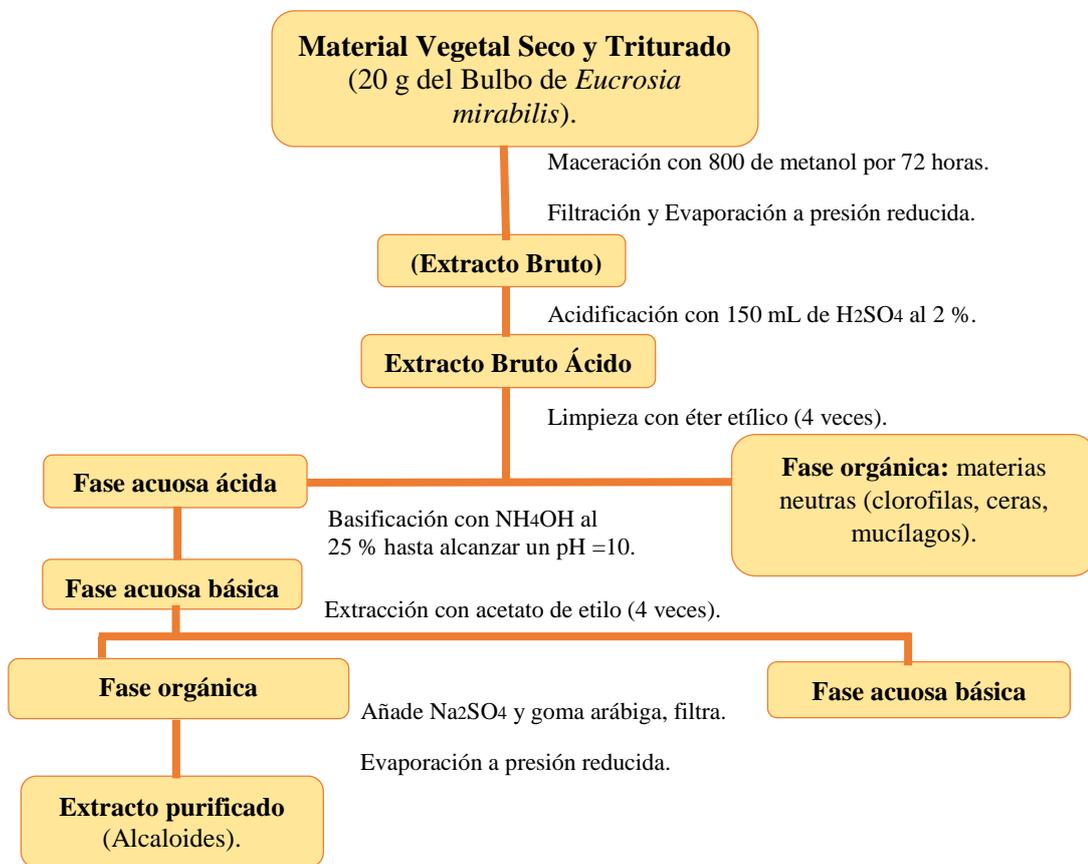


Figura 1-2: Esquema del proceso de extracción de alcaloides de los bulbos de la especie vegetal *Eucrosia mirabilis*.

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

Fuente: (Cabezas, F., et al., 2013, p. 5).

2.7.1 Obtención del extracto bruto

Se pesaron 20 g del material vegetal seco y triturado, durante 72 horas se realizó la maceración con 800 mL de metanol, se realizó baños de ultrasonido en intervalos de 1 a 2 horas con el objetivo de homogenizar la muestra. A continuación, el extracto metanólico se filtró y se evaporó a presión reducida empleando un rotavapor Heating Bath B-300 Base a una temperatura de 50 °C, obteniendo de esta manera el extracto bruto seco (Cabezas, F., et al., 2013, p. 2).

2.7.2 Obtención del extracto alcaloidal

El extracto bruto obtenido fue sometido a una acidificación con H₂SO₄ (2 % v/v), obteniendo el extracto crudo ácido, al cual se procedió a realizar un lavado con éter etílico (4 veces), con el fin de separar elementos neutros como: aceites, ceras, pigmentos y mucílagos de la fase acuosa ácida, en la cual se encuentran los alcaloides (Cabezas, F., et al., 2013, p. 3).

Posteriormente, se basificó la fase acuosa ácida con NH₄OH (25 % v/v) hasta lograr un pH aproximado de 10 y, a continuación, se realizó la extracción de alcaloides con acetato de etilo (4 veces), los cuales quedaron retenidos en la fase orgánica (Cabezas, F., et al., 2013, p. 3).

A la fase orgánica obtenida se añadió sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) y goma arábiga con el objetivo de eliminar los restos de agua, la mezcla fue filtrada para eliminar los sólidos previamente añadidos y, finalmente, se evaporó el acetato de etilo mediante la utilización del rotavapor a presión reducida y a una temperatura de 50 °C obteniendo de esta manera el extracto alcaloidal libre de solvente (Cabezas, F., et al., 2013, p. 4).

2.8 Identificación de alcaloides a través de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

El equipo que se utilizó para la identificación de los alcaloides fue el cromatógrafo de gases de la marca Agilent (modelo 6890) acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico

(modelo 5975) el cual opera a una temperatura de 230 °C a 70 eV en la fuente iónica (Cabezas, F., et al., 2013, p. 5).

El cromatógrafo de gases, cuenta con una columna SAPIENS-X5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), teniendo la fenilmetilsilicona al 5 % como fase estacionaria (Cabezas, F., et al., 2013, p. 5).

La variación de temperatura utilizada se inicia por un incremento desde los 55 °C a 100 °C (60 °C/min), 2 minutos a 100 °C, incremento desde 100 °C a 180 °C (15 °C/min), 1 minuto a 180 °C y por último se da un incremento desde 180 °C a 300 °C (5 °C/min) (Cabezas, F., et al., 2013, p. 5).

Se trabajó a una temperatura de 280 °C en el inyector y el flujo de He fue de 0,8 ml/min, utilizando el modelo *splitless* y se utilizó la codeína como alcaloide estándar de referencia (Cabezas, F., et al., 2013, p. 6).

El software AMDIS 2.71 (NIST) fue utilizado para el análisis de los datos obtenidos del espectro, verificando la integridad de las señales emitidas, obteniendo el cálculo de los índices de retención (Cabezas, F., et al., 2013, p. 6).

2.9. Preparación de las diluciones del extracto de alcaloides y de galantamina

2.9.1. Muestra alcaloidal

Se preparó una solución madre del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* de 10 mg/mL en PBS. A partir de esta, se prepararon seis diluciones con concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL tanto para la enzima acetilcolinesterasa (AChE) como para butirilcolinesterasa (BuChE).

2.9.2. Galantamina (Compuesto de referencia)

En la tabla 4-2 se puede observar las 7 diluciones de galantamina con sus respectivas concentraciones preparadas a partir de una solución madre de concentración de 1 mg/mL.

Para el análisis de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* frente a acetilcolinesterasa (AChE) se empleó desde la dilución 2 hasta la 7, mientras que para butirilcolinesterasa (BuChE), desde la dilución 1 hasta la 6.

Tabla 4-2: Diluciones de galantamina.

Dilución N°	Concentración
1	1×10^{-3} Molar
2	1×10^{-4} Molar
3	1×10^{-5} Molar
4	0.5×10^{-5} Molar
5	1×10^{-6} Molar
6	0.5×10^{-6} Molar
7	1×10^{-7} Molar

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

2.10 Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE)

Se utilizó el protocolo propuesto por Ellman et al. (1961), con modificaciones de Ortiz et al. (2016) para determinar la actividad inhibitoria que presenta el extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* frente a las colinesterasas (AChE y BuChE) (Ortiz, Javier, E., et al., 2016, p. 1246).

Se utilizó una microplaca de 96 pocillos en la cual se colocaron 50 μ L del extracto alcaloidal o galantamina (compuesto de referencia) en la muestra (M) y en el blanco muestra (BM) (Ortiz, Javier, E., et al., 2016, p. 1246).

Posteriormente se añadió PBS, 50 µL en control (C), 100 µL en el blanco control (BC) y 150 µL en el blanco muestra (BM), consecutivamente se añadió 50 µL de enzima en el control (C) y en el blanco muestra (BM) (Ortiz, Javier, E., et al., 2016, p. 1246).

A continuación, la microplaca se incubó por 30 minutos a una temperatura de 21 °C, inmediatamente se añadió 100 µL de sustrato en el control (C), blanco control (BC) y en la muestra (M), seguido de una leve agitación por cinco minutos, finalmente se realizó la lectura de absorbancias a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro de microplacas MULTISKAN GO Thermo Scientific (Ortiz, Javier, E., et al., 2016, p. 1247).

La enzima acetilcolinesterasa (AChE) proviene de la anguila eléctrica *Electrophorus electricus* y la butirilcolinesterasa (BuChE) del suero de equino. Las soluciones utilizadas fueron buffer fosfato salino (PBS) y la solución salina, mientras que los sustratos empleados fueron yoduro de acetiltiocolina y yoduro de butiriltiocolina. El ácido 5,5'-ditiobis (2 nitrobenzoico) "DTNB" se utilizó para generar la reacción del color mediante la producción del anión del ácido tionitrobenzónico (Ortiz, Javier, E., et al., 2016, p. 1247).

2.11 Análisis de Datos

2.11.1 Porcentaje de inhibición

Para obtener el porcentaje de inhibición se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% I = 100 - (M - BM / C - BC) X 100$$

En donde:

M: Valor de la absorbancia de la muestra.

C: Valor de la absorbancia de control.

BM: Valor de la absorbancia del blanco muestra.

BC: Valor de la absorbancia del blanco control.

Nota: Las absorbancias obtenidas fueron procesadas en el software Microsoft Excel.

2.11.2. Curva para determinar la concentración inhibitoria media (IC₅₀)

Para determinar la concentración inhibitoria media (IC₅₀) se representó la curva de la concentración de los extractos (µg/mL) (eje X) frente a los porcentajes de inhibición enzimática (eje Y), se generó una línea de tendencia logarítmica con su respectiva ecuación.

Los resultados de la concentración inhibitoria media (IC₅₀), son los promedios ± la desviación estándar (SD) de tres pruebas realizadas de forma individual, cada una realizada por triplicado.

CAPÍTULO III

3. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

3.1 Obtención del extracto alcaloidal de la especie *Eucrosia mirabilis*

A partir de 20 g del bulbo seco y triturado de *Eucrosia mirabilis* y mediante una maceración en el cual se usaron 800 mL de metanol (CH₃OH), se obtuvo el extracto bruto el cual se sometió a un método de extracción basado en cambios de pH y solventes orgánicos con el fin de obtener el extracto alcaloidal puro (Cabezas, F., et al., 2013, p. 6).

Se utilizó el bulbo de la especie vegetal *Eucrosia mirabilis* debido a que en esta zona vegetal se da la biosíntesis de los alcaloides a través de la activación del aminoácido tirosina (Cortes, N., et al., 2015, p. 225).

3.2 Porcentaje de rendimiento del extracto alcaloidal de los bulbos de *Eucrosia mirabilis*

Para obtener el porcentaje de rendimiento se aplicó la siguiente fórmula (Silva, C., 2010, p. 106).

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{\text{Rendimiento real}}{\text{Rendimiento teórico}} * 100$$

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{50,4 \text{ mg}}{20000 \text{ mg}} * 100$$

$$\% \text{ de Rendimiento} = 0,25\%$$

A partir de 20 g de la muestra vegetal seca obtenida de los bulbos de la especie *Eucrosia mirabilis*, se obtuvieron 50,4 mg de extracto de alcaloides, teniendo un porcentaje de rendimiento del 0,25 %.

Tabla 1-3: Porcentaje de rendimiento del extracto alcaloidal de los bulbos de *Eucrosia mirabilis*.

Fragmento de la planta	Bulbo
Peso de la muestra seca	20000 mg
Volumen de solvente (Metanol)	800 mL
Extracto rico en Alcaloides	50,4 mg
% del rendimiento de Alcaloides	0,25 %

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

3.3 Identificación de alcaloides mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)

En la especie *Eucrosia mirabilis* se pudo evidenciar la presencia de 3 alcaloides, en la figura 1-3 se puede observar que la dimetiltriptamina es el componente en mayor proporción con un (67,97 %), seguido de hidroxiefedrina (5,12 %) y hordenina (2,26 %). La presencia de estos alcaloides no ha sido registrada antes en especies de la familia Amaryllidaceae.

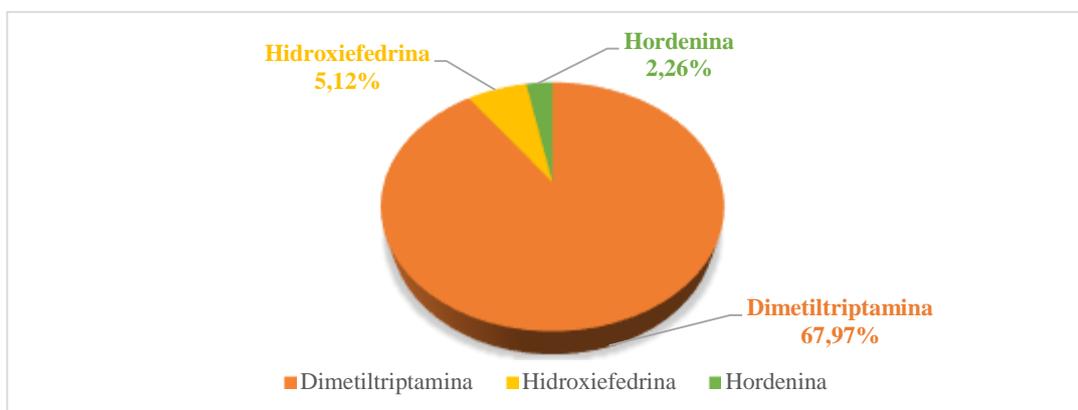


Gráfico 1-3: Porcentaje de alcaloides presentes en el extracto de la especie vegetal *Eucrosia mirabilis*.

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

En la tabla 2-3 se pueden observar los valores de porcentaje total, tiempos de retención e índices de retención de cada uno de los compuestos identificados.

Tabla 2-3: Alcaloides identificados mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM) del extracto alcaloidal de los bulbos de *Eucrosia mirabilis*.

ALCALOIDE	Rt	RI	% Total
Dimetiltriptamina	8.022	1520.4	67.97
Hydroxiefedrina	9.502	1706.8	5.12
Hordenina	6.391	1107.5	2.26
Codeina*	21.007	2472.5	17.79

Definición: Rt (Tiempo de retención), RI (Índice de retención), %Total (Porcentaje del alcaloide con respecto a la mezcla total) * (Patrón interno).

Realizado por: Luciana Tallini, 2018.

Fuente: Universitat de Barcelona (España).

3.4 Dimetiltriptamina

La dimetiltriptamina (DMT) es el alcaloide que se encuentra en mayor proporción en el extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* con un 67,97 %, éste pertenece al grupo de las triptaminas y se ha encontrado en otras especies vegetales como *Mimosa tenuiflora* (Gaujac, A., et al., 2013, p. 78) y *Acacia phlebophylla* (Rodríguez, B., et al., 2016, p. 2) pertenecientes a la familia Fabaceae.

La DMT se puede encontrar en pequeñas cantidades en el ser humano metabolizada por la enzima triptamina-N-metiltransferasa (Enno, F., et al., 2013, p. 219), actuando como regulador del receptor SIGMA-1, proteína que se localiza en el sistema nervioso central y en las células inmunes cumpliendo dos funciones principales: generar diferenciación neuronal y responder ante procesos inflamatorios (Szabo, A., et al., 2014, p. 45).

Se ha determinado que la dimetiltriptamina genera una inhibición a la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), responsable de la degradación de triptófano (Trp) por la vía de las quinureninas, mediante este proceso inhibitorio se puede generar la restauración de la inmunidad

anti-tumoral del huésped considerándose como una estrategia para la terapia antineoplásica (Cavalheiro, M., 2012, p. 12).

La acción principal de este alcaloide es de generar una reacción alucinógena interrumpiendo la recaptación de serotonina, encontrándose dentro de las drogas de clase 1. Se utiliza solo para fines científicos ya que su toxicidad es elevada generando alucinaciones, distorsiones de la imagen corporal, alteraciones del habla y euforia (Fontanilla, D., et al., 2009, pp. 935).

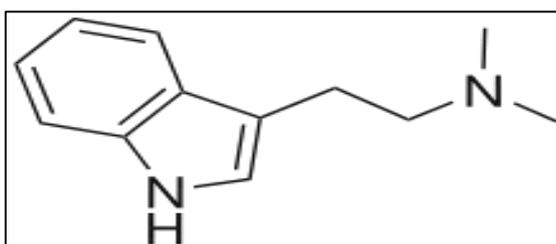


Figura 2-3: Estructura química del alcaloide Dimetilriptamina.

Fuente: (Cavalheiro, M., 2012, p. 8).

3.5 Hidroxiefedrina

La hidroxiefedrina es una amina simpaticomimética, es el segundo alcaloide identificado encontrándose en un porcentaje del 5,12 % en *Eucrosia mirabilis*. No se ha encontrado datos de este alcaloide presente en otras especies de la familia Amaryllidaceae; sin embargo, se puede hallar en otras especies como *Sida cordifolia* (Prado, C., et al., 2005, p. 163) y *Ephedra breana* (Gurni, A., et al., 1974, p. 522), pertenecientes a la familia Malvaceae y Ephedraceae respectivamente.

Estudios muestran que la hidroxiefedrina actúa a nivel del sistema nervioso central, además estimula los receptores beta-2 adrenérgicos en los pulmones para relajar el músculo liso bronquial, alivia el broncoespasmo, aumenta la capacidad respiratoria, disminuye el volumen residual y reduce la resistencia de las vías aéreas (Enno, F., et al., 2013, pp. 219). A dosis altas de este alcaloide puede generar cefalea, mareo, náuseas, psicosis, ansiedad, delirio, nerviosismo, insomnio y alucinaciones (Enno, F., et al., 2013, pp. 220).

Un estudio muestra que la hidroxiefedrina se puede utilizar como medio de contraste en la tomografías por emisión de positrones (PET), permite obtener una imagen de la distribución regional de las neuronas y cuantificar el consumo de glucosa regional cerebral, siendo un método con una mayor sensibilidad y especificidad para detectar alteraciones demenciales (Boschi, S., et al., 2015, p. 99).

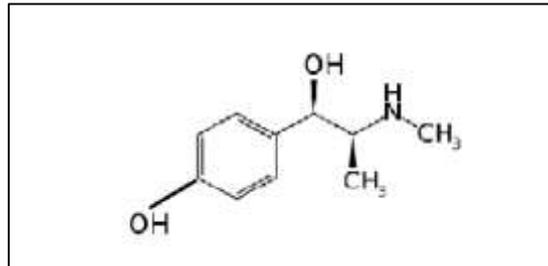


Figura 2-3: Estructura química del alcaloide Hidroxiefedrina.

Fuente: (Takamatsu, J., et al., 1997, pp. 1235).

3.6 Hordenina

El tercer alcaloide identificado es la hordenina, hallándose en la mínima cantidad de 2,26 %, no se ha relacionado con especies vegetales de la familia Amaryllidaceae, pertenece al grupo de las feniletilaminas y se lo puede encontrar en especies como el cactus *Ariocarpus fissuratus* (Batis, A., et al., 2011, p. 14) perteneciente a la familia Cactaceae y *citrus aurantium* (Soares, D., et al., 2012, p. 12) perteneciente a la familia Rutaceae.

La hordenina posee propiedades antisépticas utilizadas por los indígenas para prevenir la infección y acelerar la curación de heridas. Estudios muestran que tiene un efecto inotrópico positivo sobre el corazón, permite el incremento de la presión arterial sistólica y diastólica, regula el volumen de flujo sanguíneo periférico y tiene un efecto diurético en los seres humanos (Gernot, B., et al., 2013, p. 12).

Este alcaloide se encuentra presente en la cebada malteada y en la cerveza. De forma similar que la dopamina, la hordenina estimula el receptor de dopamina D2 conocida como la hormona de la

felicidad, pero lo hace de una forma diferente que potencialmente prolonga el efecto positivo en esa zona del cerebro, mejorando el estado de ánimo del consumidor (Sommer, T., et al., 2017, p. 4).

Esta sustancia química es capaz de originar estados especiales de conciencia que originan alteraciones de los sentidos manifestándose como embriaguez, visiones coloreadas, sensación de flotación, pérdida del sentido y del tiempo, a altas dosis produce síntomas como náusea severa, vómito, ansiedad e incluso puede generar un síndrome psicótico en algunas personas (Carrasco, S., 2017).

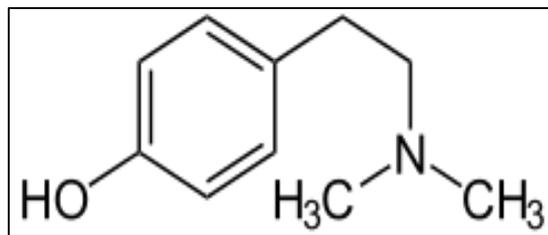


Figura 3-3: Estructura química del alcaloide Hordenina.

Fuente: (Kawauchi, H., 2008, p. 136).

3.7 Actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto alcaloidal de la especie *Eucrosia mirabilis*

Para validar el método empleado se debe obtener dos valores por encima y por debajo del 50 % de inhibición tanto para acetilcolinesterasa (AChE) como para butirilcolinesterasa (BuChE), con el fin de lograr una buena correlación de los datos (López, J., et al., 2014, p. 3).

Se considera que las concentraciones del extracto alcaloidal que supera el valor de 200 µg/mL no presenta una actividad inhibitoria frente a la enzima (Ortiz, Javier, E., et al., 2016, p. 1246), sin embargo, estos valores demuestran la actividad inhibitoria que tiene el extracto alcaloidal frente a las colinesterasas (AChE y BuChE) y de esta manera permitir que los datos se ajusten a la línea de tendencia y al momento de realizar la curva de regresión calcular de forma correcta el IC₅₀ (Ariza, C., et al., 2011, p. 82).

3.7.1 Análisis de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* con respecto a acetilcolinesterasa (AChE)

Ensayo No 1

En primer lugar, se realizó la evaluación de la actividad inhibitoria de la especie frente a la enzima acetilcolinesterasa (AChE), empleando 4 concentraciones: 1, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (López, J., 2014, p. 4). Los resultados del primer ensayo se muestran en la tabla 3-3, donde se observa que la concentración más alta del extracto de alcaloides de *Eucrosia mirabilis* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tiene la capacidad de inhibir a la acetilcolinesterasa en un 16,54 % y los 3 porcentajes de inhibición (1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se ubican por debajo del 10 %. Por ello, se consideró realizar un segundo ensayo incrementando las concentraciones a 50, 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabla 3-3. Porcentajes inhibitorios de AChE del primer ensayo del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*.

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Porcentaje de Inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) ^a
1	0,00 \pm 0,00
10	0,11 \pm 1,42
50	8,45 \pm 1,07
100	16,54 \pm 0,53

^a Los resultados obtenidos son el promedio de 3 ensayos.

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

Ensayo No 2

Se evaluó la actividad inhibitoria de AChE empleando concentraciones del extracto alcaloidal de *E. mirabilis* de 50, 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados del segundo ensayo se muestran en la tabla 4-3 observando que la concentración más alta del extracto de alcaloides de *Eucrosia mirabilis* (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tiene la capacidad de inhibir a la acetilcolinesterasa en un 42,18 % y los 3 porcentajes de inhibición (50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se ubican por debajo del 30 %. Debido a que estas concentraciones aun no determinan la concentración a la cual la actividad enzimática es

inhibida en un 50%, se consideró incrementar las concentraciones a 50, 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabla 4-3. Porcentajes inhibitorios de AChE del segundo ensayo del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*.

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Porcentaje de Inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) ^a
50	9,51 \pm 0,96
100	17,85 \pm 0,34
200	27,43 \pm 1,67
300	42,18 \pm 0,26

^a Los resultados obtenidos son el promedio de 3 ensayos.

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

Ensayo No 3

Se evaluó la actividad inhibitoria de AChE empleando concentraciones del extracto alcaloidal de *E. mirabilis* de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados del tercer ensayo se muestran en la tabla 5-3 en la que se identifica que la concentración más alta del extracto de alcaloides de *Eucrosia mirabilis* (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tiene la capacidad de inhibir a la enzima acetilcolinesterasa en un 64,24 %. Dos de los 6 porcentajes de inhibición (400 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se encuentran por encima del 50 % de inhibición y los cuatro porcentajes restantes están por debajo (50, 100, 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por ello, con estas concentraciones se determinó el valor de IC_{50} .

Tabla 5-3. Porcentajes inhibitorios de AChE del tercer ensayo del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*.

Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) ^a
50	12,55 ± 1,07
100	23,48 ± 3,21
200	38,87 ± 0,88
300	47,57 ± 0,70
400	58,16 ± 0,91
500	64,24 ± 0,42

^a Los resultados obtenidos son el promedio de tres ensayos.

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

Cálculo de IC₅₀ para acetilcolinesterasa (AChE)

Empleando las concentraciones del ensayo 3, se calculó la concentración inhibitoria media del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* frente a la acetilcolinesterasa (AChE), el valor de IC₅₀ fue de 267,62 ± 26,78 µg/mL, resultado superior en comparación con el compuesto de referencia galantamina que tiene un IC₅₀ 0,22 ± 0,02 µg/mL, lo que representa que el extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* muestra baja actividad inhibitoria frente a esta enzima (Elisha, I., et al., 2012. p. 45).

En la tabla 6-3 se muestran los resultados finales de tres ensayos realizados, se identifica la concentración inhibitoria enzimática frente AChE, tanto para el extracto alcaloidal como para la galantamina (compuesto de referencia).

Tabla 6-3. Concentración inhibitoria media (IC₅₀) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* con respecto a acetilcolinesterasa (AChE).

Extracto alcaloidal	AChE ^a IC ₅₀ µg/mL
<i>Eucrosia mirabilis</i>	267,62 ± 26,78
Galantamina ^b	0,22 ± 0,02

^a El resultado obtenido es el promedio de 3 ensayos;

^b Compuesto de referencia.

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

En la actualidad, no existen información bibliográfica acerca del género *Eucrosia* con los que se pueda comparar los resultados alcanzados; sin embargo, se ha encontrado que la especie *Nerine bowdenii* Watson perteneciente a la familia Amaryllidaceae presenta un valor similar con un IC₅₀ de 284.8 ± 4.2 µg/mL (Cahlíková, Lucie, et al., 2011, p. 1829).

En base a un estudio filogenético se presume que los géneros *Phaedranassa* Herb, *Rauhia* Traub y *Stenomesson* Herb; son los más cercanos a *Eucrosia* debido a que corresponden a una misma tribu denominada *Stenomessae* (Andrade, J., 2014, p. 115). Una de las especies que presentan una buena actividad inhibitoria es *Phaedranassa dubia* la cual presentó un IC₅₀ de 25,48 ± 0,39 µg/mL (Inca, A., 2017, p. 62), mientras que *Phaedranassa cinerea* tiene una menor actividad inhibitoria con un valor de IC₅₀ de 37,60 ± 0,09 µg/mL (Salazar, C., 2017, p. 68), en las especies mencionadas, el IC₅₀ va desde 25,0 µg/mL hasta 40 µg/mL, encontrándose el valor de *Eucrosia mirabilis* fuera de este rango.

La actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa en un estudio realizado en la zona andina de Argentina demostró que la especies, *Habranthus jamesonii* y *Zephyranthes filifolia* presentaron la mayor inhibición hacia AChE con valores similares de IC₅₀ 1,0 ± 0.01 y 1,0 ± 0.08 µg/mL, respectivamente (galantamina: IC₅₀ de 0,29 ± 0,07 µg/ml) (Ortiz, Javier, E., et al., 2016, p. 1245).

La baja actividad enzimática que presentó el extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* se puede correlacionar con los resultados logrados en la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría

de Masas (CG-EM), debido a que en su composición no presenta galantamina ni alcaloides de tipo indólico (Elgorashi, E., et al., 2016, p. 231).

3.7.2 Análisis de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* con respecto a butirilcolinesterasa (BuChE)

Ensayo No 1.

Para continuar con el estudio del extracto alcaloidal de la planta se realizó la evaluación la actividad inhibitoria de la especie frente a la enzima butirilcolinesterasa (BuChE). Para ello, en primer lugar se eligieron 4 concentraciones del extracto correspondientes a 1, 10, 50 y 100 µg/mL (López, J., et al., 2014, p. 4). Los resultados del primer ensayo se observan en la tabla 7-3, donde se muestra que la concentración más alta del extracto de alcaloides de *Eucrosia mirabilis* (100 µg/mL) tiene la capacidad de inhibir a la butirilcolinesterasa en un 35,93 % y los 3 porcentajes de inhibición 1, 10 y 50 µg/mL se ubican por debajo del 25 %. Por ello, se consideró realizar un segundo ensayo incrementando las concentraciones a 50, 100, 200, 300 µg/mL.

Tabla 7-3. Porcentajes inhibitorios de BuChE del primer ensayo del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*.

Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de butirilcolinesterasa (BuChE) ^a
1	2,52 ± 0,93
10	10,32 ± 2,25
50	22,05 ± 1,35
100	35,93 ± 3,55

^aLos resultados obtenidos son el promedio de 3 ensayos.

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

Ensayo No 2.

Se evaluó la actividad inhibitoria de BuChE empleando concentraciones del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* de 50, 100, 200, 300 µg/mL. La concentración de 300 µg/mL tuvo la capacidad de inhibir a butirilcolinesterasa en un 55,89 % y los 3 porcentajes de inhibición de 50, 100 y 200 µg/mL se ubican por debajo del 50 %. Debido a que estas concentraciones aun no determinan la concentración a la cual la actividad enzimática es inhibida en un 50%, se consideró incrementar las concentraciones a 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL.

Tabla 8-3. Porcentajes inhibitorios de BuChE del segundo ensayo del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*.

Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de butirilcolinesterasa (BuChE) ^a
50	9,79 ± 1,53
100	34,04 ± 4,90
200	48,09 ± 1,70
300	55,89 ± 2,83

^aLos resultados obtenidos son el promedio de 3 ensayos.

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

Ensayo No 3.

Se evaluó la actividad inhibitoria de BuChE empleando concentraciones del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL. Los resultados del tercer ensayo se muestra en la tabla 9-3 en donde la concentración más alta del extracto alcaloidal (500 µg/mL) tiene la capacidad de inhibir a la enzima acetilcolinesterasa en un 79,07 %. Cuatro de los 6 porcentajes de inhibición (200, 300, 400 y 500 µg/mL) se encuentran por encima del 50 % de inhibición y los dos porcentajes restantes están por debajo (50 y 100 µg/mL). Por ello, con estas concentraciones se determinó el valor de IC₅₀.

Tabla 9-3. Porcentajes inhibitorios de BuChE del tercer ensayo del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*.

Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de butirilcolinesterasa (BuChE) ^a
50	27,39 ± 1,18
100	41,06 ± 0,52
200	58,31 ± 0,58
300	69,16 ± 0,60
400	75,02 ± 0,65
500	79,07 ± 0,78

^aLos resultados obtenidos son el promedio de 3 ensayos.

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

Calculo de IC50 para butirilcolinesterasa (BuChE)

El extracto de alcaloides de la especie de *Eucrosia mirabilis* presentó una mayor actividad inhibitoria de BuChE en comparación con AChE, con un valor de IC₅₀ de 126,59 ± 11,65 µg/mL, resultado que esta fuera de rango en comparación con el compuesto de referencia galantamina que tiene un IC₅₀ 4,32 ± 0,43 µg/mL.

En la tabla 10-3 se muestran los resultados finales de tres ensayos realizados, se identifica la concentración inhibitoria enzimática frente BuChE, tanto para el extracto alcaloidal como para galantamina (compuesto de referencia).

Tabla 10-3: Concentración inhibitoria media (IC₅₀) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* con respecto a butirilcolinesterasa (BuChE).

Extracto alcaloidal	BuChE ^a IC ₅₀ µg/mL
<i>Eucrosia mirabilis</i>	126,59 ± 11,65
Galantamina ^b	4,32 ± 0,43

^a El resultado obtenido es el promedio de 3 ensayos;

^b Compuesto de referencia.

Realizado por: Fernando Carrillo, 2018.

En la actualidad, no se reportan fuentes bibliográficas acerca de la actividad inhibitoria del género *Eucrosia* con respecto a BuChE; sin embargo, esta enzima cumple un papel fundamental en la etiología y profilaxis de la Enfermedad del Alzheimer ya que tiene la capacidad de sustituir temporalmente a la AChE e hidrolizar la acetilcolina disminuyendo los niveles de este neurotransmisor en la sinapsis, la rivastigmina es un inhibidor dual de las colinesterasas, hasta el momento existen un número limitado de alcaloides que han sido aprobados como inhibidores de butirilcolinesterasa (BuChEI) (Talesa, V., 2001, p. 1965).

Se puede comparar la actividad inhibitoria con otras especies de la familia Amaryllidaceae, *Phaedranassa dubia* presenta una baja actividad inhibitoria frente a la butirilcolinesterasa expresada con un valor de IC₅₀ de 114,96 ± 4,94 µg/mL (Inca, A., 2017, p. 62) y *Phaedranassa cinerea* presenta una baja actividad inhibitoria frente a la butirilcolinesterasa expresada con un valor de IC₅₀ de 108,51 ± 8,98 µg/mL (Salazar, C., 2017, p. 65). Al comparar con los resultados obtenidos se puede decir que *Eucrosia mirabilis* tiene una menor composición química alcaloidal, lo que produce una menor afinidad hacia las colinesterasas (Elgorashi, E., et al., 2016, p. 229).

Existen otras especies de la familia Amaryllidaceae que presentan una mayor actividad inhibitoria frente a BuChE como es el caso de la *Sternbergia lutea* (Hrstka, V., 2015, p. 20) y *Nerine filamentosa* (Cahlíková, Lucie, et al., 2011, p. 1829) con un valor de IC₅₀ 3.7 ± 0.1 µg/mL, IC₅₀ 13.0 ± 0.7 µg/mL respectivamente, además *Zephyranthes grandiflora* (Cahlíková, L., et al., 2015, p. 578) presentó una baja inhibición enzimática frente a BuChE con un valor de IC₅₀ de 356,0 ± 9.3 µg/mL.

CONCLUSIONES

Mediante un protocolo que se basa en el uso de solventes orgánicos y cambios de pH se obtuvo el extracto alcaloidal de los bulbos de *Eucrosia mirabilis* con un porcentaje de rendimiento del 0,25 %.

A través de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas se logró identificar un total de 3 alcaloides en el bulbo de *Eucrosia mirabilis*, siendo la dimetiltriptamina el componente más abundante con un 67,97 % y en cantidades menores se encuentra la hidroxiefedrina con un 5,12 % y la hordenina con un 2,26 %.

Aplicando el método colorimétrico de Ellman et al, (1961) modificado por Ortiz (2016), se logró determinar que la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis* frente AChE y BuChE, consiguiendo valores de IC_{50} 267.62 ± 26.78 y 126.59 ± 11.65 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, resultados que denotan una baja actividad inhibitoria con respecto a galantamina cuyos valores de IC_{50} fueron de 0.22 ± 0.02 $\mu\text{g/mL}$ para AChE y 4.32 ± 0.43 $\mu\text{g/mL}$ para BuChE, demostrando una mayor afinidad por parte de los alcaloides dimetriptamina, hidroxiefedrina y hordenina hacia la enzima BuChE.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar futuras investigaciones en otras especies del género *Eucrosia* con el fin de comparar el perfil de alcaloides y la actividad inhibitoria frente a las colinesterasas, además sería imprescindible realizar más estudios fitoquímicos de la especie vegetal *Eucrosia mirabilis*.

En el proceso de obtención del extracto alcaloidal de las especies vegetales se recomienda sustituir el metanol por el dimetilsulfóxido con el fin de disolver por completo la muestra y obtener un extracto con la mayor cantidad de alcaloides.

Debido a que se encontró un alto contenido de dimetilriptamina en los bulbos de *Eucrosia mirabilis*, se recomienda realizar estudios de toxicidad debido a que presenta un alto poder alucinógeno siendo peligroso para el ser humano.

Implementar un ventilador centrífugo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo con el fin de mantener la temperatura idónea necesaria para los ensayos de actividad enzimática.

BIBLIOGRAFÍA.

- Acosta, K., et al.** Identificación de los alcaloides de *stenomesson aurantiacum Kunth Herb.* [En línea] (Tesis). (Maestría) Universitat de Barcelona, España. 2013. pp. 1-25 [Consulta: 10 Septiembre 2017]. Disponible en:
<http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1541/1T-SENESCYT-00674.pdf>.
- Aguirre, Z., et al.** “Bosques Secos en Ecuador y su Diversidad”. *Botánica Económica de los Andes Centrales* [En línea], 2006, (Universidad Nacional de Loja - Ecuador). pp. 162-187. [Consulta: 03 Octubre 2017]. Disponible en:
<http://beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdf/Capitulo%2011.pdf>
- Albuja, L., et al.** *Ecuador flora de los remanentes de bosques secos de la región interandina zona sur.* Instituto de Ciencias Biológicas. Yunguilla, Malacatos, Catamayo. [En línea]. 2010, pp. 1-11. [Consulta: 15 Octubre 2017]. Disponible en:
<http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/4439/1/Plantas%20BS%20Sur.pdf>
- Alzheimer’s association.** Alzheimer’s and Dementia [en línea] 2017, pp. 1-50. [Consulta: 13 Febrero 2018]. ISSN 15525279. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2017.02.001>.
- Andrade, J.** “Estudio de la composición alcaloídica de *Narcissus broussonetii* y de tres especies brasileñas del género *Hippeastrum* (Amaryllidaceae)” [En línea], (Tesis). (Doctorado) Universitat de Barcelona, España. 2014, pp. 111-118. [Consulta: 20 Febrero 2018]. Disponible en:
http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/55988/1/JPdA_TESIS.pdf
- Arriagada, P., et al.** “Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer’s disease”. *American Academy of Neurology* [En línea], 2012, (Universidad de Harvard, United State of America) 42(3), pp. 631-639. [Consulta: 15 Enero 2018]. ISSN 0028-3878. Disponible en:<http://n.neurology.org/content/42/3/631>

- Arriola, E., et al.** “Terapias farmacológicas”. *Revista Española de Geriátría y Gerontología* [En línea], 2016, (Fundación San Sebastián, España) 51(1), pp. 22-26. [Consulta: 15 Enero 2018]. ISSN 0211-139XDO. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0211139X1630139>
- Ariza, C., et al.** “Determinación de niveles basales de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa plasmática en equinos silla argentina en la sabana de Bogotá” [En línea] (Tesis). Universidad de ciencias aplicadas y ambientales, Colombia. 2011. pp. 78-85. [Consulta: 20 Febrero 2018]. Disponible en:
<http://repository.udca.edu.co:8080/jspui/bitstream/11158/90/1/203117.pdf>
- Barranco, Q., et al.** “Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer”. *Revista de Neurología* [En línea], 2014, (Universidad de Córdoba, España) 40(10), pp. 613-618. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 15926136. Disponible en:
<https://www.neurologia.com/articulo/2004360>
- Bastida, J., et al.** “Chemical and Biological Aspects of Amaryllidaceae Alkaloids”. *Life Sciences* [En línea]. 2015, (Universitat de Barcelona, España) 37(2), pp. 221-229. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 978-81-7895-528-5. Disponible en:
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.913.4190&rep=rep1&type=pdf>
- Batis, A., & Rojas, M.** “El peyote y otros cactus alucinógenos de México”. *Biodiversitas* [En línea], 2011, (México) 6(40). pp. 12-17. [Consulta 30 Octubre 2017]. Disponible en:
http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/lemye/gente_lemye/jordan_golubov/papers_pdf/biodiver40.pdf
- Boschi, S., et al.** 11 C-Meta-Hydroxyephedrine: Un prometedor PET radiofarmacéutico para imágenes del sistema nervioso simpático. *Clinical nuclear medicine* [En línea], 2015, (Universidad de Bolonia, Italia) 40(2). pp. 96-103. [Consulta 30 Octubre 2017]. Disponible en:
https://journals.lww.com/nuclearmed/Abstract/2015/02000/11C_Meta_Hydroxyephedrine__A_Promising_PET.28.aspx

Bulbos de América Central y del Sur. “Comisión Nacional para el Conocimiento y el uso de la Biodiversidad”. [En línea], 2015, pp. 12-23. [Consulta: 30 Septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.telosrarebulbs.com/SAmerica1.html>

Cabezas, F., et al. “Análisis del contenido alcaloidico de *Caliphruria Subdentata Baker* (Amaryllidaceae) por el método CG-EM”. *Revista Latinoamericana de Química* [En línea], 2013, (Barcelona, España) 41(1), pp. 1-6. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 0370-5943. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rlq/v41n1/v41n1a6.pdf>

Cahlíková, Lucie, et al. “Actividad de aislamiento y colinesterasa de alcaloides de Amaryllidaceae de *Nerine bowdenii*”. *Europe PMC Plus* [En línea], 2011, (Charles University, República Checa) 6(12), pp. 1827-1830. [Consulta: 20 Febrero 2018]. ISSN 22312717. Disponible en: <http://europepmc.org/abstract/med/22312717>

Cahlíková, L., et al. “Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity”. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* [En línea], 2015, (Charles University, República Checa) 21(4), pp. 575-579. [Consulta: 20 Febrero 2018]. ISSN 0102-695X Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v21n4/aop8711.pdf>

Caramelli, P., et al. “Effects of galantamine on attention and memory in Alzheimer’s disease measured by computerized neuropsychological tests”. *Archivos de Neuro-Psiquiatria* [En línea], 2004, (Universidad de Sao Paulo, Brasil) 62(2), pp. 379 - 384. [Consulta: 20 Febrero 2018]. ISSN 1678-4227. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004282X2004000300001&script=sci_arttext&tlng=pt

Carrasco, A. Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile* [En línea] (Tesis). Espoch, Ecuador. 2017, pp. 51-56. [Consulta: 20 Febrero 2018]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/7925/1/56T00741.pdf>

- Carrasco, S.** Encuentran en la cerveza un ingrediente que te hace feliz. *Revista su médico*, [En línea], 2017, [Consulta 24 Octubre 2017]. Disponible en:
<https://sumedico.com/cerveza-ingrediente-dopamina-feliz/>
- Carretero, M.** “Galantamina. Medicamentos de Vanguardia”. *Offarm: Farmacia y Sociedad* [En línea], 2013, (Barcelona, España) 22(8), pp. 140-142. [Consulta 24 Octubre 2017]. ISSN 0212047X. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-galantamina--13051501>
- Cavalheiro, M.,** Estudio de la acción inhibitoria de los indolamina enzima compuestos 2,3-dioxigenasa de la triptamina (TRY) y N, N dimetilriptamina (DMT) [En línea] (Tesis). (Maestría) Universidad de Sao Paulo, Brasil. 2012. pp. 1-19. [Consulta: 20 Febrero 2018]. Disponible en: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-02092013-123633/en.php>
- Chase, M., Reveal, J., & Fay, M.** “Subfamilial Classification for the Expanded Asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Anthorrhoeaceae”. *Botanical Journal of the Linnean Society* [En línea], 2009, (United State of America) 61(2), pp. 132-136. [Consulta: 20 Septiembre 2017]. ISSN 0024-4074. Disponible en: https://www.revolvy.com/main/index.php?s=Xanthorrhoeaceae&item_type=topic
- Cortes, N., et al.** “Perfiles de metabolitos de alcaloides por GC/MS y actividades inhibitorias de acetilcolinesterasa con predicciones de modo de enlace de cinco plantas de Amaryllidaceae”. *Revista de Análisis Farmacéutico y Biomédico* [En línea], 2015, (Universidad de Antioquia, Colombia) 102(2), pp. 222-228. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 0731-7085DO. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708514004695>
- CYTED.** Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. [En línea], 2016, (Universitat de Barcelona, España) 27(31). [Consulta: 15 Febrero 2018]. Disponible en: http://www.cyted.org/?q=es/detalle_proyecto&un=909

Dionezine, F. Estudio químico, biológico y farmacológico de especies *Allamanda blanchetti* y *Allamanda schottii* para la obtención de moléculas bioactivas de potencial terapéutico [En línea] (Tesis). (Doctorado) Universidad Nacional de Santa Catarina, Brasil. 2005. pp. 112-115. [Consulta: 12 Febrero 2018]. Disponible en: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/102443/221590.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Elisha, I., et al. “Acetylcholinesterase inhibitory effects of the bulb of *Ammocharis coranica* (Amaryllidaceae) and its active constituent lycorine”. *South African Journal of Botany*. [En línea], 2012, (University de Pretoria, Sudáfrica) 85(1), pp. 44-47. [Consulta: 12 Febrero 2018]. ISSN 0254-6299DO. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629912001834>

Elgorashi, E., et al. “Quantitative Structure–activity relationship studies on Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitory Effects of Amaryllidaceae Alkaloids”. *South African Journal of Botany* [En línea], 2016, (Universidad de KwaZulu-Natal Pietermaritzburg, Sudáfrica) 72(2), pp. 224-231. [Consulta: 12 Febrero 2018]. ISSN 0254-6299DO. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629905000335>

Ellman, G., et al. “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity”. *Biochemical Pharmacology* [En línea], 2012, (Universidad de California, Estados Unidos) 7(2), pp. 88-95. [Consulta: 12 Febrero 2018]. ISSN 0006-2952DO. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0006295261901459>

Enno, F., et al. “Dimetiltryptamina (DMT) a Psicodélico”. [En línea]. Estados Unidos, Springer, Dordrecht, 2013, pp. 219-220. [Consulta: 15 Febrero 2018]. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-90-481-2448-0_35

Faiyaz, A., et al. “Inhibidores de la colinesterasa de botánicos”. *Pharmacognosy Review*. [En línea]. 2013, (Universidad Rey Faisal, Arabia Saudita) 7(14), pp. 121-130. [Consulta: 20 Febrero 2018]. ISSN PMC3841990. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3841990/>

Federación Internacional del Alzheimer. World Alzheimer Report 2015: El impacto global de la demencia. [En línea], 2015, [Consulta: 10 Noviembre 2017]. Disponible en: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>

Fernandez, C., Rodriguez, E., & Combarros, O. “Genética y Enfermedad del Alzheimer”. *Revista Chilena de Neuro-psiquiatria* [En línea], 2015, (Chile) 41(2), pp. 5-8. [Consulta: 10 Noviembre 2017]. ISSN 0717-9227. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-92272003041200003#1

Flores, M., & Segura, J. “Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico”. *Medigraphic Artemisa* [En línea], 2011, (México) 6(4), pp. 315-326. [Consulta: 10 Noviembre 2017]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmexneu/rmn-2005/rmn054f.pdf>

Fontanilla, D., et al. “El alucinógeno N, N- dimetiltryptamina (DMT) es un regulador del receptor endógeno Sigma-1”. *Revista Science* [En línea], 2009, (United State of America) 323(19) pp. 934-937. [Consulta: 12 Febrero 2018]. ISSN 1095-9203. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/323/5916/934/tab-pdf>

García, J., et al. “La participación de los receptores de acetilcolina nicotínicos en trastornos del Sistema Nervioso Central”. *Dialnet* [En línea], 2013, (Universidad de la Rioja, España) 26(3), pp. 66-72. [Consulta: 10 Febrero 2018]. ISSN 0185-3325. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=970362>

Gaujac, A., et al. “Application of analytical methods for the structural characterization and purity assessment of N,N-dimethyltryptamine, a potent psychedelic agent isolated from *Mimosa tenuiflora* inner barks”. *Microchemical Journal* [En línea], 2013, Universidad de Río de Janeiro, Brasil) 109(2), pp. 78-83. [Consulta: 10 Febrero 2018]. ISSN 0026-265XDO. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X12000926>

Gernot, B., Steiner, I., & Daldrup, T. “Quantification of the biogenic phenethylamine alkaloid hordenine by LC-MS/MS in beer”. *Institute of Legal Medicine* [En línea]. 2013, (La Universidad Heinrich Heine, Alemania) 80(4), pp. 11-14. [Consulta: 15 Febrero 2018]. Disponible en:

https://www.gtfch.org/cms/images/stories/media/tk/tk80_4/BrauersEtAl.pdf

González, J. “La sinergia farmacológica aplicada a la analgesia: revisión de la combinación de ibuprofeno con codeína”. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*. [En línea]. 2010, (Madrid, España) 17(1), pp. 12-15. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 1134-8046. Disponible en:

http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S113480462010000100007&script=sci_arttext&tlng=pt

Greig, N., et al. “La inhibición selectiva de butirilcolinesterasa eleva la acetilcolina cerebral, aumenta el aprendizaje y reduce el péptido β -amiloide de Alzheimer en roedores”. *National Academy of Sciences* [En línea], 2005, (Universidad Norte de Carolina, Estados Unidos) vol. 102, no. 47, pp. 17213-17218. [Consulta: 20 Febrero 2018]. ISSN 1091-6490. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/102/47/17213.short>

Guanqun, Z., et al. “Alcaloides de amaryllidaceae con nuevos tipos de marco de *Zephyranthes candida* como potentes inhibidores de la acetilcolinesterasa”. *European Journal of Medicinal Chemistry* [En línea], 2017, (Universidad de Ciencia y Tecnología de Huazhong, China) 127(2), pp. 771-780. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 0223-5234DO. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523416309205>

Gurni, A., et al. “Estudio quimiotaxonómico de las especies de Ephedra de la flora argentina, *E. breana Philippi* y *E. ochreatea Miers*”. Instituto de Botánica Darwinion [En línea], 1974, (Argentina) 18(3), pp. 520-525. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 00116793. Disponible en:

http://www.jstor.org/stable/23215702?seq=1#page_scan_tab_contents

Herbario Virtual del Mediterráneo Occidental. Área de Bótanica, Departamento de Biología, Universitat de Valencia. [En línea], 2012, pp. 44-47. [Consulta: 14 de Septiembre 2017]. Disponible en: <http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/familia/2602.html>

Hrstka, V. The alkaloids of the genus *Narcissus* (Amaryllidaceae) and its biological activity [En línea] (Tesis). (Doctorado) Universidad de Karlova, Rusia. 2015. pp. 20-22. [Consulta: 15 Febrero 2018]. Disponible en: https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/79452/RPTX_2012_2_11160_0_417280_0_140122.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Inca, A. Determinación de la Actividad Inhibitoria de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa del Extracto de Alcaloides de *Phaedranassa dubia*. [En línea] (Tesis). Epoch, Ecuador. 2017, pp. 60-65. [Consulta: 20 Febrero 2018]. Disponible en: <http://dspace.epoch.edu.ec/bitstream/123456789/7927/1/56T00742.pdf>

Iketubosin, I., & Mathieson, D. “El aislamiento de hordenine y norsecurinine de *securinega virosa* (baill)”. Journal of Pharmacy and Pharmacology [En línea], 2010, (Real Sociedad Farmacéutica de Gran Bretaña, Reino Unido) 15(1), pp. 810-815. [Consulta: 15 Febrero 2018]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-7158.1963.tb12885.x/full>

Kawauchi, H., et al. “Isolation and Identification of Hordenine, p-(2-dimethylamino) ethylphenol from *Ahnfeltia paradoxa*”. Journal Stage Home [En línea], 2008, (Universidad Kitasato, Japón) 44(2), pp. 135-137. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 1349-998X. Disponible en: https://www.jstage.jst.go.jp/article/suisan1932/44/2/44_2_135/_article

Kay, A. Ecuador megadiverso, *Eucrosia mirabilis*. [En línea], 2012, p. 1. [Consulta: 15 Febrero 2018]. Disponible en: https://www.flickr.com/search/?text=eucrosia&view_all=1

Kyung, R., et al. “Screening for Acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining”. *Journal of Chromatography A* [En línea], 2001, (Universidad de Leiden, Países Bajos) 915(1), pp. 217-223. [Consulta: 20 Febrero 2018]. ISSN 0021-9673DO. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301006240>

Llibre, J., et al. “Actualización sobre la enfermedad de Alzheimer”. *Revista Cubana. Medicina General Integral* [En línea], 2012. (Habana, Cuba) 18(4). pp. 7-9. [Consulta: 20 Febrero 2018]. ISSN 1561-3038. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0864-21252002000400007

Locanto, O. “Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias”. *Archivos de Medicina Interna* [En línea], 2015, (Uruguay) 37(2), pp. 61-67. [Consulta 24 Octubre 2017]. ISSN 1688-423X. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S1688423X2015000200003&script=sci_arttext&tlng=pt

López, J. “De una planta nívosa del Cáucaso a un medicamento contra la enfermedad de Alzheimer”. *Info-Farmacia* [En línea], 2014, (Zaragoza, España). pp. 2-6. [Consulta 24 Octubre 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>

López, J., & Frías, I. “Sinergia en la analgesia tratada con ibuprofeno y codeína”. *Science Direct* [En línea], 2012, (Madrid, España) 38(1), pp. 24-32. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 1138-3593DO. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1138359311003261>

Mathew, B., & Lewis, W., “Amaryllidaceae especie *Eucrosia mirabilis*”. *Botanical Magazine Curtis's* [En línea], 2012, (Universitat de Valencia, España) pp. 557–564. [Consulta 30 Octubre 2017]. Disponible en: <http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/familia/2602.html>

Meerow, A., et al. “Amaryllidaceae”. Flowering Plants - Monocotyledons. The Families and Genera of Vascular Plants. [En línea], 2008, (Alemania) 3(1), pp. 83-110. [Consulta: 25 Septiembre 2017]. ISSN 978-3-662-03533-7. Disponible en:
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-03533-7_11

Nair, J., et al. “Aislamiento de narciprimina de *Cyrtanthus contractus* (Amaryllidaceae) y evaluación de su actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa”. Journal of Ethnopharmacology [En línea], 2011, (University of KwaZulu, Sudáfrica) 137(3), pp. 1102-1106. [Consulta: 20 Febrero 2018]. ISSN 0378-8741DO. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111005046>

Néciga, G., et al. “Patrón de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer con inhibidores colinesterásicos”. *Revista de Neurología* [En línea]. 2014, (Sevilla, España) 46(8), pp. 461-464. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 40699. Disponible en:
<https://medes.com/publication/40699>

Ngankeu, A., et al. “Actividades de inhibición antimicrobiana, antioxidante y butirilcolinesterasa de extractos y compuestos aislados de *Scadoxus pseudocaulus* y derivados semisintéticos de farrero”. *Revista sudafricana de botánica* [En línea], 2016, (Universidad de Dschang, Sudáfrica) 102(23), pp. 166-174. [Consulta: 20 Febrero 2018]. ISSN 0254-6299DO. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629915003312>

Oleas, N. Genetic structure of the threatened *Phaedranassa schizantha* (Amaryllidaceae). [En línea] (Tesis). Universidad Indoamerica, Ecuador. 2016, pp. 1-2. [Consulta: 20 Febrero 2018]. Disponible en:
http://repositorio.uti.edu.ec/bitstream/123456789/50/1/1.%20Phaedranassa_schizantha%282%29.pdf

Organización Mundial de la Salud. El número de personas que padecen demencia se triplicará en los próximos 30 años. [En línea], 2017, [Consulta: 20 Febrero 2018]. Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/dementia-triple-affected/es/>

- Ortiz, J., et al.** “Amaryllidaceae argentino salvaje, una nueva fuente renovable del inhibidor de la acetilcolinesterasa galanthamina y otros alcaloides” *Molecules open access journals* [En línea], 2012, (Universidad San Juan, Argentina) 17(11), pp. 1575-1577. [Consulta: 20 Febrero 2018]. ISSN 1420-3049. Disponible en: <http://www.mdpi.com/14203049/17/11/13473>
- Ortiz, Javier, E., et al.** “Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and Their Cholinesterase-Inhibitory Activities: An in Vitro and in Silico Study”. *Journal of Natural Products* [En línea], 2016, (Universidad San Juan, Argentina) 79(5), pp. 1241 - 1248. [Consulta: 20 Febrero 2018]. ISSN 15206025. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jnatprod.5b00785>
- Osorio, J.** Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora colombiana alcaloides de *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) y biflavonoides de *garcinia madruno* (clusiaceae) [En línea] (Tesis). (Doctorado) Universidad de Barcelona, España. 2012. pp. 111-117. [Consulta: 20 Febrero 2018]. Disponible en: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42675>
- Pacific Bult Society.** “*Eucrosia mirabilis*, Amaryllidaceae”. [En línea], 2016, pp. 1-2 [Consulta 20 Octubre 2017]. Disponible en: <http://pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Eucrosia>
- Pigni, N.** Biodiversidad y Conservación de Recursos Fitogenéticos de las Amarillidáceas como Fuente de Productos Bioactivos [En línea] (Tesis). (Doctorado) Universidad de Barcelona, España. 2013. pp. 3-10. [Consulta: 05 Septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.tesisenred.net/handle/10803/120668>
- Prada, S., Takeuchi, Y., & Ariza, H.** “Costo monetario del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en Colombia”. *Acta Neurológica Colombiana* [En línea], 2016, (Colombia) 30(4), pp. 47-55. [Consulta: 05 Septiembre 2017]. ISSN 0120-8748. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012087482014000400004&script=sci_arttext&tlng=es

Prado, C., et al. “Farmacognóstico, la raíz de estudio de la especie *Sida cordifolia*, Malvaceae”. *Revista Electrónica de Farmacia Suplemento* [En línea], 2005, (Portugal) 2(2), pp. 161-163. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 1808-0804. Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:https://revistas.ufg.br/REF/article/download/2003/1971>

Quesada, C., & Morales, A. “La enfermedad del Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa”. *Acta Médica Costarricense* [En línea], 2014, (Costa Rica) 45(2), pp. 50-56. [Consulta: 15 Noviembre 2017]. ISSN 0001-6012. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000160022003000200005

Red List. *Eucrosia mirabilis*. La Lista Roja de Especies Amenazadas. [En línea], 2003, pp. 1-2. [Consulta 24 Octubre 2017]. ISSN 2307-8235. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/details/42805/0>

Rios, M., et al. Plantas útiles del Ecuador. Aplicaciones, Retos y Perspectivas. [En línea], Editorial: Abya-Yala, 2017, Quito-Ecuador, pp. 234-238. [Consulta: 15 Febrero 2018]. Disponible en: <http://www.plantasutilesdeltropico.com/wpcontent/uploads/2015/09/USEFUL-PLANTS-OF-ECUADOR1.pdf>

Rodríguez, B., et al. “Vegetales como nuevas drogas psicoactivas: una revisión narrativa”. *Medwave* [En línea], 2016, (Madrid, España) 16(1), pp. 1-11. [Consulta: 30 Agosto 2017]. ISSN 0717-6384. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Beatriz_Rodriguez_Salgado/publication/292337250_Vegetables_as_new_psychoactive_drugs_a_narrative_review/links/56b0ef9008ae56d7b069c434/Vegetables-as-new-psychoactive-drugs-a-narrative-review.pdf

Rodríguez, R., et al. “Tratamiento farmacológico del dolor en pacientes con Alzheimer”. [En línea], *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal* 2006, (Universidad de Cali, Colombia) 37(3), pp. 35-39. [Consulta: 15 Noviembre 2017]. ISSN 0120-8322. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/283/28337311/>

- Rodríguez, J., & Guerra, M.** “Enfermedad de Alzheimer. Situación actual y estrategias terapéuticas”. *Revista cubana* [En línea], 2015, (Habana, Cuba) 38(2), pp. 138-140. [Consulta: 15 Noviembre 2017]. ISSN 1561-302X. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75231999000200007
- Romano, F., et al.** “Enfermedad de Alzheimer”. *Revista de Posgrado de la sexta Cátedra de Medicina* [En línea], 2007, (Universidad de Navarra, España) 41(175), pp. 9-12. [Consulta: 30 Agosto 2017]. Disponible en:
<https://www.unav.edu/publicaciones/revistas/index.php/revista-de-medicina/article/viewFile/6855/6015>
- Salazar, C.** Determinación de actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *phaedranassa cinerea* [En línea] (Tesis). Espoch, Ecuador. 2017. pp. 65-83. [Consulta: 20 Febrero 2018]. Disponible en:
<http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/7939/1/56T00747.pdf>
- Sánchez, G., & Salceda, R.** “Enzimas polifuncionales el caso de la Acetilcolinesterasa”. *Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular* [En línea], (Universidad Nacional Autónoma de México) 27(2), 2014, pp. 44-51. [Consulta: 20 Febrero 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2008/reb082b.pdf>
- Silva, C.** Cuantificación de los Alcaloides de *Berberis hallii* Carrasquilla. Sector La Josefina, San Isidro del Cantón Guano, Provincia de Chimborazo [En línea] (Tesis). Espoch, Ecuador. 2010. pp. 101-106. [Consulta: 20 febrero 2018]. Disponible en:
<http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/695/1/56T00225.pdf>
- Singh, M., et al.** “Acetylcholinesterase Inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection”. *European Journal of Medicinal Chemistry* [En línea], 2013, (Universidad en Patiala - India) 70(3), pp. 165-188. [Consulta: 20 Febrero 2018]. ISSN 1768-3254. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523413006314>

Soares, D., et al. “Determinación de los contenidos de aminas adrenérgicas en productos farmacéuticos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia”. *Salón Internacional de Enseñanza, Investigación y Extensión* [En línea], 2012, (Brasil) 4(2), pp. 10-12. [Consulta: 20 Febrero 2018]. Disponible en:
<http://publicase.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/1797>

Sommer, T. et al. “Identification of the Beer Component Hordenine as Food-Derived Dopamine D2 Receptor Agonist by Virtual Screening a 3D Compound Database”. *Scientific Reports* [En línea], 2017, (Universität Erlangen Nürnberg, Alemania) 10(7), pp. 2-6. [Consulta 24 Octubre 2017]. ISSN 28281694. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28281694>

Strange Wonderful Things. *Rare and Exotic Plants and Sedes, Eucrosia mirabilis*. [En línea], 2003, p. 6. [Consulta 24 Octubre 2017]. Disponible en:
<http://www.strangewonderfulthings.com/416.htm>

Szabo, A., et al. “Psychedelic N,N-Dimethyltryptamine and 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamine Modulate Innate and Adaptive Inflammatory Responses through the Sigma-1 Receptor of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells”. *Revista Plos One* [En línea], 2014, pp. 45-48. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 0106533. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone>.

Takamatsu, J., y Minakij, P. “Preparation of hydrochlorides of d- and l- forms”. *Pharmaceutical Society* [En línea], 1997, (Japón) 76(51), pp. 1234-1237. [Consulta: 05 Septiembre 2017]. ISSN 1878021. Disponible en: <http://www.drugfuture.com/chemdata/p-Hydroxyephedrine.html>

Talesa, V. “Acetylcholinesterase in Alzheimer’s disease”. *Mechanisms of Ageing and Development* [En línea], 2001, (Universidad de Perugia, Italia) 122(16), pp. 1961-1969. [Consulta: 24 Agosto 2017]. ISSN 0047-6374DO. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0047637401003098>

Teppner, H. “Erfahrungen mit Ex-situ-Erhaltung im Botanischen Garten des Institutes für Botanik der Universität Graz”. *Instituto de Botánica* [En línea], 2003, (Alemania) 39(22), pp. 1-22. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 1024-0306. Disponible en: http://www.zobodat.at/stable/pdf/fritschiana_39_0001-0022.pdf

The New York Botanical Garden. *Eucrosia mirabilis*. [En línea], 2015. [Consulta 30 Octubre 2017]. Disponible en: http://sweetgum.nybg.org/science/vh/specimen_details.php?irn=203202

Torres, J., et al. “Bradycardia extrema secundaria al uso de galantamina”. *Cardiocre* [En línea], 2012, (Barcelona, España) 47(4), pp. 174-176. [Consulta 30 Octubre 2017]. ISSN 1889-898X. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/2770/277024669016.pdf>

Trópicos Org. Missouri Botanical Garden, National Register of Historic Places. [En línea], 2008, p. 6. [Consulta: 27 Septiembre 2017]. Disponible en: <http://dnr.mo.gov/shpo/nps-nr/71001065.pdf>

Vallejo, P. Recursos Naturales del Ecuador. [En línea], 2010, pp. 1-4. [Consulta: 24 Agosto 2017]. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos-pdf4/diversidad-biologica-del-ecuador/diversidad-biologica-del-ecuador.pdf>

Vásquez, Ll. et al. Variación de la Actividad de la Enzima Butirilcolinesterasa en Usuarias de Anticonceptivos Hormonales. [En línea], 2015, (Universidad Nacional de San Marcos, Perú) 61(4), pp. 271-277. [Consulta: 24 Agosto 2017]. ISSN 1025 - 5583. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/anales/v61_n4/pdf/a03v61n4.pdf

Viegas, C., et al. “Nuevos fármacos contra la enfermedad de Alzheimer de la biodiversidad: el papel de los inhibidores naturales de la acetilcolinesterasa”. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* [En línea], 2014, (Brasil) 5(10), pp. 915-926. [Consulta: 24 Agosto 2017]. ISSN 21944-971. Disponible en: <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/mrmc/2005/00000005/00000010/art0000>

Vinueza, A. Tamizaje Foquímico e Identificación de Alcaloides *Phaedranassa schizantha Baker* [En línea] (Tesis). EsPOCH - Ecuador. 2014. pp. 32-34. [Consulta: 24 Agosto 2017].
Disponible en:
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3546/1/56T00461%20UDCTFC.pdf>

Yaguana, C., & Aguirre, Z. Riqueza florística del Centro de Investigación. Región tumbesina - Ecuador. [En línea], 2014, (Universidad Nacional de Loja, Ecuador) 4(1), pp. 31-38. [Consulta: 15 Febrero 2018]. ISSN 1390-3683. Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Zhofre_Aguirre/publication/286611049_Riqueza_floristica_del_Centro_de_Investigacion_El_Chilco_region_tumbesina_Ecuador/links/566c0c3508ae1a797e3d39e0.pdf

ANEXOS

ANEXO A: Obtención de la muestra vegetal de *Eucrosia mirabilis*.



**Recolección del material vegetal,
Eucrosia mirabilis.**

Bulbos de la especie vegetal *Eucrosia mirabilis* recoletada en los campos de cantón Catamayo ubicado en la provincia de Loja.

ANEXO B: Adaptación de la muestra vegetal de *Eucrosia mirabilis*.



**Desecación de la muestra vegetal en la
estufa redLINE by BINDER**



Materia vegetal desecada



Molino de cuchillas giratorias
Arthur H. Thomas C.O. modelo Willey Mill

ANEXO C: Obtención del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*.



Maceración de los bulbos secos
y triturados con metanol



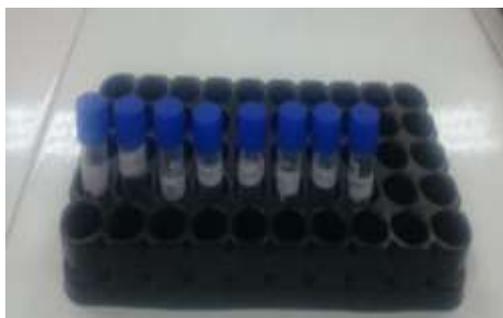
Extracción de alcaloides
con acetato de etilo



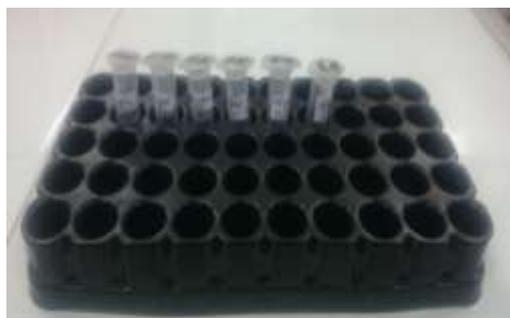
Vial con alcaloides de la especie

Eucrosia mirabilis.

ANEXO D: Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*.



Diluciones del compuesto de referencia:
galantamina.



Diluciones de la muestra alcaloidal de la especie vegetal: *Eucrosia mirabilis*.



Análisis de la microplaca en el espectrofotómetro MULTISKAN GO
Thermo Scientific.

ANEXO E: Curvas inhibitorias de acetilcolinesterasa (AChE) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*, obteniendo la concentración inhibitoria media (IC₅₀) representada en el Gráfico 1E, Gráfico 2E y el Gráfico 3E.

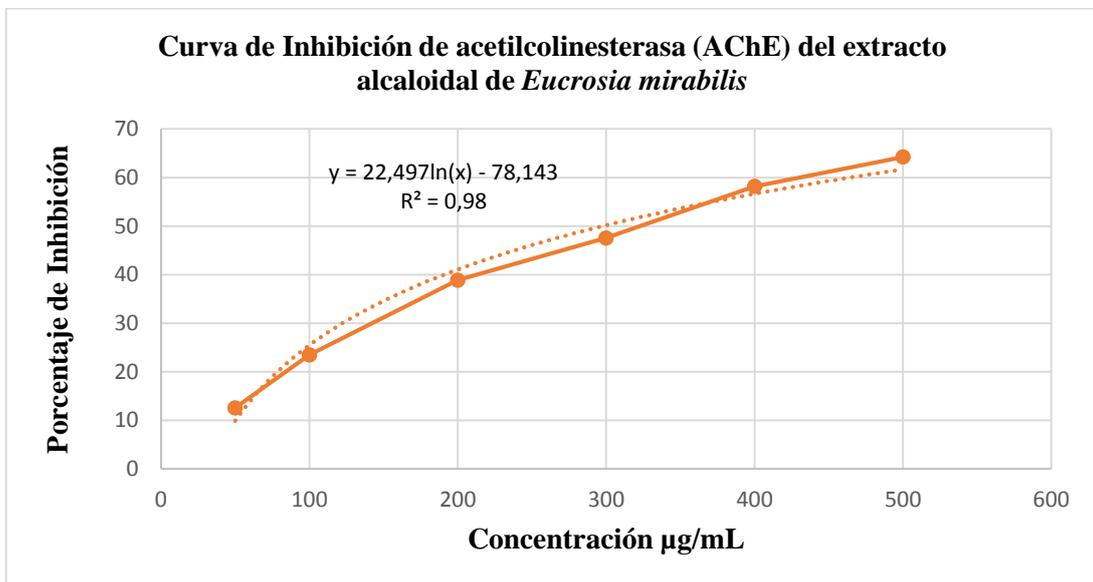


Gráfico 1E. Curva de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*, 1ra Repetición.

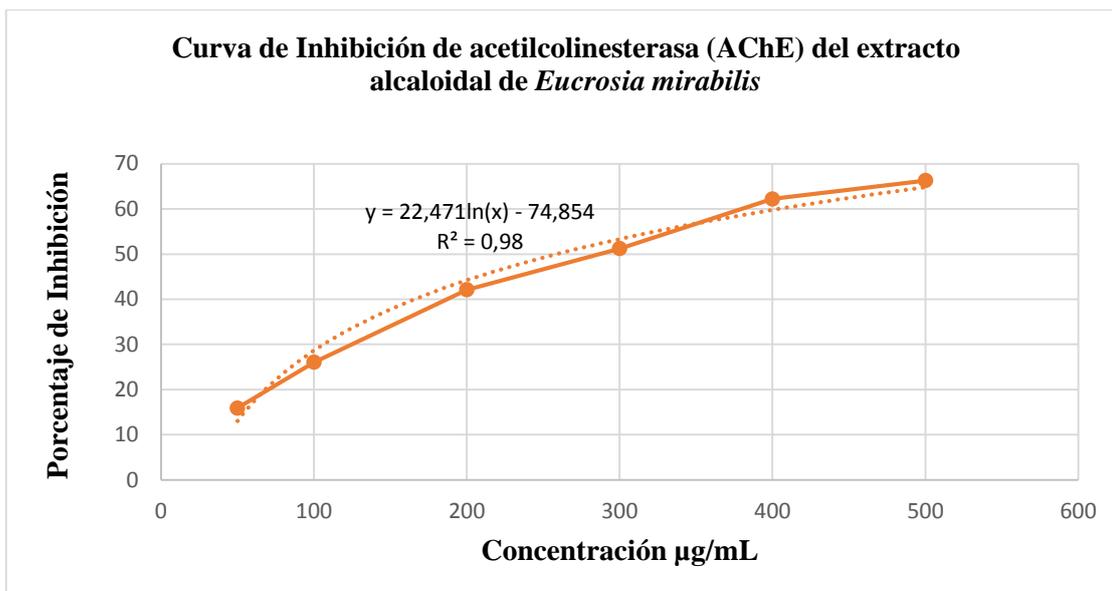


Gráfico 2E. Curva de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*, 2da Repetición.

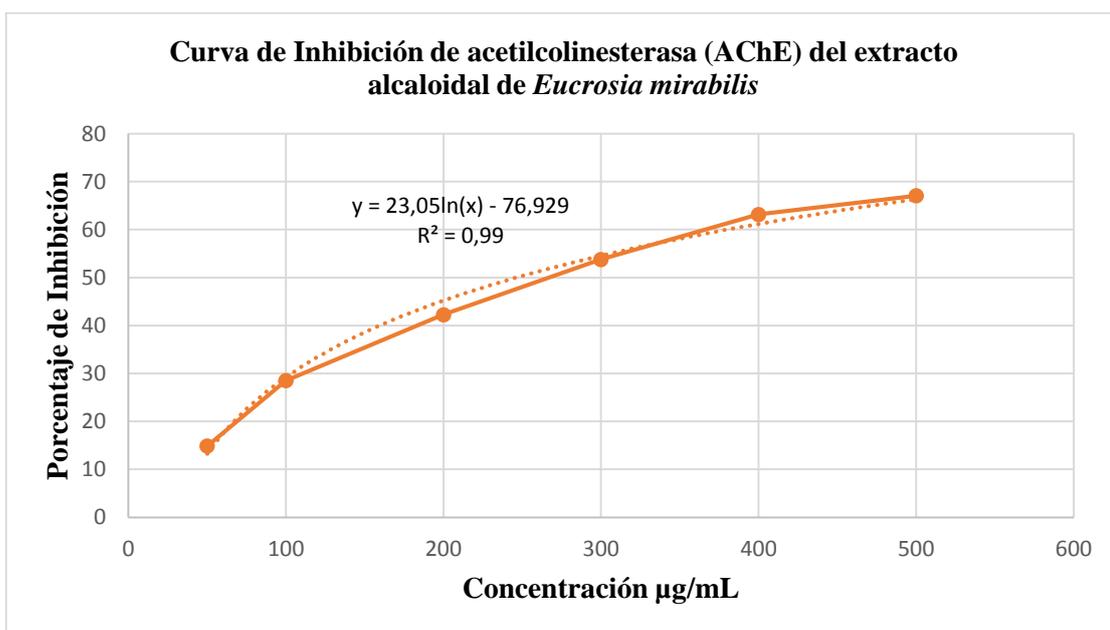


Gráfico 3E. Curva de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*, 3ra Repetición.

ANEXO F: Curvas inhibitorias de butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*, obteniendo la concentración inhibitoria media (IC_{50}) representada en el Gráfico 1F, Gráfico 2F y Gráfico 3F.

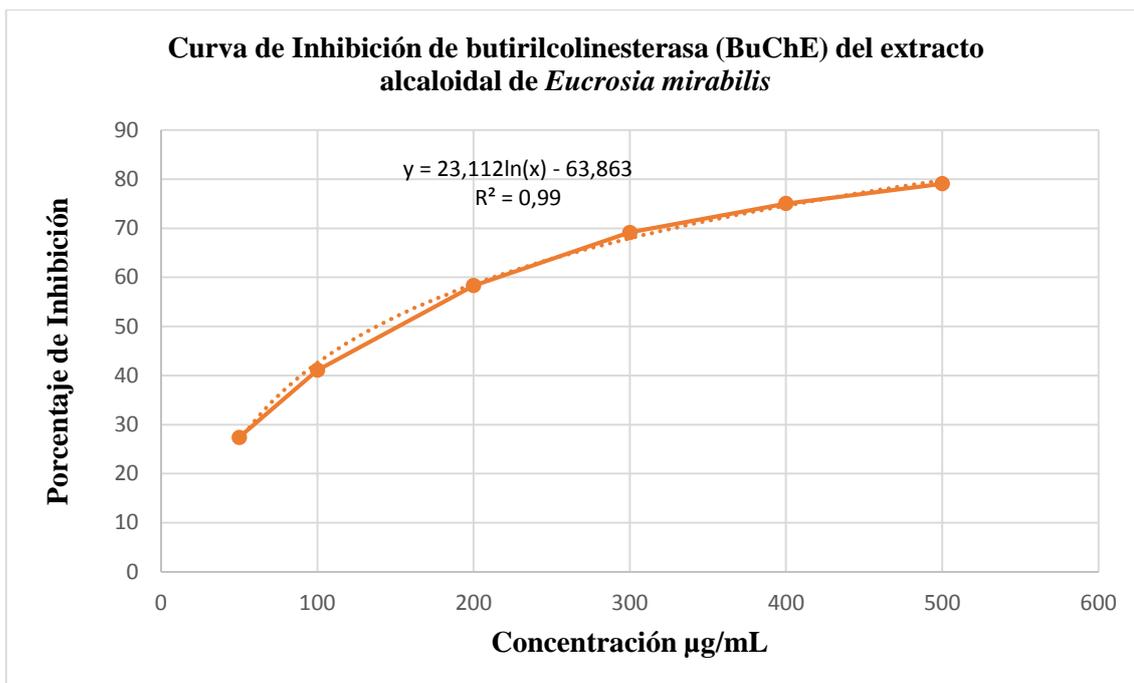


Gráfico 1F. Curva de inhibición de butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*, 1ra Repetición.

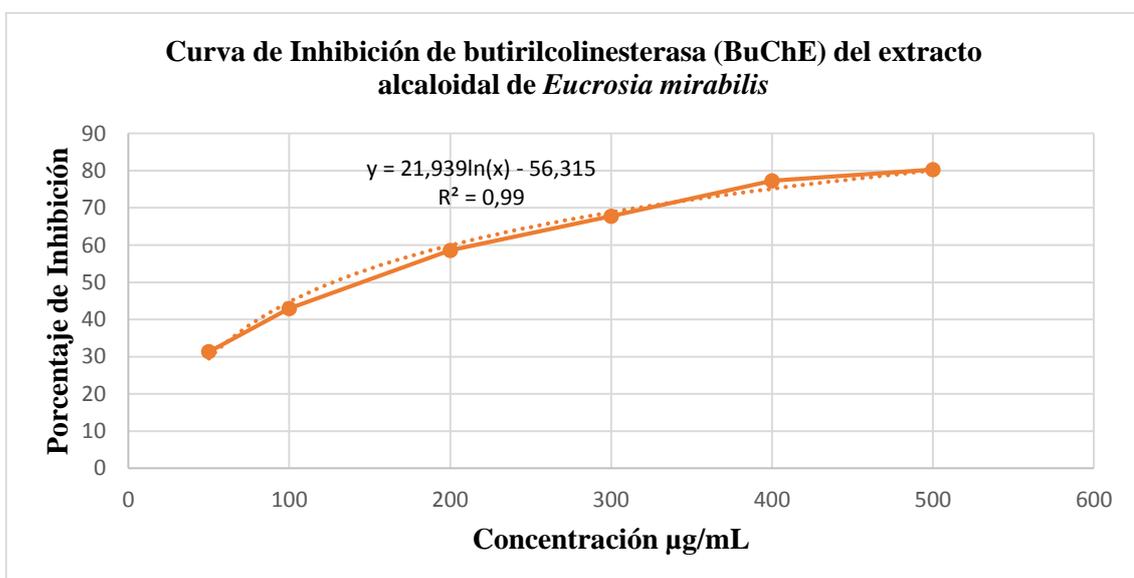


Gráfico 2F. Curva de inhibición de butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*, 2da Repetición.

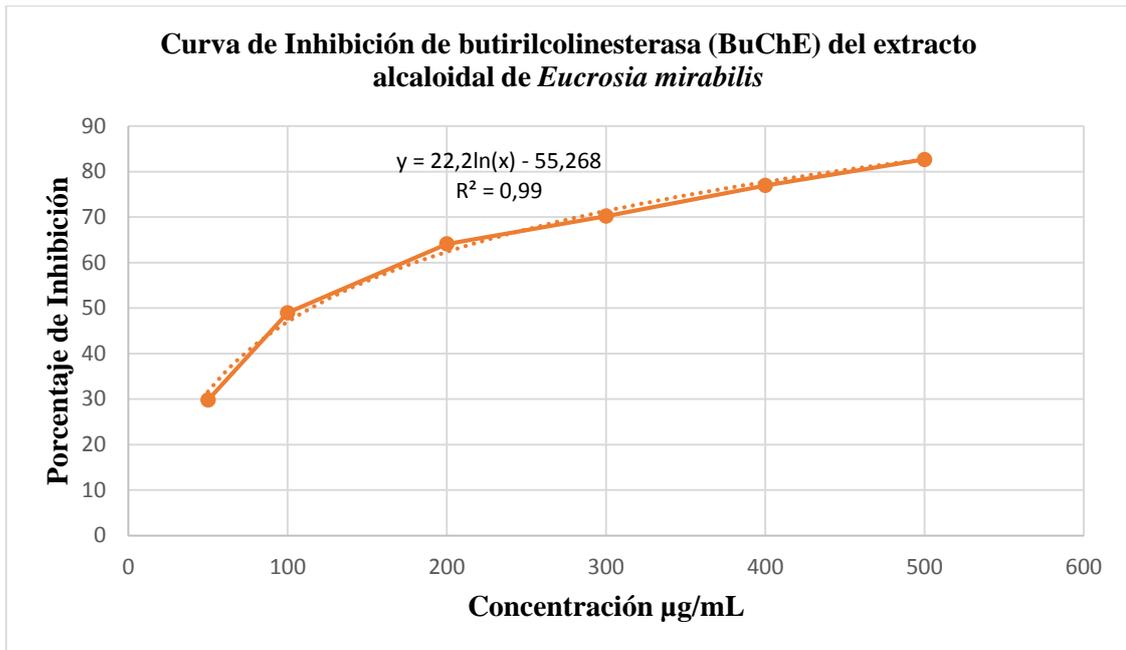


Gráfico 3F. Curva de inhibición de butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto alcaloidal de *Eucrosia mirabilis*, 3ra Repetición.

ANEXO G: Permiso de movilización de bulbos de la especie vegetal *Eucrosia mirabilis*.



Ministerio del Ambiente

GUIA DE MOVILIZACIÓN INTERNA DE ESPECIMENES DE FLORA SILVESTRE

Nro: 017-2017-UPN-VS-DPAL-MAE

Fecha de emisión: 09 de agosto de 2017
Fecha de movilización: 10 de agosto de 2017
Válido hasta: 10 de agosto de 2017

La Dirección Provincial de Loja autoriza a: Karen Lisseth Acosta León con cédula No. 1003089016, para que movilice desde: el cantón y provincia de Loja, hasta: el Herbario de la Universidad Tecnológica de Iberoamérica de la provincia de Pichincha, muestras botánicas en base al Contrato Marco No. MAE-DNB-CM-2015-0054 dentro del Proyecto La biodiversidad de *Amaryllidaceae* como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible.

La movilización se realizará por la compañía de transporte terrestre Loja el día 10 de agosto de 2017 por la Sra. Karen Lisseth Acosta León con cédula de identidad Nro: 1003089016, de acuerdo a la siguiente especificación:

Código de muestra	Grupo Biológico	Nombre Científico	Tipo de muestra	# de muestras	Uso que se dará al material	Técnicas a utilizarse	Tratamiento final de la muestra
				# de envases			
Sin código	Flora	<i>Eucrosia mirabilis</i>	Muestra biológica	3 muestras (Bulbo)	Taxonomía y sistemática	Manual	Herbario de la Universidad Tecnológica de Iberoamérica

Observaciones:

Solicitud de la Karen Lisseth Acosta León con Cédula de Identidad 1003089016 dentro del Proyecto La biodiversidad de *Amaryllidaceae* como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible responsable del transporte, manifiesta que las muestras permanecerán en el Herbario de la Universidad Tecnológica de Iberoamérica.


 Ing. Stella María Pazencia Benú
 COORDINADOR GENERAL ZONAL
 ZONA 7 LOJA EL ORO ZAMORA CHINCHIPE
 DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE LOJA

Karen Acosta León
 BENEFICIARIO
 C.I. Nro. 1003089016

Elaborado por: Epa. Guadalupe Cedeño

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE

Edificio 54-55 entre Indatuburo y Guila - Loja - Ecuador

Teléfono: (000) 05 2674321 / 2674176

www.mambiente.gub.ec

Guía de movilización interna de especímenes de Flora Silvestre
 No: 017-2017-UPN-VS-DPAL-MAE