



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

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE
ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL
EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Phaedranassa dubia*”**

TRABAJO DE TITULACIÓN:
TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: SILVIA ALEXANDRA INCA BENÍTEZ

TUTORA: Lcda. KAREN ACOSTA, M.Sc.

Riobamba – Ecuador

2017

©2017, Silvia Alexandra Inca Benítez

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación “**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Phaedranassa dubia***”, de responsabilidad de la señorita Silvia Alexandra Inca Benítez, 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.

**DIRECTORA DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF. Diego Vinueza Tapia., M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

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

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

Silvia Alexandra Inca Benítez

Cédula de Identidad: 060371705-9

DERECHOS DE AUTORIA

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

Silvia Alexandra Inca Benítez

Cédula de Identidad: 060371705-9

DEDICATORIA

A Dios por guiar mis pasos, y darme fortaleza para afrontar todos los obstáculos que se me han presentado a lo largo del camino, por regalarme tantos momentos de felicidad y una familia maravillosa.

A los pilares de mi vida mis padres, hermana y abuelitos por su apoyo incondicional en cada paso que he dado.

Alexandra

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por guiar mis pasos y darme sabiduría para culminar cada una de mis metas.

A mis padres Silvia y Mario por su amor, consejos y enseñanzas; me han brindado su apoyo incondicionalmente.

A mis abuelitos que con su cariño y oraciones siempre están presentes en cada etapa, a mi hermana, tíos, primos que de una u otra manera han estado prestos a ayudarme en cualquier problema.

A ti, que has sido un soporte fundamental a lo largo de mi carrera y parte de mi vida, gracias por siempre estar a pesar de las circunstancias.

Agradezco profundamente a la Lcda. Karen Acosta, M.Sc., por haber guiado el presente trabajo de titulación, estando siempre presta a colaborar con la resolución de los problemas que se ha presentado a lo largo del mismo, brindándome no solo sus conocimientos sino su amistad.

Gracias al BQF. Diego Vinueza, M.Sc., siempre dispuesto a compartir sus valiosos conocimientos siendo un aporte importante en la obtención de los resultados aquí expuestos. Y de manera general al Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia (GIPRONAF) por su apertura.

Quiero agradecer además al Dr. Jaume Bastida catedrático del Grupo de Productos Naturales de la Universitat de Barcelona (España), a la Dra. Nora Oleas investigadora de la Universidad Tecnológica Indoamérica y al Ing. Félix Falconí docente de la Universidad Nacional de Chimborazo, su ayuda fue fundamental para el cumplimiento de los objetivos planteados en el presente trabajo de titulación.

Alexandra

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterasa
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora de amiloide
ATC	Yoduro de Acetiltiocolina
BTC	Yoduro de Butiriltiocolina
BIFRENES	La Biodiversidad Iberoamericana como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible
BuChE	Butirilcolinesterasa
CG – MS	Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas
CYTED	Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
ChAT	Colinacetiltransferasa
DTNB	5,5´-Ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)
EA	Enfermedad de Alzheimer
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50
LCR	Fluido cerebro espinal
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Buffer fosfato salino
TASE	Fundación Trascender con amor, servicio y excelencia
TNF	Terapia no farmacológica

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	5
1.1. Familia de plantas Amaryllidaceae	5
1.2. Alcaloides de Amaryllidaceae	5
1.3. Amaryllidaceae en Ecuador	6
1.4. <i>Phaedranassa</i>	7
1.5. <i>Phaedranassa dubia</i>	8
1.6. Enfermedad de Alzheimer	9
1.6.1. Factores de riesgo	10
1.6.2. Lesiones cerebrales en la enfermedad de Alzheimer	11
1.6.3. Lesión de los sistemas de neurotransmisores	11
1.6.4. Fases de la enfermedad de Alzheimer	12
1.6.5. Tratamiento farmacológico del Alzheimer	12
1.6.6. Tratamiento no farmacológico	14
1.7. Acetilcolina	15
1.8. Neurotransmisión colinérgica	15
1.9. Acetilcolina y su papel en el Alzheimer	17
1.10. Colinesterasas	17
1.11. Acetilcolinesterasa (AChE)	18
1.12. Butirilcolinesterasa (BuChE)	18

1.13.	Colinesterasas en la enfermedad de Alzheimer.....	18
1.14.	Inhibidores de Colinesterasas.....	19
1.15.	Galantamina	21
1.16.	Ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa	21
1.17.	Método de Ellman	22
1.18.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	23

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	25
2.1.	Lugar de investigación.....	25
2.2.	Recolección del material vegetal	25
2.3.	Identificación botánica	25
2.4.	Equipos materiales y reactivos.....	26
2.4.1.	<i>Equipos</i>	26
2.4.2.	<i>Materiales</i>	27
2.4.3.	<i>Reactivos</i>	28
2.5.	Acondicionamiento del material vegetal	29
2.6.	Obtención del extracto de alcaloides	29
2.7.	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	31
2.8.	Preparación de muestra de alcaloides y compuesto de referencia.	31
2.8.1.	<i>Muestra de alcaloides</i>	31
2.8.2.	<i>Compuesto de referencia</i>	32
2.9.	Acondicionamiento del método modificado de Ellman et al.	32
2.10.	Determinación de la actividad inhibitoria de AChE y BuChE.	32
2.11.	Análisis de Datos	33
2.11.1.	<i>Curva de inhibición para la determinación del IC₅₀</i>	33

CAPÍTULO III

3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1.	Obtención del extracto de alcaloides de <i>Phaedranassa dubia</i>	35
3.2.	Identificación de alcaloides por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas.	35
3.3.	Acondicionamiento del método modificado de Ellman et al.	38
3.3.1.	<i>Etapa 1. Determinación de condiciones de almacenamiento, tiempos a emplearse, área de trabajo y equipos.....</i>	38
3.3.1.1.	<i>Condiciones de almacenamiento de soluciones, sustratos, enzimas, estándar y muestras.....</i>	38
3.3.1.2.	<i>Condiciones del área de trabajo, equipos y tiempos a emplearse.</i>	40
3.3.2.	<i>Etapa 2. Estandarización de Galantamina</i>	40
3.3.2.1.	<i>Actividad inhibitoria de galantamina sobre AChE.</i>	40
3.3.2.2.	<i>Actividad inhibitoria de galantamina sobre BuChE.</i>	41
3.3.3.	<i>Etapa 3. Análisis de la actividad inhibitoria de AChE y BuChE del extracto de alcaloides de <i>Phaedranassa dubia</i>.....</i>	41
3.3.3.1.	<i>Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de <i>P. dubia</i> sobre AChE.</i>	41
3.3.3.2.	<i>Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de <i>P. dubia</i> sobre BuChE.</i>	43
3.4.	Determinación de la actividad inhibitoria de AChE y BuChE del extracto de alcaloides de <i>Phaedranassa dubia</i>.	45
	CONCLUSIONES.....	48
	RECOMENDACIONES.....	49
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Terapias no farmacológicas (TNF) recomendadas en la enfermedad de Alzheimer.....	14
Tabla 2-1:	Ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa.....	22
Tabla 1-2:	Equipos utilizados.....	26
Tabla 2-2:	Materiales de laboratorio utilizados.....	27
Tabla 3-2:	Reactivos utilizados.....	28
Tabla 1-3:	Porcentaje de rendimiento de alcaloides de <i>Phaedranassa dubia</i>	34
Tabla 2-3:	Alcaloides identificados por CG-MS en bulbos de <i>Phaedranassa dubia</i>	35
Tabla 3-3:	Porcentajes de inhibición de AChE de las diluciones del extracto de alcaloides de <i>P. dubia</i> . Prueba 1.....	42
Tabla 4-3:	Porcentajes de inhibición de AChE de las diluciones del extracto de alcaloides de <i>P. dubia</i> . Prueba 2.....	42
Tabla 5-3:	Porcentajes de inhibición de BuChE de las diluciones del extracto de alcaloides de <i>P. dubia</i> . Prueba 1.....	43
Tabla 6-3:	Porcentajes de inhibición de BuChE de las diluciones del extracto de alcaloides de <i>P. dubia</i> . Prueba 2.....	44
Tabla 7-3:	Porcentajes de inhibición de BuChE de las diluciones del extracto de alcaloides de <i>P. dubia</i> . Prueba 3.....	45
Tabla 8-3:	Actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de <i>P. dubia</i> expresada como IC ₅₀	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Distribución geográfica de la familia Amaryllidaceae.....	5
Figura 2-1: Tipo de alcaloides presentes en la familia Amaryllidaceae.....	6
Figura 3-1: Distribución geográfica de especies del género <i>Phaedranassa</i> en Ecuador.....	8
Figura 4-1: <i>Phaedranassa dubia</i>	8
Figura 5-1: Mapa de distribución de <i>Phaedranassa dubia</i>	9
Figura 6-1 Síntesis de acetilcolina.....	15
Figura 7-1: Neurotransmisión colinérgica.....	16
Figura 8-1: Reacción enzimática en la que se basa el método de Ellman et al. para determinar la actividad inhibitoria de colinesterasas.....	23
Figura 1-2: Procedimiento de obtención del extracto de alcaloides de <i>Phaedranassa dubia</i>	30

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Bulbo de *Phaedranassa dubia* seco y triturado.
- ANEXO B:** Obtención del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia*. Maceración del material vegetal en metanol (FOTOGRAFÍA 1B), evaporación del solvente en rotavapor (FOTOGRAFÍA 2B), acidificación del extracto bruto seco (FOTOGRAFÍA 3B), desengrasado el extracto bruto ácido (FOTOGRAFÍA 4B), extracción con acetato de etilo (FOTOGRAFÍA 5B).
- ANEXO C:** Extracto de Alcaloides del bulbo de *Phaedranassa dubia*.
- ANEXO D:** Soluciones de galantamina (FOTOGRAFÍA 1D) y muestras de alcaloides (FOTOGRAFÍA 2D) empleados en el ensayo de actividad inhibitoria.
- ANEXO E:** Cabina de Flujo Laminar (FOTOGRAFÍA 1E), y espectrofotómetro ELISA empleados en el ensayo (FOTOGRAFÍA 2E)
- ANEXO F:** Curva de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) para obtención de IC₅₀ del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia* realizada por triplicado en microplacas individuales. (GRÁFICO 1F, GRÁFICO 2F, GRÁFICO 3F).
- ANEXO G:** Curva de inhibición de butirilcolinesterasa (BuChE) para obtención de IC₅₀ del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia* realizada por triplicado en microplacas individuales. (GRÁFICO 1H, GRÁFICO 2H, GRÁFICO 3H).

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto de alcaloides de la especie vegetal *Phaedranassa dubia*, perteneciente a la familia Amaryllidaceae. A partir del extracto bruto obtenido por maceración en metanol del bulbo seco y triturado, se obtuvo la fracción alcaloidea mediante el empleo de un protocolo de extracción basado en cambios de pH y uso de solventes orgánicos. Se aplicó Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) con el fin de identificar los alcaloides presentes en el bulbo de *Phaedranassa dubia* y determinar sus respectivos porcentajes. La evaluación de actividad inhibitoria se realizó en base a la metodología modificada de Ellman et al., usando galantamina como compuesto de referencia. El método empleado tuvo que ser previamente acondicionado en función a las características físicas, ambientales y de equipamiento del laboratorio utilizado, para la posterior obtención de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀). Se obtuvo un porcentaje de rendimiento de alcaloides del 0,2%, la CG-EM mostró un total de 9 alcaloides identificados presentes en el bulbo de *Phaedranassa dubia* siendo los más representativos licorina (54,10%), assoanina (13,77%), galantamina (4,54%) y anhidrolicorina (3,71%); a su vez se encontraron 3 alcaloides aun no identificados (m/z 264, m/z 280, m/z 285). El extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia* mostró una actividad inhibitoria sobre AChE expresada como IC₅₀ de 25,48 ± 0,39 µg/mL, en tanto que el compuesto de referencia galantamina exhibió un resultado de 0,30 ± 0,01 µg/mL. En cuanto a la actividad inhibitoria sobre BuChE el extracto de alcaloides totales presentó un IC₅₀ de 114,96 ± 4,94 µg/mL, mientras que el valor para galantamina fue 4,41 ± 0,24 µg/mL. Para ambas colinesterasas los resultados de actividad inhibitoria no superan al compuesto de referencia galantamina y se evidencia mayor afinidad del extracto de alcaloides hacia AChE. Se recomienda realizar estudios fitoquímicos y farmacológicos más profundos de *Phaedranassa dubia* de Ecuador, ya que las investigaciones sobre esta especie son escasas.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA> <FITOQUÍMICA>, <EXTRACTO DE ALCALOIDES> <BULBO (*Phaedranassa dubia*)> <ACTIVIDAD INHIBITORIA> <COLINESTERASAS> <GALANTAMINA> <ENFERMEDAD DE ALZHEIMER>

SUMMARY

The research aimed to determine the inhibitory activity of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) of the alkaloids extract from plant species *Phaedranassa dubia*, belonging to the Amaryllidaceae family. From the gross extract obtained by maceration in methanol of the dry and shredded bulb was used a protocol for extraction of alkaloids based on changes of pH and organic solvents use. Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-EM) was applied with the objective of identifying the alkaloids present in the bulb of *Phaedranassa dubia* and determining their respective percentages. (GC-MS). The inhibitory activity was determined on the basis of the modified methodology of Ellman et al., using galanthamine as a reference compound. The employed method had to be developed based on the physical, environmental and equipment characteristics of the laboratory used, for the subsequent obtaining the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀). It was obtained a performance percentage of alkaloids of 0,2%. GC-MS showed a total of 9 identified alkaloids present in the bulb from *Phaedranassa dubia* being the most representative lycorine (54,10%), assoanine (13,77%), galanthamine (4,54%) and anhydrolycorine (3,71%); in turn 3 unidentified alkaloids (m/z 264, m/z 280, m/z 285) were found. The extract of alkaloids from *Phaedranassa dubia* showed inhibitory activity of AChE expressed as IC₅₀ of 24,48 ± 0,39 µg/mL, with respect to the reference compound galanthamine whose result was 0,30 ± 0,01 µg/mL. As regards the inhibitory activity of BuChE presented an IC₅₀ of 114,96 ± 4,94 µg/mL, being the value of galanthamine 4,41 ± 0,24 µg/mL. For both cholinesterases inhibitory activity results not exceed reference galanthamine compound and there is evidence of greater affinity of the extract of alkaloids to AChE. It is Recommended phytochemical and pharmacological studies more deep from *Phaedranassa dubia* of Ecuador, research on this species are scarce.

Keywords: <BIOCHEMISTRY> < PHYTOCHEMISTRY>, <ALKALOIDS EXTRACT>
<BULB (*Phaedranassa dubia*)> <INHIBITORY ACTIVITY> <CHOLINESTERASES>
<GALANTHAMINE> <ALZHEIMER'S DISEASE>

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer es considerada un problema social muy grave para millones de personas y para los sistemas nacionales de salud de todo el mundo, es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados siguiendo a las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Romano et al., 2007, p.9).

Sin duda, lo que hace que esta enfermedad tenga un impacto tan grande es su carácter irreversible, dificultades en el diagnóstico, la falta de un tratamiento curativo y la carga que los afectados representan a sus familias (Romano et al., 2007, p.9).

Según la Organización mundial de la salud (OMS), en el mundo existen 47,5 millones de personas que tienen demencia y cada año incrementan 7,7 millones de casos. En el año 2016, el Alzheimer se consideró la causa más común de demencia con un 60 % - 70% de los casos (OMS, 2017).

En Ecuador en el año 2014, la Fundación Trascender con Amor, Servicio y Excelencia (TASE) junto con otras instituciones que trabajan con adultos mayores plantearon a la Comisión del Derecho a la Salud de la Asamblea Nacional la inclusión del capítulo “Alzheimer y otras demencias” en el Código Orgánico de la Salud ya que al ser esta enfermedad la cuarta causa de mortalidad en el país se necesita que el estado la reconozca de interés prioritario y se creen los protocolos suficientes que garanticen su evaluación, diagnóstico temprano y tratamiento inmediato de quienes la padecen (Asamblea Nacional del Ecuador, 2014).

El Ministerio de Salud Pública del Ecuador, dentro de sus prioridades de investigación de salud 2013 – 2017, incluyó una línea de investigación enfocada a las enfermedades neurológicas siendo una de sus sublíneas la enfermedad de Alzheimer, con el fin de optimizar recursos para realizar investigaciones que aporten positivamente al tratamiento de esta patología, logrando así coordinar esfuerzos de todos los actores del sistema de salud; y de esta manera alcanzar los objetivos del Plan Nacional del Buen Vivir (Ministerio de Salud Pública, 2013).

El Alzheimer es un tipo de demencia progresiva e irreversible que presenta como su síntoma más temprano el déficit de memoria, aunque su etiología aún no está bien definida se establecen

múltiples factores que provocan esta patología, como es el deterioro de la neurotransmisión colinérgica en el cerebro provocada por una disminución de los niveles de acetilcolina; lo cual interviene indiscutiblemente en la patogénesis y progresión de esta enfermedad (Gabriel et al., 2017, p.3).

Por lo tanto, la mayoría de los tratamientos farmacológicos empleados en esta patología están enfocados a la inhibición de las enzimas hidrolíticas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) que juegan un papel fundamental en la neurotransmisión colinérgica en el cerebro reduciendo el metabolismo de acetilcolina (Li et al., 2017, p.5).

Estudios han comprobado que un número significativo de compuestos producidos por plantas inhiben la acetilcolinesterasa y ya son usados como inhibidores potentes de esta enzima y por ende son una alternativa importante en el tratamiento del Alzheimer (Konrath et al., 2013, p.1704).

Siendo este el caso de la familia de plantas Amaryllidaceae que contiene alcaloides con alta afinidad al sistema nervioso central que intervienen en su actividad ejerciendo una amplia gama de efectos fisiológicos interesantes, dentro de los cuales la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa es la más relevante (Cortes et al., 2015, p.5).

Como lo menciona Ortiz y colaboradores en su artículo “*Alkaloids from Hippeastrum argentinum and Their Cholinesterase Inhibitory Activities: An in Vitro and in Silico Study*” la familia Amaryllidaceae es una fuente bien conocida de alcaloides que inhiben la acetilcolinesterasa y en menor medida, la butirilcolinesterasa (Ortiz et al, 2016).

El alcaloide galantamina es un inhibidor competitivo de la acetilcolinesterasa, actualmente utilizada para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (López et al., 2002, p.2522).

Aun habiéndose conseguido la síntesis de galantamina a nivel industrial, este alcaloide exclusivo de la familia Amaryllidaceae se obtiene principalmente por extracción de materias primas vegetales. Sin embargo, la cantidad obtenida es insuficiente respecto a las necesidades del mercado, que siguen aumentando anualmente (CYTED., 2016).

Ante este contexto, actualmente la investigación en química medicinal está enfocada en la búsqueda de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa con actividades

multifuncionales y multiobjetivo que puedan ser potencialmente usados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. (Huan et al, 2014, p.15)

La actividad inhibitoria de estas enzimas hidrolíticas es determinada mediante la técnica colorimétrica propuesta por Ellman y colaboradores en el año 1961 (Ellman et al, 1961) usando extractos de plantas que se sospecha presentan este tipo de actividad.

Torras-Claveria y colaboradores, en el año 2013 evaluaron la actividad inhibitoria de más de 100 plantas del género *Narcissus* (Amaryllidaceae), en donde la galantamina fue encontrada en 97 de estas (Torras-Claveria et al, 2013, p.237-244); comprobando así la eficiencia de esta técnica y la presencia de este tipo de compuestos en la familia vegetal Amaryllidaceae.

Varios grupos de investigación están enfocando sus esfuerzos en este tipo de estudios como es el caso del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) y su proyecto La Biodiversidad Iberoamericana como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible (BIFRENES) que tiene como objetivo establecer las bases para el aprovechamiento de recursos naturales en búsqueda de principios activos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas, generando capacitación de personal para la explotación sostenible de dichos recursos. (CYTED., 2016)

En Ecuador existen 36 especies de plantas de la familia Amaryllidaceae de las cuales 15 son endémicas y en su mayor parte pertenecen a los géneros *Phaedranassa* y *Eucrosia* (Oleas, 2011, p.87) las mismas que no han sido sometidas a ningún tipo de estudio que permitan determinar si uno o varios de los alcaloides que sintetizan puedan ser potencialmente utilizados para el tratamiento de Alzheimer.

Por lo cual, este trabajo de investigación que forma parte del proyecto BIFRENES de la red CYTED tiene como objetivo determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia*, especie de la familia Amaryllidaceae ubicada en la Sierra ecuatoriana y de esta manera contribuir a la investigación en nuestro país y a la búsqueda de posibles mejoras en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General.

Determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia*.

Objetivos específicos.

- Obtener el extracto de alcaloides de los bulbos de la especie vegetal *Phaedranassa dubia* mediante un protocolo basado en cambios de pH y uso de solventes orgánicos.
- Identificar los alcaloides presentes en el extracto obtenido mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.
- Acondicionar el método modificado de Ellman et al. para el estudio de inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa de acuerdo a las condiciones físicas ambientales y de equipamiento del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Chimborazo.
- Comparar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia*, frente al compuesto de referencia galantamina.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Familia de plantas Amaryllidaceae

Amaryllidaceae es una familia de plantas monocotiledóneas herbáceas perennes con raíces bulbosas y flores muy vistosas. Se sabe que existen cerca de 70 géneros y 1600 especies localizadas principalmente en regiones tropicales y subtropicales a nivel mundial siendo sus centros principales de distribución América del Sur, Norte y Sur de África y la región mediterránea de Europa (Laboratorio de Sistemática de Plantas Vasculares, 2013).

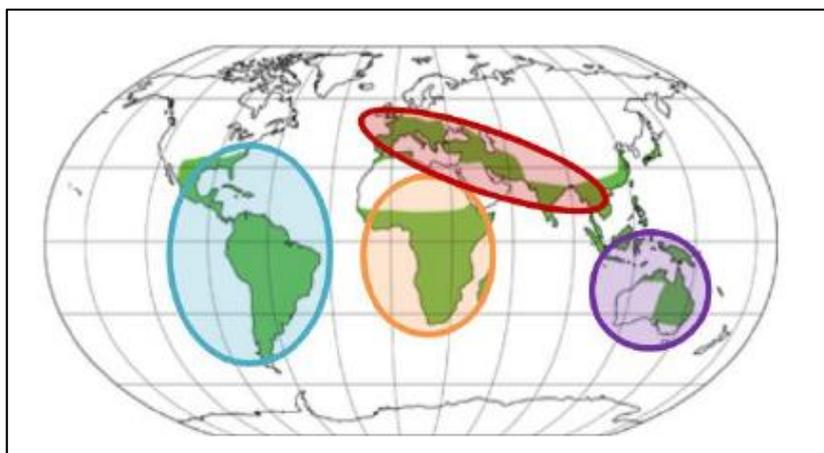


Figura 1-1: Distribución geográfica de la familia Amaryllidaceae

Fuente: (Acosta León, 2013, p.8)

1.2. Alcaloides de Amaryllidaceae

La familia de plantas Amaryllidaceae posee un grupo exclusivo de alcaloides de tipo isoquinolina que han sido aislados de prácticamente todos los géneros de esta familia. El primer alcaloide aislado fue licorina a partir de la especie vegetal *Narcissus pseudonarcissus* en 1877

desde entonces se han producido grandes progresos en el estudio de estas plantas, pero aún quedan fuentes fotoquímicas sin explorar (Bastida, Lavilla y Viladomat, 2006, p.89).

Hasta la actualidad se han aislado aproximadamente 300 alcaloides de esta familia de plantas que se clasifican en 9 grupos distintos que se observan en la figura 2-1.

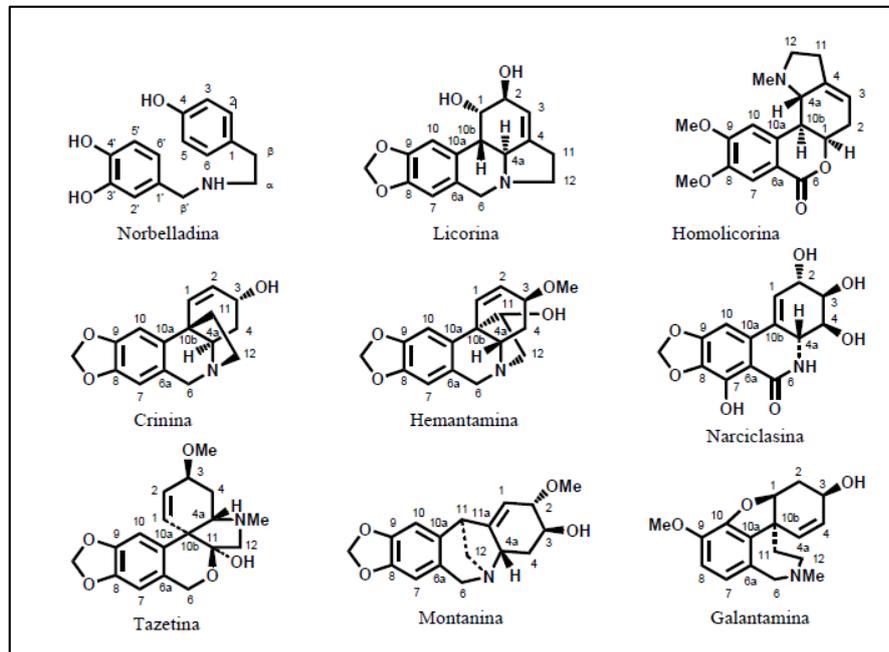


Figura 2-1: Tipo de alcaloides presentes en la familia Amaryllidaceae

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

1.3. Amaryllidaceae en Ecuador

En Ecuador existen 36 especies de plantas de la familia Amaryllidaceae de las cuales 15 son endémicas y en su mayor parte pertenecen a los géneros *Phaedranassa* y *Eucrosia* localizadas principalmente en el norte de la cordillera de los Andes, las especies endémicas de esta familia se encuentran distribuidas entre los 0 y 4000 metros de altitud, en hábitats diferentes como bosques andinos, valles secos interandinos y bosques del litoral seco y húmedo. Todas estas especies endémicas se encuentran amenazadas, 6 en peligro de extinción y 4 vulnerables por lo que su explotación debería ser controlada (Oleas, 2011, p.87; Minga et al., 2015; Meerow et al., 2015).

1.4. *Phaedranassa*

Phaedranassa es un género de la familia Amaryllidaceae determinado por Herbert en el año de 1845 a partir de un espécimen originalmente llamado *P. chloracra* (Oleas, 2011, p.7). Abarca 10 especies de plantas, de las cuales, 8 se encuentran en Ecuador y los tres restantes en Colombia y Costa Rica (Meerow, 1990; Minga et al, 2015).

Son consideradas especies de montaña, frecuentemente crecen colonizando bordes de carreteras, y por lo general entran en floración después de la temporada seca de verano (Meerow, 1990; Minga et al, 2015).

Las especies del género *Phaedranassa* son geófitas. Tienen bulbos cubiertos por una túnica color marrón y raíces contráctiles. Presentan una lámina elíptica o lanceolada, con un ápice agudo y una base estrecha hacia el pecíolo (Meerow, 1990).

Las hojas tienen una vena central prominente en toda su longitud. Tienen hojas, que varían en el color y el tamaño dependiendo de las especies. *Phaedranassa* desarrolla una inflorescencia pseudo-umbrela que presenta de 6 a 20 flores de forma tubular. Las flores son actinomorfas, cada flor presenta seis pétalos, que suelen ser de color verde en la base desde el ápice y al final de tonalidad rojo, rosa, amarillo o naranja (Meerow, 1990).

Además, presentan 6 estambres libres anclados en la base a los pétalos. Los filamentos estaminales son 3 y presenta unas anteras son de color amarillo o verde. El ovario es inferior y con múltiples óvulos. El fruto es una cápsula que contiene muchas semillas aladas de color marrón oscuro o negro generalmente de forma plana (Meerow, 1990).

En Ecuador encontramos las especies *Phaedranassa brevifolia*, *P. cinérea*, *P. dubia*, *P. cuencana*, *P. glauciflora*, *P. tunguraguae*, *P. schizantha*, *P. viridiflora* (Oleas, 2011, p.7). Su distribución se evidencia en la figura 3-1.

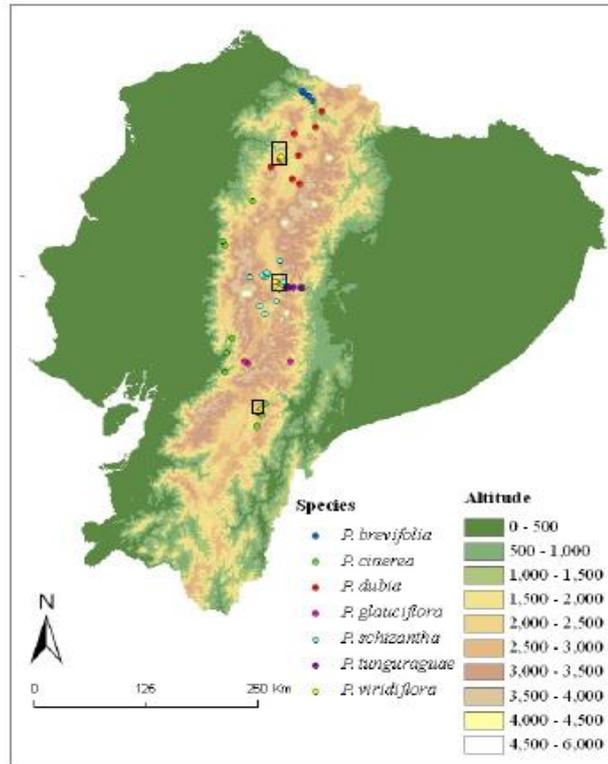


Figura 3-1: Distribución geográfica de especies del género *Phaedranassa* en Ecuador.

Fuente: (Oleas, 2011, p.79)

1.5. *Phaedranassa dubia*

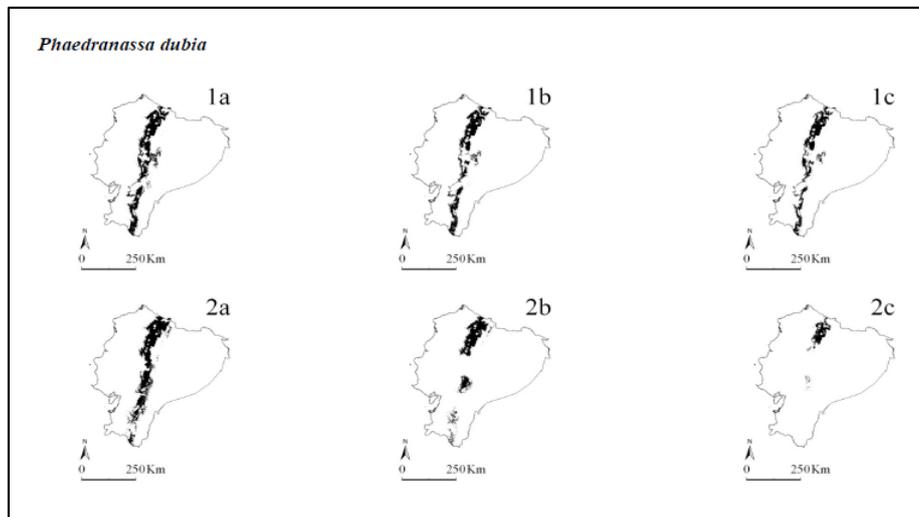


Figura 4-1: *Phaedranassa dubia*

Realizado por: Alexandra Inca. 2017

Phaedranassa dubia conocida comúnmente como cebolla de gallinazo o papa del lobo es nativa de Colombia y Ecuador en este último se encuentra en las provincias andinas de Carchi, Imbabura, Pichincha y Napo, desde los 2000 hasta los 4000 metros sobre el nivel del mar.

Esta especie se caracteriza por ser una hierba terrestre con un bulbo de 6 x 4.5 cm, dos a tres hojas raramente presentes en antesis, peciolo de hasta 10 cm de largo; cuenta con 4 flores de hasta 6 cm de largo, campanuladas y tubuladas, tépalos rosados, verde con amarillo hacia los márgenes y con una franja delgada amarilla cerca del ovario, presenta fruto en forma de cápsula de hasta 15 x 27 mm y semillas con testa negra, brillante (Plantas nativas de la hoya de Quito, 2002).



Interpretación: las áreas oscuras indican presencia de la especie

Figura 5-1: Mapa de distribución de *Phaedranassa dubia*.

Fuente: (Oleas, 2011, p.79)

1.6. Enfermedad de Alzheimer

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa, irreversible con características patológicas y clínicas diferentes; que ataca a las neuronas de la corteza cerebral, así como a sus estructuras adyacentes provocando su muerte (Rodríguez, 1997, p.2-7).

En etapas tempranas esta enfermedad se manifiesta con el olvido de actividades sencillas que se puede atribuir a la vejez, los síntomas van apareciendo paulatinamente, siendo los más comunes la pérdida de las capacidades cognitivas, dificultad para tomar decisiones y realizar las tareas cotidianas, cambios de personalidad y aparición de conducta problemática. En su etapa avanzada provoca demencia y finalmente la muerte (Romano et al., 2007, p.9).

1.6.1. Factores de riesgo

Edad. La edad es considerada el principal factor de riesgo para esta enfermedad, la prevalencia de Alzheimer se duplica cada 5 años tomando como inicio los 60 años de edad (Barranco-Quintana et al. 2005, p.613-618).

Sexo. Se menciona que existe mayor prevalencia de enfermedad de Alzheimer en mujeres que en hombres lo que se relaciona a una mayor expectativa de vida mas no a factores de riesgo específicos relacionados con el sexo (Barranco-Quintana et al. 2005, p.613-618).

Genéticos. Se ha demostrado una asociación importante entre la EA y ciertas mutaciones en el mapa genético de los individuos que afectan a personas entre 30 a 75 años, dentro de los más importantes se encuentran:

- **La proteína precursora del amiloide (APP) y el péptido amiloide:** la función fisiológica de la APP no está bien definida, aunque se la considera una base patogénica de la EA; un hallazgo común en esta patología es el depósito del péptido amiloide $A\beta_{42}$ a nivel extracelular procedente de la degradación de la APP, la acumulación de este péptido amiloide causa la pérdida sináptica y la muerte selectiva de neuronas afectando así al desarrollo de la EA (Fernández, Rodríguez y Combarros, 2013, p.39-44).
- **Mutaciones en el gen de la proteína precursora del amiloide:** se asociado mutaciones del gen de la APP situado en el brazo corto del cromosoma 21 con el inicio precoz de la enfermedad de Alzheimer (Fernández, Rodríguez y Combarros, 2013, p.39-44).
- **Genes de Presenilina:** los genes de presenilina que intervienen en el catabolismo de la APP pueden contribuir a la formación de pequeños péptidos amiloides tóxicos que van a desencadenar la fisiopatología de la EA, por lo que mutaciones en estos genes están relacionadas directamente con el desarrollo de esta enfermedad (Fernández, Rodríguez y Combarros, 2013, p.39-44).
- **Gen de apolipoproteina E (APOE):** las mutaciones del gen de la APOE principalmente del alelo $\epsilon 4$ actualmente son el factor de riesgo más analizado en esta enfermedad.

1.6.2. Lesiones cerebrales en la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es un tipo de demencia senil que en sus inicios se manifiesta en el lóbulo temporal específicamente en la zona del giro dentado del hipocampo, lo que se ha relacionado con los problemas de memoria a corto plazo. Consecutivamente afecta al lóbulo parietal desencadenando la pérdida del conocimiento de hábitos diarios y, finalmente, compromete el lóbulo frontal, lo que ocasiona problemas de comportamiento. La consecuencia final es la muerte neuronal en estas zonas del cerebro (Wilhelmsen, 1999, p.7120-7121).

Además de la muerte neuronal característica en esta patología, es común encontrar en los pacientes que la padecen dos tipos de estructuras aberrantes las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (Haas, 1999).

Las placas seniles son depósitos extracelulares compuestos por péptido β -amiloide, al contrario de los ovillos neurofibrilares que son depósitos intracelulares formados por filamentos helicoidales emparejados o PHF en los que la proteína asociada a los microtúbulos conocida como tau (τ), en forma modificada es el componente que se encuentra en mayor proporción (Haas, 1999).

La proteína precursora de amiloide (APP) es una proteína integral de membrana con una región extracelular, otra intramembranal y otra citoplásmica, que en condiciones normales permanece anclada a la membrana o puede cortarse liberando la región extracelular por acción de la enzima secretasa α . En condiciones patológicas intervienen la secretasa β y γ que provocan cortes en APP lejanos al sitio de anclaje de membrana lo que da lugar a la formación de péptido β -amiloide que puede autoagregarse para formar estructuras como las placas seniles que son tóxicas para las neuronas (Haas, 1999).

Las placas seniles aumentan con la edad del paciente, mientras que el grado de demencia está relacionado con la muerte de neuronas en lugares específicos y con el número de ovillos neurofibrilares (Arriagada et al., 1992, p.632).

1.6.3. Lesión de los sistemas de neurotransmisores

El primer sistema que se ve afectado en esta patología es el colinérgico, la actividad de la enzima colinacetiltransferasa (ChAT) que interviene en la síntesis de acetilcolina es

anormalmente baja en el cerebro de pacientes que presentan esta enfermedad, principalmente en regiones afectadas por el Alzheimer como el hipocampo y la corteza cerebral (Delacourte, 2002, p.3).

La enzima acetilcolinesterasa es responsable de la degradación de acetilcolina en la hendidura sináptica, los fármacos que la inactiva aumentan las concentraciones de acetilcolina produciendo un efecto positivo en la estimulación de las funciones cognitivas de los pacientes con Alzheimer (Delacourte, 2002, p.3).

Además, es importante destacar que al parecer existe una relación importante entre la proteína precursora de amiloide (APP) y la acetilcolina (Delacourte, 2002, p.3).

La degeneración neurofibrilar se extiende a gran velocidad en las regiones corticales y subcorticales lo que provoca afectación en varios sistemas de neurotransmisores además del colinérgico como son el glutamatérgico, monoaminérgico, serotoninérgico y dopaminérgico (Delacourte, 2002, p.3).

1.6.4. Fases de la enfermedad de Alzheimer

Inicial: sintomatología ligera, el enfermo mantiene su autonomía y requiere supervisión para realizar tareas complejas.

Intermedia: síntomas de gravedad moderada, el enfermo requiere de un cuidador para realizar tareas cotidianas.

Terminal: estado avanzado y terminal de la patología, el enfermo depende completamente de su cuidador. (Romano et al. 2007, p. 10).

1.6.5. Tratamiento farmacológico del Alzheimer

Los tratamientos farmacológicos que deben prescribirse sistemáticamente una vez que ha sido diagnosticada la enfermedad de Alzheimer son los inhibidores de la colinesterasa (donepecilo, rivastigmina, galantamina), memantina y fármacos para los problemas conductuales (Sánchez et al. 2015, p. 4316-4322). A continuación, se detallan cada uno de ellos

Inhibidores de la colinesterasa

Los inhibidores de colinesterasa son el resultado de una larga investigación referente a la atenuación del déficit colinérgico característico de la enfermedad de Alzheimer, conocido desde la segunda mitad del siglo pasado (Sánchez et al. 2015, p. 4316-4322).

Los resultados de los ensayos clínicos han demostrado sólidamente que estos inhibidores estabilizan el curso cognitivo de esta patología durante nueve meses, pasado este plazo el paciente continúa empeorando a un ritmo similar a los pacientes que no han recibido el tratamiento, se trata por tanto de beneficios modestos, pero claramente establecidos lo que justifican su uso en pacientes con buena tolerancia a estos fármacos (Sánchez et al. 2015, p. 4316-4322).

Memantina

Se trata de un antagonista parcial del receptor n-metil-d-aspartato del glutamato, que está implicado en el aprendizaje. Este fármaco posiblemente actúe reduciendo la entrada de calcio en las neuronas y evitando así la degeneración y muerte neuronal (Sánchez et al. 2015, p. 4316-4322).

Memantina produce un ligero beneficio cognitivo y conductual (agitación/agresividad) a partir de la fase moderada de esta patología. Se ha estudiado las ventajas de una terapia combinada con inhibidores de la colinesterasa, de forma que los resultados obtenidos no han sido del todo concluyentes, pero parece existir un beneficio adicional cognitivo y conductual en los pacientes tratados con donepecilo (Sánchez et al. 2015, p. 4316-4322).

Fármacos para los problemas afectivos y conductuales

La utilización de este tipo de fármacos debe estar enmarcada en una serie de principios fundamentales, en primer lugar, se debe tomar en cuenta que no exista contraindicación o intolerancia con el tratamiento de inhibidores de colinesterasa o memantina que esté recibiendo el paciente. En segundo lugar, es necesario analizar los riesgos y beneficios de la administración de estos fármacos y la dosis que requiere el individuo (Sánchez et al., 2015, p. 4320).

Finalmente, el tratamiento debe personalizarse de acuerdo a las características concretas de cada paciente, especialmente en lo que respecta a la comorbilidad física, los tratamientos concomitantes y el perfil de efectos adversos esperables (Sánchez et al., 2015, p. 4320).

Los principales fármacos que pertenecen a este grupo son los antidepresivos, benzodiazepinas, neurolépticos y antiepilépticos (Sánchez et al., 2015, p. 4320).

1.6.6. Tratamiento no farmacológico

Se entiende por tratamiento o terapia no farmacológica en la enfermedad de Alzheimer aquella actuación no química, teóricamente sustentada, estructurada y replicable que produce un beneficio clínicamente relevante (Sánchez et al., 2015, p. 4316-4322).

Los tratamientos no farmacológicos recomendados para las personas que padecen esta patología aparecen en la tabla 1-2.

Tabla 1-1: Terapias no farmacológicas (TNF) recomendadas en la enfermedad de Alzheimer.

Terapia no farmacológica	Características esenciales
Estimulación cognitiva	Sesiones grupales, temáticas, en las que se ponen en juego capacidades cognitivas.
Estimulación cognitiva enriquecida	Se añade, a la estimulación cognitiva, reminiscencia, ejercicio aeróbico, psicomotricidad, entrenamiento de actividades de la vida diaria, talleres, etc.
Entrenamiento de actividades de la vida diaria	Ejecución completa y sin error de actividades de la vida diaria, ofreciendo la menor ayuda necesaria
Intervenciones conductuales	Análisis y modificación de los antecedentes y consecuencias de la conducta, con el familiar cuidador.
Entrenamiento cognitivo	Ejercicios individualizados dirigidos a la mejora de capacidades cognitivas específicas
Rehabilitación cognitiva	Uso de estrategias de restauración o de compensación para mantener la autonomía o la satisfacción en funciones o actividades relevantes desde el punto de vista individual.
Musicoterapia	Empleo de la música de forma individual o en grupo, activa o pasiva, para mejorar la afectividad, la conducta y la comunicación
Reminiscencia	Elaboración y empleo de materiales del pasado remoto para mejorar la efectividad y la orientación.
Ejercicio aeróbico	Ejercicios de fortalecimiento de musculatura, equilibrio y coordinación.

Fuente: (Sánchez et al. 2015, p. 4316-4322)

Realizado por: Alexandra Inca. 2017

1.7. Acetilcolina

En 1921 Otto Loewi demostró mediante un sencillo experimento la presencia de un mediador químico al estimular la inervación autonómica del corazón de una rana. Esta sustancia fue caracterizada químicamente en el año de 1929 y recibió el nombre de acetilcolina dado que su estructura química consta de un éter del ácido acético y la colina (Flores y Segura, 2005, p.315).

El efecto fisiológico más importante de la acetilcolina es la reducción de la permeabilidad de potasio, de tal manera que las neuronas sensibles a este neurotransmisor son más susceptibles a otras influencias excitatorias (Flores y Segura, 2005, p.315).

Todas las regiones de la corteza cerebral están inervadas por acetilcolina, por lo que no es de extrañar que la función cortical esté fuertemente influida por este neurotransmisor lo que se ve reflejado principalmente en los fenómenos de activación cortical, paso de sueño a vigilia y memoria (Flores y Segura, 2005, p.315)

1.8. Neurotransmisión colinérgica

La información entre las neuronas se transmite a través de sustancias químicas conocidas como neurotransmisores, que se liberan en la sinapsis como respuesta a un estímulo específico, una vez que esta sustancia ha sido liberada actúa en receptores específicos y altamente selectivos localizados en la neurona postsináptica. Uno de los neurotransmisores que cumple con este proceso es la acetilcolina, se calcula que del 5% al 10% de los procesos sinápticos son de tipo colinérgico (Flores y Segura 2005, p.316).

La acetilcolina es sintetizada a partir de la colina que se acumula en las neuronas colinérgicas mediante su reacción con la acetil CoA y bajo la influencia de la colinacetiltransferasa (Flores y Segura 2005, p.316).

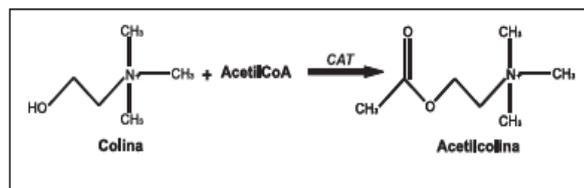


Figura 6-1: Síntesis de acetilcolina

Fuente: (Flores y Segura 2005, p.316)

La síntesis de acetilcolina ocurre en el citosol y posteriormente es almacenada gracias a la acción de un transportador en vesículas sinápticas que por medio de un proceso de exocitosis dependiente de calcio serán liberadas al espacio sináptico (García y Gandía, 2002, p.6-7).

Una vez liberada, la acetilcolina se va unir con receptores muscarínicos y nicotínicos localizados tanto a nivel presináptico como postsináptico. Los receptores muscarínicos localizados a nivel postsináptico, generalmente del subtipo M1 parecen estar relacionados con procesos de aprendizaje, mientras que los localizados a nivel presináptico, fundamentalmente del subtipo M2 ejercen un efecto de retroalimentación negativa, reduciendo la liberación de acetilcolina (García y Gandía, 2002, p.6-7).

Una vez ejercida su acción sobre los diferentes receptores colinérgicos, este neurotransmisor es rápidamente liberado en la hendidura sináptica por acción de la acetilcolinesterasa que degrada la acetilcolina en colina y ácido acético, siendo la colina recaptada en su mayor parte por la terminal presináptica para ser reutilizada para la síntesis de nueva acetilcolina (García y Gandía, 2002, p.6-7).

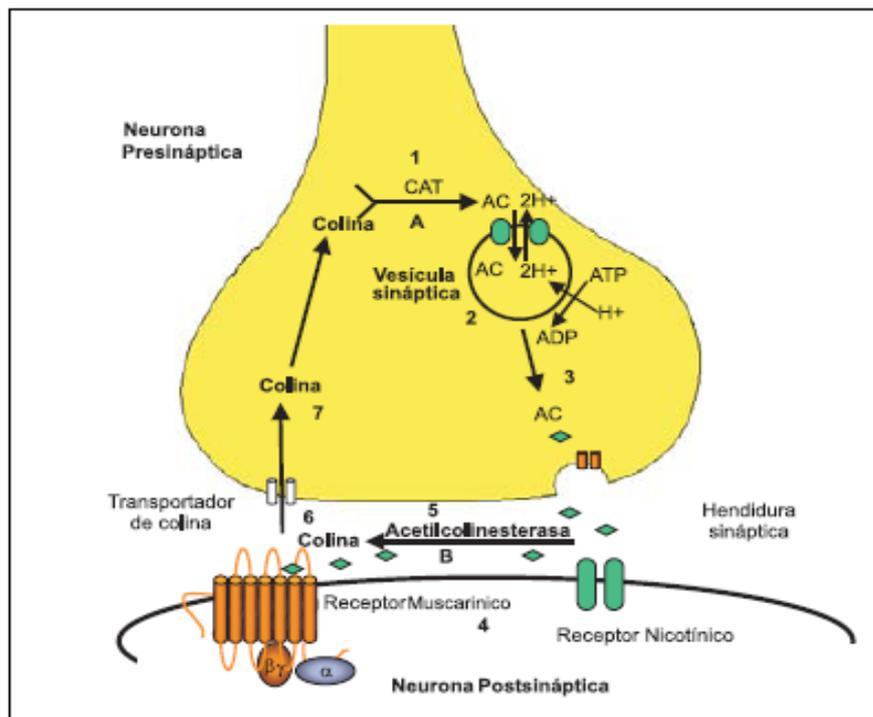


Figura 7-1: Neurotransmisión colinérgica

Fuente: (Flores y Segura, 2005, p.7)

1.9. Acetilcolina y su papel en el Alzheimer

Setenta años después de la descripción del Alzheimer, Davis y Maloney descubrieron una marcada disminución de acetilcolina en los cerebros de los pacientes que padecen esta patología provocando algunos de los síntomas que la caracterizan como es el déficit de memoria y le dieron el nombre de lo que hoy conocemos como hipótesis colinérgica (Davies y Maloney, 1976).

Esta hipótesis postula que la restauración de la neurotransmisión colinérgica es una estrategia útil para mejorar la disponibilidad de acetilcolina sináptica y mejorar la memoria en este tipo de pacientes (Schliebs y Arendt, 2006, p.1626).

La primera estrategia propuesta para el tratamiento del Alzheimer fue el uso de precursores de acetilcolina como la lecitina o la colina, pero la dosis requerida era muy alta no obteniendo el efecto esperado. Se pensó en administrar agonistas postsinápticos de acetilcolina para aumentar el efecto de la poca colina que permanecía en sinapsis, pero produjo efectos tóxicos. Finalmente se buscó aumentar la vida media de la acetilcolina y los inhibidores de la enzima que destruye este neurotransmisor resultaron ser el tratamiento ideal (Alpízar y Morales, 2003, p.50-53).

Por definición, los inhibidores de acetilcolinesterasa intervienen en este proceso al interactuar con la enzima e inactivarla, la duración de la acción colinesterásica depende de la intensidad con que se fijan a la enzima y de la rapidez con que se revierte dicha fijación (Alpízar y Morales, 2003, p.50-53).

Las acciones farmacológicas son resultado de la inactivación de la acetilcolina en los sitios donde ésta se libera fisiológicamente, tanto en el sistema nervioso central como en las terminaciones nerviosas periféricas, somáticas o vegetativas. Su efecto más importante es la activación generalizada y aumento de la situación de vigilia el mismo que se aprovecha en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Alpízar y Morales, 2003, p.50-53).

1.10. Colinesterasas

Augustinsson en 1963 definió a las colinesterasas como un grupo de esterasas capaces de hidrolizar un elevado número de ésteres de colina a mayor velocidad que otros ésteres (Vidal, 1981, p.234).

Las colinesterasas se clasifican dependiendo de sus características bioquímicas y fisiológicas en dos grupos. Por una parte, la colinesterasa verdadera o acetilcolinesterasa que hidroliza a la acetilcolina mucho más rápido que a otros ésteres de colina y es menos activa frente a la butirilcolina y, por otro lado, la colinesterasa plasmática, sérica o butirilcolinesterasa que hidroliza a la butirilcolina, pero también a la acetilcolina. Ambas familias de enzimas muestran reactividad con inhibidores específicos (Sanchez y Salceda, 2008, p.45)

1.11. Acetilcolinesterasa (AChE)

La acetilcolinesterasa es una enzima presente en la mayoría de los seres vivos invertebrados y vertebrados que pertenece al grupo de las hidrolasas (EC. 3.1.1.7). Se localiza en el sistema nervioso central y en los músculos, es responsable de la regulación de la concentración de acetilcolina, neurotransmisor que interviene en la sinapsis colinérgica, permitiendo la transmisión de la señal nerviosa en el sistema nervioso central y periférico (Wiesner et al., 2007, p.417).

1.12. Butirilcolinesterasa (BuChE)

La enzima butirilcolinesterasa es una hidrolasa sintetizada en el hígado su función radica en hidrolizar ésteres de colina como procaína, tetracaína y aspirina, la concentración de BuChE disminuye cuando los hepatocitos están alterados.

Esta enzima interviene en la hidrólisis de acetilcolina con menor especificidad que la acetilcolinesterasa, mientras que muestra su máxima actividad sobre la succinilcolina (Vásquez y Osorio, 2000, p.272).

1.13. Colinesterasas en la enfermedad de Alzheimer

La acetilcolinesterasa (AChE) en el cerebro es 10 veces más abundante que la butirilcolinesterasa (BuChE), mientras que esta última se encuentra en altas concentraciones en el intestino, hígado, corazón y pulmones. En el cerebro la distribución de estas enzimas es diferente, la AChE está localizada dentro de la sinapsis y la BuChE fuera, específicamente en las células gliales, plasma y fluidos intersticiales (Wilkinson et al. 2004, p. 9).

Existe una relación estrecha entre la butirilcolinesterasa glial y la acetilcolinesterasa sináptica, lo que permite que la BuChE hidrolice la acetilcolina cuando la AChE es inhibida.

En la enfermedad de Alzheimer, los niveles de BuChE cerebral aumentan, mientras que los niveles de AChE disminuyen. De forma similar, los niveles de fluido cerebroespinal (LCR) de BuChE aumentan y los de AChE disminuyen Alzheimer (Wilkinson et al. 2004, p. 9).

La BuChE está ampliamente distribuida en las regiones cerebrales afectadas en la enfermedad de Alzheimer, como la corteza temporal, el hipocampo y la amígdala; esto ha dado origen a la teoría de que el metabolismo de la acetilcolina puede llegar a ser más dependiente de la actividad de la BuChE que de la actividad de la AChE a medida que progresa la enfermedad Alzheimer (Wilkinson et al. 2004, p. 9).

Los experimentos in vitro han demostrado que el tratamiento con inhibidores de la colinesterasa afecta a los niveles de AChE en el SNC de pacientes con enfermedad de Alzheimer, provocando resultados finales positivos. (Wilkinson et al. 2004, p. 9).

1.14. Inhibidores de Colinesterasas

Los inhibidores de las colinesterasa comprenden un amplio grupo de compuestos químicos con diferentes propiedades químicas como son los fármacos, toxinas naturales, pesticidas, entre otros (Pohanka, 2011, p.222-225).

Los inhibidores de acetilcolinesterasa juegan un papel primordial en los procesos bioquímicos del cuerpo humano debido a la importancia fisiológica de esta enzima mientras que los inhibidores de butirilcolinesterasa tienen principalmente importancia diagnóstica (Pohanka, 2011, p.222-225).

Por ejemplo, los fármacos que suprimen los síntomas de la enfermedad de Alzheimer a través de su impacto en el sistema colinérgico son predominantemente inhibidores selectivos de la acetilcolinesterasa, aunque los inhibidores selectivos de butirilcolinesterasa también han sido investigados como fármacos potenciales para la enfermedad de Alzheimer, pero en menor grado (Pohanka, 2011, p.222-225).

La inhibición de la acetilcolinesterasa también juega un papel importante en la toxicología del agente nervioso, sin embargo, inhibidores de butirilcolinesterasa pueden sustituir temporalmente al antes mencionado y es capaz de hidrolizar lentamente acetilcolina acumulada (Pohanka, 2011, p.222-225).

Los compuestos que inhiben AChE se pueden dividir en tres grupos básicos:

Compuestos que se enlazan en el sitio activo interactuando con agentes esteríficos: los inhibidores de la parte estérica que se encuentran en el sitio activo son compuestos con la estructura química de los organofosforados o derivados de los carbamatos. La interacción de este tipo de inhibidores se da con la tríada presente en el sitio activo, principalmente con el residuo serina de la misma, mediante la formación de ésteres estables que inactivan el sitio activo (Pohanka 2011, p. 222-225).

Compuestos que interactúan con la cavidad aromática: en general este tipo de compuestos interactúan también con el sitio activo. No obstante, la cavidad aromática no se considera un blanco terapéutico para inhibidores de colinesterasas; sin embargo, compuestos como la galantamina y el decamethonium (obtenido por síntesis) presentan interacciones con esta cavidad y son usados como medicamentos (Pohanka 2011, p. 222-225).

Compuestos unidos al sitio aniónico periférico (β): es uno de los principales blancos que se estudian en la búsqueda y diseño de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. La formación de placas amiloides en las redes neuronales es característica de la enfermedad de Alzheimer este proceso puede ser acelerado por la interacción en el subsitio periférico aniónico; por lo que, si un compuesto interactúa con este sitio aniónico, las placas amiloides no interactuarían con él. Entre los compuestos inhibidores de acetilcolinesterasa que interactúan con este subsitio tenemos la huperzina A (aislada de *Huperzia serrata*) y el donepezil (como mezcla racémica), que son medicamentos comercializados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, siendo la primera además de muy potente con pocos efectos secundarios lo que la diferencia de los otros inhibidores de acetilcolinesterasa (Pohanka, 2011, p 222-225)

1.15. Galantamina

La galantamina es un alcaloide terciario aislado por primera vez en 1952 del bulbo de *Galanthus woronowii*, posteriormente ha sido encontrada en otras plantas pertenecientes a la familia Amaryllidaceae, principalmente especies de narcisos y en especial *Galanthus nivalis* (Bastida, Viladomat y Llabres, 1990, p. 4).

La actividad anticolinesterásica de este alcaloide se identificó casi inmediatamente, desde ese entonces se realizaron los ensayos clínicos de registro que culminaron con la comercialización del fármaco con el nombre de Reminyl® que es una sal, el bromhidrato de galantamina (García y Gandía, 2002, p.188-189)

La galantamina es un inhibidor reversible, competitivo y específico de la acetilcolinesterasa, actúa sobre la vía colinérgica a través de dos mecanismos:

- Bloquea la acción de la enzima acetilcolinesterasa (García y Gandía, 2002, p.188-189).
- Produce una modulación alostérica de los receptores nicotínicos, tanto presinápticos como postsinápticos, de acetilcolina aumentando la afinidad de ésta por los receptores, lo cual ha demostrado que da lugar a una protección de las neuronas frente a la acumulación del péptido β -amiloide y la toxicidad del glutamato, hechos característicos de la enfermedad (Hager et al., 2014).

1.16. Ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa

Para evaluar la capacidad inhibitoria de acetilcolinesterasa de un extracto o compuesto existen varios métodos expuestos en literatura. En la tabla 1-3 se muestran los más relevantes.

Estos métodos están basados en la capacidad de la acetilcolinesterasa de hidrolizar la acetilcolina en acetato y colina, los productos de esta hidrólisis pueden ser detectados directamente o revelados mediante la formación de complejos fluorescentes o coloreados (Castellanos, 2014, p. 21).

Tabla 2-1: Ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa.

TIPO DE ENSAYO	DESCRIPCIÓN
Método colorimétrico usando Ácido Ditiobis-nitrobenzoico (DTNB) y Acetilcolina	Formación de un compuesto de color amarillo, donde la inhibición se observa como manchas de color blanco o disminución del color amarillo
Método colorimétrico usando acetato de 1-naftilo y Fast Blue Salt (FBS)	Formación de un compuesto coloreado (púrpura) por la reacción entre el naftol, producto de hidrólisis del acetato de 1-naftilo, y el compuesto azoico FBS. Las manchas de inhibición son blancas.
Método Químico luminiscente implementando en técnicas HTS	Reacciones enzimáticas acopladas para producir quimioluminiscencia, determinada por la emisión de luz producida por el luminol y la peroxidasa utilizada
Método colorimétrico usando $K_3(FeCN)_6$ y $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	Formación de un complejo coloreado azul en presencia de sales de hierro. La inhibición de la enzima se observa como manchas amarillas claras.

Fuente: (Castellanos-Castillo 2014, p.22)

Realizado por: Alexandra Inca, 2017

1.17. Método de Ellman

El método de Ellman (1961) consiste en una determinación colorimétrica sencilla y rápida que detecta la aparición de tiocolina producida por la hidrólisis del sustrato acetilcolina por la acetilcolinesterasa (Tecles, Subiela y Cerón 2001, p.68).

La tiocolina reacciona con el ácido 5,5'- ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) que actúa como cromóforo produciendo un compuesto de color amarillo, el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, que se puede medir espectrofotométricamente a una longitud de onda de 412 nm (Tecles, Subiela y Cerón, 2001, p.68).

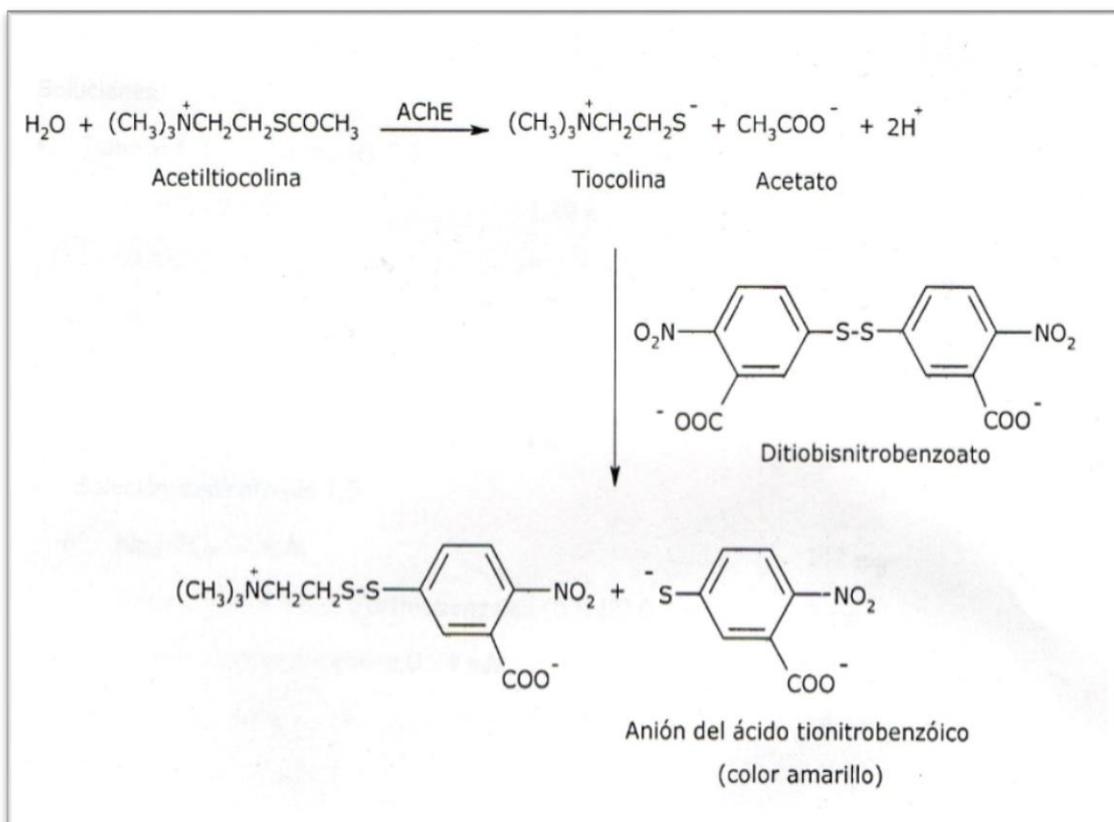


Figura 8-1: Reacción enzimática en la que se basa el método de Ellman et al. para determinar la actividad inhibitoria de colinesterasas.

Fuente: (Ellman et al. 1961, p.88-95)

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

La cromatografía de gases es una técnica que tiene la capacidad de conseguir la separación de mezclas de alta complejidad. Una vez que los componentes individuales de una muestra problema han sido separados, detectados e incluso cuantificados, el único dato disponible para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos, dato que no es suficiente para una identificación inequívoca y aún más si hablamos de muestras con un alto número de componentes (Gutiérrez y Droguet, 2002, p.37).

Por otra parte, la espectrometría de masas es capaz de identificar casi sin errores cualquier componente puro, pero no puede identificarlos si no están previamente separados, debido a la complejidad del espectro obtenido (Gutiérrez y Droguet, 2002, p.37).

Por lo tanto, la asociación de estas dos técnicas permite la separación e identificación de mezclas complejas. El acoplamiento entre un cromatógrafo de gases y un espectrómetro de masas reúne la excelente capacidad de separación que ofrece el cromatógrafo con la sensibilidad y capacidad de aportar información estructural del espectrómetro (Fleurence et al., 1999, p.27).

En la técnica GC-MS, una mezcla de componentes es inyectada en el cromatógrafo de gases la misma se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan instantáneamente al espectrómetro de masas. Cada componente se registra en forma de pico cromatográfico y es identificado mediante su espectro de masas (Gutiérrez y Droguet 2002, p.37).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de investigación

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y en el Laboratorio de Biología molecular de la Universidad Nacional de Chimborazo. Los resultados de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se obtuvieron gracias a la colaboración con la Universitat de Barcelona (España).

2.2. Recolección del material vegetal

La especie *Phaedranassa dubia* en estado de floración se recolectó en el cantón Cotacachi, a 3000 metros sobre el nivel del mar, en la provincia de Imbabura.

2.3. Identificación botánica

La identificación botánica de la planta fue realizada por la Dra. Nora Oleas, botánica responsable del herbario de la Universidad Indoamérica (Quito – Ecuador).

2.4. Equipos materiales y reactivos

2.4.1. Equipos

Tabla 1-2: Equipos utilizados.

EQUIPO	PROCEDIMIENTO
Estufa de secado RedLine by Binder	Secado de droga vegetal Reducción de volumen de extracto de alcaloides.
Molino Arthur H. Thomas C.O	Reducción de tamaño de droga seca
Balanza analítica HDM	Pesajes en varios procedimientos
Agitador magnético	Preparación de reactivos
Refrigerador	Conservación de reactivos y muestras
Congelador (-20°C)	
Congelador (-14°C)	
Sonicador	Obtención de extracto crudo
Rotavapor	Concentración de extractos
pH-metro	Extracción de alcaloides
Espectrofotómetro Elisa BioTeK ELx800	Determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas
Cabina de flujo laminar BIOBASE	
Agitador de tubos	
Agitador de microplacas	
Cronómetro	
Cromatógrafo de gases acoplado a Espectrómetro de masas	Identificación de alcaloides

Realizado por: Alexandra Inca. 2017

2.4.2. Materiales

Tabla 2-2: Materiales de laboratorio utilizados.

MATERIALES	PROCEDIMIENTO
Balones de aforo 10, 100 mL	Preparación de reactivos
Pipeta graduada 1, 5 mL	
Pipetas volumétrica 10 mL	
Probeta 25, 100 mL	
Espátula y micro espátula	
Frascos plásticos tipo viales 5 mL	
Frascos ámbar de vidrio 500, 1000 mL	
Frasco ámbar de vidrio 1000 mL	
Probeta 10, 50 mL	Extracción de alcaloides
Papel filtro	
Embudo y trípode	
Balón para rotavapor	
Embudo de separación 500 mL	
Vaso de precipitación 100, 250, 500 mL	
Frasco de vidrio tipo vial 10 mL	
Desecador	
Tubos Eppendorf para microcentrífuga 0,5 y 1,5 mL	Determinación de la actividad inhibitoria de colinesterasas
Tubos plásticos graduados con tapa rosca 35 mL	
Puntas amarillas, azules, blancas para micropipeta	
Microplacas de 96 pocillos	
Dispensador de líquido para pipeta multicanal	
Bloques de hielo reutilizables	
Caja térmica de Poliestireno expandido 4, 19 L	
Gradillas para tubos	
Cajas porta-tubos	
Toallas de papel tipo tissue y toalla	
Papel aluminio	
Piseta	

Realizado por: Alexandra Inca. 2017

2.4.3 Reactivos

Tabla 3-2: Reactivos utilizados.

REACTIVO	ENSAYO	
Metanol CH ₄ O	Obtención de extracto crudo	
Ácido sulfúrico H ₂ SO ₄ (2% V/V)	Extracción de alcaloides	
Éter etílico (C ₂ H ₅) ₂		
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)		Determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas
Bifosfato de Sodio (NaH ₂ PO ₄)		
Cloruro de Sodio (NaCl)		
Fosfato de disódio (Na ₂ HPO ₄)		
Ácido clorhídrico 0.5 N (HCl)		
Acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus electricus</i> .		
Butirilcolinesterasa de suero equino		
Ácido 5,5 - ditio - bis- (2 - nitrobenzoico)		
Yoduro de Acetilcolina		
Yoduro de Butirilcolina		
Galantamina pura		
Agua destilada	Preparación de reactivos y lavado de materiales	
Agua grado farmacéutico		

Realizado por: Alexandra Inca. 2017

2.5. Acondicionamiento del material vegetal

Se utilizó como material vegetal los bulbos de *Phaedranassa dubia*, los mismos que fueron limpiados y cortados en trozos de aproximadamente 2 centímetros, posteriormente se secaron a 60°C en la estufa RedLine by Binder por 48 horas. Una vez seco el material vegetal, se procedió a molerlo en un molino de cuchillas giratorias marca Arthur H Thomas CO.

2.6. Obtención del extracto de alcaloides

Se pesaron 20g de material vegetal seco y triturado para su maceración con 800 mL de metanol durante 72 horas, aplicando baños de ultrasonido en intervalos de 1 a 2 horas. Posteriormente, se filtró el extracto metanólico y el solvente se evaporó a presión reducida empleando un rotavapor a una temperatura de 50°C. El extracto bruto obtenido, fue sometido a acidificación con H₂SO₄ (2% v/v) y a su limpieza con éter etílico, logrando así separar la fase orgánica compuesta por materias neutras como clorofilas, ceras y mucílagos de la fase acuosa, rica en alcaloides (Acosta León, 2013, p.7).

La fase acuosa ácida se basificó con NH₄OH (10% v/v) hasta conseguir un pH aproximado de 10 y a continuación, los alcaloides fueron extraídos mediante el uso de acetato de etilo, quedando retenidos en la fase orgánica (Acosta León, 2013, p.7).

En dicha fase se añadió sulfato de sodio anhidro y goma arábiga para eliminar los restos de agua, consecutivamente se filtró para eliminar los componentes previamente añadidos. Inmediatamente, el solvente fue evaporado a presión reducida empleando rotavapor a una temperatura de 45°C, obteniendo así el extracto rico en alcaloides (Acosta León, 2013, p.7).

Finalmente, el extracto rico en alcaloides se disolvió con un pequeño volumen de metanol, para facilitar su traspaso a un nuevo envase; posteriormente, el solvente fue evaporado con ayuda de una estufa de secado RedLine by Binder, durante 24 horas para ser conservado a 24°C (Acosta León, 2013, p.7).

El esquema de extracción de los alcaloides de *Phaedranassa dubia* se muestra en la figura 1-2

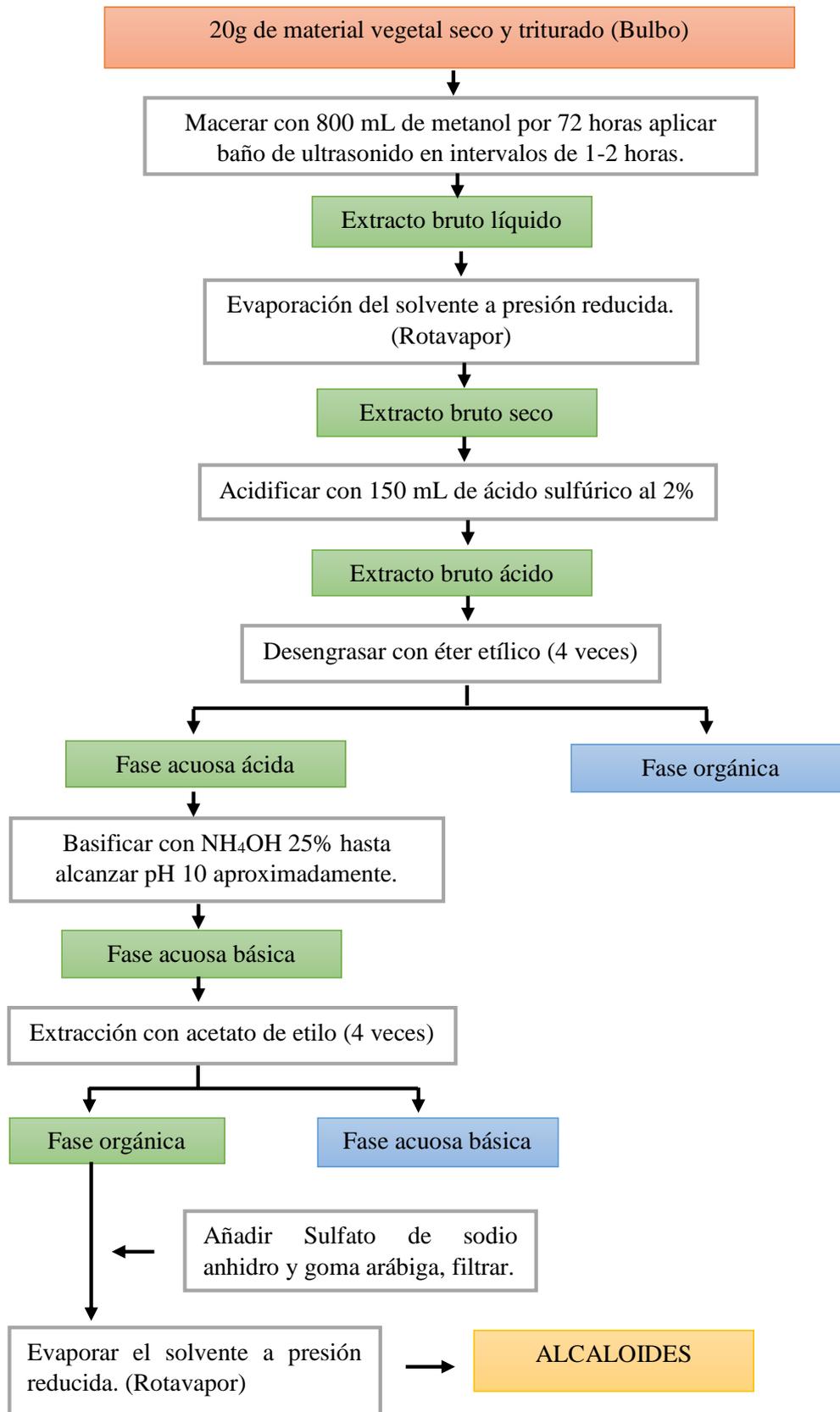


Figura 1-2: Procedimiento de obtención del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia*

Fuente: (Acosta León, 2013, p.7)

Realizado por: Alexandra Inca B.

2.7. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

A partir del extracto de alcaloides disuelto en metanol, se procedió a la realización de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

Se empleó el Cromatógrafo de Gases de Agilent, modelo 6890, acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico (modelo 5975) que opera a 70eV a una temperatura de 230°C en la fuente iónica. El cromatógrafo dispone de una columna SAPIENS-X5-MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), siendo su fase estacionaria la fenilmetilsilicona al 5%.

El programa de temperatura utilizado fue:

- Aumento inicial desde 55 °C a 100 °C (60 °C/min).
- 2 minutos a 100 °C.
- Aumento desde 100 °C a 180 °C (15 °C/min).
- 1 minuto a 180 °C.
- Aumento desde 180 °C a 300 °C (5 °C/min)

Se trabajó a una temperatura de 280 °C en el inyector y el flujo de He fue de 0,8 ml/min y se usó el modo *splitless*. Como alcaloide estándar de referencia para todos los análisis se empleó codeína.

En la obtención y el análisis de los datos espectrales se utilizó el *software* AMDIS 2.71 (NIST), el cual permitió verificar la pureza de las señales y el cálculo de índices de retención.

2.8. Preparación de muestra de alcaloides y compuesto de referencia.

2.8.1. Muestra de alcaloides

Se preparó una solución madre de concentración 10 mg/mL para lo cual se pesó 10 mg del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia* en un eppendorf y se disolvió con 100 µL de metanol, para mezclar se usó agitador vórtex por 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 900 µL de PBS y se homogenizó con ayuda de baño ultrasonido y agitador vórtex, se dejaron precipitar las partículas y las alícuotas necesarias para preparar las diluciones se tomaron del sobrenadante.

2.8.2. Compuesto de referencia

Como compuesto de referencia se empleó galantamina químicamente pura, a partir de la cual se preparó una solución madre de concentración $3,48 \times 10^{-3}$ M, partiendo de esta se realizaron las diluciones necesarias.

2.9. Acondicionamiento del método modificado de Ellman et al.

La determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas de *Phaedranassa dubia* se realizó bajo la metodología establecida por Ellman et al. (1961), con algunas modificaciones de Ortiz et al. (2016), protocolo actualmente empleado en el Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Juan (Argentina).

Previo a la obtención de los resultados finales fue necesario adaptar este método a las condiciones físicas, ambientales y equipamiento del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH) en donde se realizó el análisis.

2.10. Determinación de la actividad inhibitoria de AChE y BuChE.

Una vez establecidas las condiciones necesarias para emplear la modificación del método, se llevó a cabo el ensayo de inhibición en una microplaca de 96 pocillos.

Se adicionó con 50 μ L de las enzimas AChE o BuChE disueltas en buffer fosfato salino (K_2HPO_4 8 mM, NaH_2PO_4 2.3 mM, NaCl 0.15 M en agua grado farmacéutico, pH 7.5), y 50 μ L de la muestra de alcaloides/galantamina disueltas en el mismo buffer.

La microplaca se incubó durante 30 minutos a una temperatura de 21°C y se añadió 100 μ L de sustrato (DTNB 0,005 M + ATC 0,03 M o BTC 0,03 M en Na_2HPO_4 0,04 M, pH 7,5). La absorbancia se leyó en un Espectrofotómetro Elisa BioTeK ELx800 a 405nm 5 minutos después de la adición del sustrato.

Las concentraciones de las muestras evaluadas se expresaron como μ g/mL para los extractos y como μ M para compuestos puros, los resultados de IC_{50} cuyo valor se encontró por encima de

200 µg/mL para extractos y por encima de 200 µM para compuestos puros, se consideran inactivos.

Las concentraciones del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia* empleadas para los ensayos de inhibición en el caso de AChE fueron 1, 5, 10, 20, 50, y 100 µg/mL y para BuChE 10, 20, 50, 100, 150 y 200 µg/mL. La galantamina se usó como compuesto de referencia.

Las enzimas utilizadas fueron AChE de la anguila eléctrica *Electrophorus electricus* (C3389) y BuChE de suero equino (C7512), mientras que los sustratos utilizados en cada caso fueron Yoduro de Acetilcolina (A5751) y Yoduro de Butiriltocolina (20820). Para generar la reacción de color se utilizó ácido ditionitrobenzoico (DTNB, D-8130) todos adquiridos a la empresa Sigma-Aldrich.

2.11. Análisis de Datos

Las absorbancias obtenidas fueron procesadas en el software Microsoft Excel para obtener el porcentaje de inhibición, aplicando la fórmula:

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

Donde:

M: lectura muestra

C: lectura control

BM: lectura blanco muestra

BC: lectura blanco control.

2.11.1. Curva de inhibición para la determinación del IC_{50}

Se graficó la curva de inhibición ubicando en el eje de abscisas (X) la concentración del extracto de alcaloides y en el eje de ordenadas (Y) los porcentajes de inhibición. A continuación, se agregó una línea de tendencia logarítmica y con la ecuación de la misma se calculó la

concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), que representa la concentración a la cual se inhibe el 50% de la actividad enzimática.

Los valores de IC_{50} obtenidos son las medias \pm SD de tres determinaciones individuales, cada una de las cuales se realizó por triplicado.

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia*

Para la obtención del extracto de alcaloides se emplearon 20 g de material vegetal, cuyo porcentaje de rendimiento de extracción se muestra a continuación:

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

Parte de la planta	Peso muestra seca	Volumen de solvente (Maceración)	Extracto rico en Alcaloides	% Rendimiento de alcaloides
Bulbo	20 g	800 mL	40 mg	0,2%

Realizado por: Alexandra Inca. 2017

A partir del extracto bruto obtenido por maceración en metanol del bulbo de *Phaedranassa dubia* seco y triturado, se empleó un protocolo de extracción de alcaloides basado en cambios de pH y uso de solventes orgánicos consiguiendo un rendimiento del 0,2%.

3.2. Identificación de alcaloides por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas.

El análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia* presentó los resultados reflejados en la tabla 2-3.

Tabla 2-3: Alcaloides identificados por CG-MS en bulbos de *Phaedranassa dubia*.

Alcaloide	Rt	RI	% Total
Galantamina	23,418	2432,9	4,54
m/z 285	24,603	2509,7	<0,1
Codeína	24,135	2479,4	6,07
α -dihidrocaranina	24,898	2528,8	0,47
Anhidrocaranina	25,133	2544,1	3,71
Caranina	25,413	2562,2	<0,1
2,4-didehidro-2-dehidroxilicorina	25,608	2574,9	0,59
11,12-dehidroanhidrolicorina	26,655	2645,7	1,23
Licorina	29,060	2812,4	54,10
Assoanina	30,207	2891,9	13,77
2-hidroxihomolicorine	30,644	2922,2	0,62
m/z 280	31,586	2987,6	<0,1
m/z 264	31,699	2995,4	0,33

Interpretación: Rt (Tiempo de retención), RI (Índice de retención), %Total (Porcentaje de abundancia respecto a la mezcla total), m/z (relación masa/carga).

Fuente: Universitat de Barcelona

Realizado por: Luciana Tallini, 2017

El extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia* presenta un total de 9 alcaloides identificados, siendo licorina su componente mayoritario encontrándose en un 54,10 %. Dentro de los alcaloides de abundancia significativa mayor al 3% se encuentran: assoanina (13,77 %) y anhidrolicorina (3,71 %). A su vez, se encontraron compuestos de tipo alcaloideo con un porcentaje menor al 2% como 11,12-dehidroanhidrolicorina (1,23 %), 2-hidroxihomolicorina (0,62 %), 2,4-didehidro-2-dehidroxilicorina (0,59 %), α -dihidrocaranina (0,47 %) y caranina (<0,01 %). Además, se encontraron 3 alcaloides aun no identificados (m/z 280, m/z 264, m/z 285).

En general, se puede observar que el extracto de alcaloides estudiado presenta 4 componentes significativos como son licorina, assoanina, galantamina y anhidrolicorina.

La licorina, encontrada en esta especie en un porcentaje mayor al 50 %, es considerada el alcaloide más común dentro de las especies de la familia Amaryllidaceae y muestra una amplia gama de propiedades biológicas (McNulty et al., 2009, p.914). Dentro de las propiedades biológicas

de este alcaloide resalta su actividad antiprotozoaria frente a *Paramecium caudatum* y antivírica sobre el virus Polio I, Coxsackie y Herpes simplex (Bergoñon, 1994, p.162).

La licorina es considerada un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa de importancia en enfermedades neurodegenerativas (López et al. 2002), propiedad que parece asociarse con la presencia de dos grupos hidroxilo en algunos de los alcaloides de este tipo estructural (Bastida et al., 2011, p.67). Además, es conocida como un quimioterapéutico potencial, demostrándose su capacidad antiproliferativa de una serie de líneas celulares de cáncer (Likhitwitayawuid et al., 1993, p.1332); y se considera un potente antiinflamatorio (McNulty et al., 2009, p.914).

El segundo alcaloide más abundante en esta especie, es la assoanina un derivado de las pirrolofenantridinas descubierto en 1956 por Wildman et al., que posee propiedades anticancerígenas (Caballero, 2012, p.128-129), y actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa que podría explicarse por un anillo aromático C presente en su estructura, lo que le da cierta planaridad a su molécula (Bastida et al., 2011, p.67).

Por otro lado, el extracto de *Phaedranassa dubia* contiene 4,54 % de galantamina que es un alcaloide con usos farmacéuticos definidos, comercializado por primera vez en 2001 como un inhibidor de acetilcolinesterasa relativamente selectivo de acción prolongada, con menos actividad inhibidora de butirilcolinesterasa y algunos efectos secundarios gastrointestinales descritos (Konrath et al., 2013, p.1703).

La única estrategia farmacoterapéutica que ha demostrado una eficacia significativa para mejorar la sintomatología de los pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer es la encaminada a evitar la degradación de acetilcolina. Dentro del grupo de fármacos que cumplen esta función se encuentra la galantamina, que evita la degradación del neurotransmisor; favoreciendo la elevación de los niveles de acetilcolina en la hendidura sináptica, mejorando así la cognición del paciente (Gandía et al, 2006, p.474). Además, mejora la transmisión colinérgica mediante la modulación alostérica de los receptores nicotínicos y se ha utilizado para tratar los síntomas de otras formas de demencia.

Actualmente, la galantamina es aislada de los bulbos de narcisos de la familia Amaryllidaceae por la industria farmacéutica, lo que ha generado un interés exponencial en el aislamiento y caracterización de los alcaloides de los bulbos de varias especies de esta familia de plantas (Konrath et al., 2013, p.1704).

En cuanto a la anhidrolicorina presente en el extracto de alcaloides de esta especie, es un derivado de la licorina que contiene varias propiedades biológicas dentro de las cuales resalta su capacidad para inhibir la biosíntesis del ácido ascórbico, la inhibición del crecimiento y la división celular en plantas superiores, algas y levaduras. Además, posee una notable actividad antibacteriana. Pero la característica más importante de este alcaloide es su actividad antitumoral significativa, misma que está siendo estudiada por diversos investigadores (Guo et al., 2016, p.3).

3.3. Acondicionamiento del método modificado de Ellman et al.

La determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas de *Phaedranassa dubia* se realizó bajo la metodología establecida por Ellman et al. (1961) y algunas modificaciones de Ortiz et al. (2016), protocolo actualmente empleado en el en el Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, de la Universidad de San Juan (Argentina).

Para iniciar los ensayos, fue necesario adaptar el método a las condiciones físicas, ambientales y de equipamiento del Laboratorio de Biología Molecular de la UNACH.

3.3.1. Etapa 1. Determinación de condiciones de almacenamiento, tiempos a emplearse, área de trabajo y equipos.

El primer paso dentro del acondicionamiento del método consistió en proveer a los reactivos utilizados las condiciones de almacenamiento ideales para que su actividad no se vea afectada antes y durante el ensayo; a su vez se definió el área de trabajo, equipos y tiempos a emplearse.

3.3.1.1. Condiciones de almacenamiento de soluciones, sustratos, enzimas, estándar y muestras.

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

Soluciones

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

Estándar

- **Galantamina:** sólido químicamente puro almacenado a -20°C.
- **Diluciones de galantamina:** Soluciones conservadas a 4°C.

Enzimas

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

Sustratos

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

Muestras

- **Extracto de alcaloides:** solución conservada en congelación a -20°C.
- **Diluciones del extracto de alcaloides:** soluciones conservadas a 4°C.

3.3.1.2. Condiciones del área de trabajo, equipos y tiempos a emplearse.

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

- **Área de trabajo:** Cabina de flujo laminar vertical BIOBASE.
- **Temperatura:** La temperatura de trabajo fue de 21°C, controlada constantemente.
- **Presión:** La presión atmosférica del área de trabajo fue de 728.17 hPa.
- **Equipo:** Se empleó un Espectrofotómetro ELISA BioTeK ELx800 de 96 pocillos, sometido a calibración diaria bajo las especificaciones necesarias para la lectura de la microplaca.
- **Tiempo de incubación:** Una vez que se añadió la enzima en la microplaca el tiempo de incubación fue de 30 minutos a 21°C.
- **Tiempo de agitación:** una vez finalizada la adición del sustrato el tiempo de agitación de la microplaca cubierta de la luz fue de 2 minutos manteniendo la temperatura del área de trabajo.
- **Tiempo para la lectura:** previo la lectura de la microplaca a 405 nm, la reacción enzima sustrato debe darse en un tiempo exacto de 5 minutos incluida la etapa de agitación.

3.3.2. Etapa 2. Estandarización de Galantamina

Al ser empleada galantamina como compuesto de referencia es ideal estabilizar su valor de IC₅₀ frente acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa bajo las condiciones antes expuestas.

3.3.2.1. Actividad inhibitoria de galantamina sobre AChE.

En base a parámetros metodológicos, se modificaron progresivamente las variantes de ejecución pipeteo, tiempos de descongelamiento y preparación de reactivos, uso de cabina de flujo laminar y homogenizado de las muestras además se evaluó la vida útil de la enzima; obteniendo un resultado final de IC₅₀ de 1,02 ± 0,06 μM. Al obtener resultados dentro de los parámetros

establecidos por la metodología (Ortiz et al., 2016) en tres ensayos consecutivos, se puede denotar que existe una baja variación entre los resultados y por lo tanto se alcanzó el objetivo de estabilizar el compuesto de referencia frente acetilcolinesterasa.

3.3.2.2. Actividad inhibitoria de galantamina sobre BuChE.

Las variantes de ejecución aplicadas corresponden a las ya definidas en el apartado anterior, únicamente se modificó el volumen de dilución de la enzima hasta obtener una actividad enzimática adecuada, dando como resultado un valor IC_{50} de $14,92 \pm 0,55 \mu M$. Al obtener resultados dentro de los parámetros establecidos por la metodología (Ortiz et al., 2016) en tres ensayos consecutivos, se puede denotar que existe una baja variación entre los resultados y por lo tanto se alcanzó el objetivo de estabilizar el compuesto de referencia frente butirilcolinesterasa.

3.3.3. Etapa 3. Análisis de la actividad inhibitoria de AChE y BuChE del extracto de alcaloides de Phaedranassa dubia.

En esta etapa se definieron las concentraciones del extracto de alcaloides a emplearse en los ensayos en base a los porcentajes de inhibición presentados, de manera que cuando se diseñe la curva, se agregue una línea de tendencia que se acople adecuadamente a los datos y así obtener una ecuación que nos permita calcular correctamente el IC_{50} del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia*.

3.3.3.1. Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de P. dubia sobre AChE.

Prueba 1.

El estudio de extractos de plantas debe iniciarse con la evaluación del comportamiento de la especie frente a la enzima empleando las concentraciones 1, 10, 50, 100 $\mu g/mL$ (Ortiz et al., 2016). Se obtienen los porcentajes de inhibición de cada valor y a partir de estos datos se analiza el comportamiento del extracto de alcaloides de *P. dubia*. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 3-3. Porcentajes de inhibición de AChE de las diluciones del extracto de alcaloides de *P. dubia*. Prueba 1.

Concentración extracto de alcaloides ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de Inhibición de AChE ^a
1	21,465 \pm 0,643
10	41,567 \pm 0,781
50	70,613 \pm 3,457
100	76,661 \pm 0,148

^a Los valores son promedio de tres repeticiones.

Realizado por: Alexandra Inca. 2017

La tabla 3-3 muestra los porcentajes de inhibición de las 4 concentraciones utilizadas en esta prueba, 1 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de alcaloides de *P. dubia* muestra una actividad inhibitoria de 21,46 % y la máxima concentración 100 $\mu\text{g/mL}$ inhibe la acetilcolinesterasa en un 76,66 %.

Para el cálculo de IC_{50} deben existir al menos dos valores de porcentaje de inhibición por encima del 50 % y dos por debajo, así se garantizará el acoplamiento adecuado de los datos a la regresión y por ende los resultados obtenidos. Los datos obtenidos representan una guía para la elección de las 6 concentraciones a utilizarse en los ensayos finales.

Prueba 2.

En base a los porcentajes de inhibición mostrados en la tabla 3-3 se escogieron las concentraciones de 1, 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$, a partir de las cuales se obtuvieron los resultados mostrados a continuación:

Tabla 4-3. Porcentajes de inhibición de AChE de las diluciones del extracto de alcaloides de *P. dubia*. Prueba 2.

Concentración extracto de alcaloides ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de Inhibición de AChE ^a
1	2,419 \pm 0,504
5	22,016 \pm 0,279
10	36,452 \pm 0,140

20	51,613 ± 0,419
50	70,161 ± 0,370
100	77,903 ± 0,140

^a Los valores son resultado de tres repeticiones

Realizado por: Alexandra Inca. 2017

La máxima concentración del extracto de alcaloides de *P. dubia* es capaz de inhibir la acetilcolinesterasa en un 77,90 %. Tres de los 6 porcentajes de inhibición (1, 5, 10 µg/mL) se ubican por debajo del 50 % y los tres restantes por encima (20, 50, 100 µg/mL), por cuanto se está cumpliendo con la condición establecida para el cálculo adecuado de IC₅₀.

3.3.3.2. Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *P. dubia* sobre BuChE.

Prueba 1.

El estudio de actividad inhibitoria de butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Phadranassa dubia* se inició con la evaluación del comportamiento del extracto de alcaloides frente a la enzima empleando las concentraciones de 1, 10, 50, 100 µg/mL como lo recomienda la metodología (Ortiz et al., 2016). Obteniendo los resultados mostrados a continuación.

Tabla 5-3. Porcentajes de inhibición de BuChE de las diluciones del extracto de alcaloides de *P. dubia*. Prueba 1.

Concentración extracto de alcaloides (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de BuChE ^a
1	0
10	2,509 ± 1,161
50	28,346 ± 1,552
100	47,491 ± 0,426

^a Los valores son resultado de tres repeticiones

Realizado por: Alexandra Inca. 2017

Como se muestra en la tabla 5-3 el extracto de alcaloides inhibe la butirilcolinesterasa en menos del 50 %. La concentración de 1 µg/mL no presentó actividad inhibitoria y la máxima

concentración 100 µg/mL inhibe tan solo un 47,49 % de la enzima. Por lo tanto, se requiere un aumento de las concentraciones para obtener valores entre el 1 – 100 % de inhibición.

Prueba 2

Se realizó una segunda prueba incrementando las concentraciones del extracto de alcaloides a 20, 50, 150 y 200 µg/mL. Obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 6-3. Porcentajes de inhibición de BuChE de las diluciones del extracto de alcaloides de *P. dubia*. Prueba 2.

Concentración extracto de alcaloides (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de BuChE ^a
20	12,931 ± 1,493
50	28,831 ± 1,161
150	47,701 ± 0,995
200	63,602 ± 0,598

^a Los valores son resultado de tres repeticiones

Realizado por: Alexandra Inca. 2017

El incremento de las concentraciones utilizadas en esta prueba permitió que la inhibición de butirilcolinesterasa se dé entre un valor mínimo de 12,93 % y un máximo de 63,60 %, lo que nos permite tener una guía para la elección de las 6 concentraciones a emplearse en los ensayos finales.

Prueba 3.

En base a los porcentajes de inhibición que se muestran en la tabla 6-3 se eligieron para la realización de este ensayo las concentraciones de 10, 20, 50, 100, 150 y 200 µg/mL. Obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 7-3. Porcentajes de inhibición de BuChE de las diluciones del extracto de alcaloides de *P. dubia*. Prueba 3.

Concentración extracto de alcaloides ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de Inhibición de BuChE ^a
10	1,326 \pm 1,156
20	11,936 \pm 0,531
50	26,525 \pm 2,358
100	41,645 \pm 0,702
150	50,928 \pm 0,956
200	56,233 \pm 0,459

^a Los valores son resultado de tres repeticiones

Realizado por: Alexandra Inca. 2017

Como se puede observar en la tabla, 5 de las 6 concentraciones (10, 20, 50, 100, 150 $\mu\text{g/mL}$) presentan porcentajes de inhibición por encima del 50 % y tan solo el valor de 200 $\mu\text{g/mL}$ supera este porcentaje inhibiendo en un 56,23 % la butirilcolinesterasa.

Si bien se debería incrementar la concentración del extracto de alcaloides para obtener un rango de inhibición entre 1-100 %, se considera que valores por encima de 200 $\mu\text{g/mL}$ son inactivos frente a la enzima (Ortiz et al., 2016) por lo tanto en el ensayo final se trabajó con las concentraciones empleadas en esta prueba.

3.4. Determinación de la actividad inhibitoria de AChE y BuChE del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia*.

Una vez acondicionado el método modificado de Ellman et al., se realizó el ensayo de inhibición de colinesterasas en tres microplacas individuales cada una por triplicado y usando galantamina como compuesto de referencia.

Los resultados son expresados en valores de IC_{50} que representa la concentración a la cual se inhibe el 50% de la actividad enzimática.

Para la obtención de este valor fue necesario calcular el porcentaje de inhibición de cada una de las concentraciones del extracto de alcaloides de *P. dubia*, con estos datos se elaboró una curva

de inhibición a partir de la cual se obtuvo la ecuación de la recta usada para calcular el IC₅₀. (ANEXO F, ANEXO G), se obtuvieron los resultados que se indican en la tabla 8-3.

Tabla 8-3. Actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *P. dubia* expresada como IC₅₀.

	AChE^a IC₅₀ (µg/mL)	BuChE^a IC₅₀ (µg/mL)
<i>Phaedranassa dubia</i>	25,48 ± 0,39	114,96 ± 4,94
Galantamina ^b	0,303 ± 0,01	4,415 ± 0,24

^a Los valores son resultado de tres repeticiones, ^b Compuesto de referencia.

Realizado por: Alexandra Inca.2017

El extracto de alcaloides del bulbo de *Phaedranassa dubia* presentó una actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa expresada como IC₅₀ de 25,48 ± 0,39 µg/mL, no existen datos bibliográficos sobre el género *Phaedranassa* con los que se pueda comparar los resultados obtenidos.

Sin embargo, se han descrito varios estudios sobre este tipo de actividad de otras especies de la familia Amaryllidaceae como es el caso de Cortes et al., quienes analizaron las especies localizadas en Colombia *Crinum bulbispermum* (IC₅₀ 107,90 ± 9,98 µg/mL), *Hippeastrum barbatum* (IC₅₀ 28,13 ± 1,68 µg/mL) y *Zephyranthes carinata* (IC₅₀ 17,96 ± 1,22 µg/mL) (Cortes et al., 2015, p.43). A su vez Ortiz et al. determinó la actividad inhibitoria de AChE de las especies de Amaryllidaceae argentinas *Phycella herbertiana* (IC₅₀ 1,02 ± 0,12 µg/mL), *Habranthus jamesonii* (IC₅₀ 2,00 ± 0,11 µg/mL) y *Zephyranthes filifolia* (IC₅₀ 1,0 ± 0,08 µg/mL) (Ortiz et al., 2012). Respecto a los ejemplos mostrados el extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia* (IC₅₀ 25,48 ± 0,39 µg/mL) presenta una actividad inhibitoria significativa.

Por otro lado, la actividad inhibitoria sobre butirilcolinesterasa presentó un valor de IC₅₀ de 114,96 ± 4,94 µg/mL, a pesar de que ha sido comprobado que la BuChE tiene la capacidad de sustituir temporalmente la AChE inhibida y así hidrolizar la acetilcolina acumulada (Gabriel et al., 2017, p.3), la investigación de extractos y alcaloides puros aún está tomando fuerza, y en la literatura existe información limitada sobre esta actividad (Walsh et al., 2011, p.1231) y ningún dato referente a la especie *P. dubia*.

Dentro de los limitados estudios de actividad inhibitoria de BuChE realizados tenemos el caso de Cahlíková et al. que estudiaron las especies *Nerine filamentosa* (IC_{50} $13,0 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$), *Narcissus poeticus* (IC_{50} $23,0 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$) y *Sternbergia lutea* (IC_{50} $3,7 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$) (Cahlíková et al., 2012, p.573). Estos estudios muestran la existencia de especies de la familia Amaryllidaceae con una afinidad hacia BuChE ampliamente mayor a la especie estudiada en el presente trabajo de investigación.

La actividad inhibitoria presentada por el extracto de alcaloides del bulbo de *Phaedranassa dubia* se asocia a la existencia de galantamina y alcaloides del tipo licorina (Elgorashi et al., 2004, p.261) en esta especie, como se evidenció en la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

Es conocido que los alcaloides de la familia Amaryllidaceae inhiben la BuChE en menor medida que la AChE (Ortiz et al. 2016), lo que explica la diferencia de valores de IC_{50} producida por *P. dubia* para ambas colinesterasas, siendo mayor la inhibición de AChE.

La galantamina usada como compuesto de referencia presentó un valor de IC_{50} para acetilcolinesterasa de $0,30 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$, valor similar a lo reportado en bibliografía (Ortiz et al., 2012, p.17). Mientras que para butirilcolinesterasa el IC_{50} obtenido fue $4,41 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$ valor cercano al reportado por Cahlíková et al. (2012). Al comparar estos resultados con el extracto de alcaloides de *P. dubia* es notable la mayor actividad inhibitoria del compuesto de referencia, corroborando así la afinidad química de este alcaloide en forma pura hacia las colinesterasas (Cortes et al., 2015, p.13).

Phaedranassa dubia en su bulbo contiene licorina en un 54,10%, los compuestos de este tipo son inhibidores menos activos que el alcaloide galantamina (López et al., 2002) lo que justifica la mayor actividad inhibitoria del compuesto de referencia.

Si relacionamos el IC_{50} de galantamina frente AChE ($0,30 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) con el de este alcaloide frente BuChE ($4,41 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$) notamos que el primero muestra mayor actividad inhibitoria, esto se debe a que la afinidad de galantamina sobre AChE es 50 veces superior a la que tiene sobre BuChE (Salazar et al., 2012, p.269).

CONCLUSIONES

- Se obtuvo un rendimiento de alcaloides del 0,2 % a partir del bulbo seco y triturado de *Phaedranassa dubia*, aplicando un protocolo de cambios de pH y uso de solventes orgánicos como método de extracción.
- Se identificaron mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas un total de 9 alcaloides en el bulbo de *Phaedranassa dubia*, encontrándose en mayor porcentaje licorina (54,10 %) seguida por assoanina (13,77 %), galantamina (4,54 %) y anhidrolicorina (3,71 %).
- Se acondicionó el método modificado de Ellman et al. para la determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas de acuerdo a las características físicas, ambientales y de equipamiento del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Chimborazo; observando que factores como temperatura, proceso de preparación de reactivos, tiempos a emplear durante el ensayo, área de trabajo y equipos influyen en la variabilidad de los resultados.
- Se evaluó la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides del bulbo de *Phaedranassa dubia* expresada como IC₅₀ presentando los valores de 25,48 ± 0,39 µg/mL y 114,96 ± 4,94 µg/mL, respectivamente. Siendo notable una mayor afinidad del extracto hacia AChE.
- El extracto de alcaloides de *P. dubia* denotó menor actividad inhibitoria hacia ambas colinesterasas con respecto al compuesto de referencia galantamina cuyos valores de IC₅₀ fueron de 0,30 ± 0,01 µg/mL y 4,41 ± 0,24 µg/mL para acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, respectivamente.

RECOMENDACIONES

- Para futuros trabajos realizar estudios fitoquímicos y farmacológicos más profundos de *Phaedranassa dubia* de Ecuador, ya que las investigaciones sobre esta especie son escasas.
- Desarrollar estudios mediante Resonancia Magnética Nuclear que permitan elucidar los alcaloides con relación masa-carga (m/z) 280, 264 y 285.
- Se recomienda realizar un estudio de Docking molecular para predecir las interacciones de unión y patrones de orientación de los alcaloides presentes en *Phaedranassa dubia* con el sitio activo de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA LEÓN, K. *Identificación de los alcaloides de Stenomesson aurantiacum (Kunth) Herb.* [en línea] (Tesis). (Maestría). Universitat de Barcelona, España. 2013. pp. 8. [Consulta: 12 Julio 2017]. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1541/1/T-SENESCYT-00674.pdf>.

ALPÍZAR-QUESADA, C.L. y MORALES-ALPÍZAR, C. La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa. *Acta Médica Costarricense.* [en línea], 2003, (Costa Rica), vol 45(2), pp. 50-56. [Consulta: 9 julio 2017]. ISSN 0001-6002. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022003000200005.

ARRIAGADA, P. et al. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, vol. 42, (1992), pp. 631-639.

BARRANCO-QUINTANA, J. et al. Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol*, vol. 40, no. 10 (2005), pp. 613-618.

BASTIDA, J., LAVILLA, R. y VILADOMAT, F. Chemical and Biological Aspects of Narcissus Alkaloids. *Alkaloids: Chemistry and Biology*, vol. 63, no. 6, (2006), pp. 87-179.

BASTIDA, J., VILADOMAT, M. y LLABRES, J. Narcissus nivalis: a new source of galanthamine. *Planta Med*, vol. 56, (1990), pp. 123-4.

BASTIDA, J. et al. Chemical and Biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, vol.65, (2011), pp. 67.

BERGOÑON, S. Aislamiento y caracterización química de alcaloides del tipo Amaryllidaceae .Producción de galantamina por cultivos "in vitro" de *Narcissus confusus*. [En línea] (tesis). Universidad de Barcelona, Farmacia, España. 1994. pp. 290 [Consulta: 14 Agosto 2017]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=90797>

CABALLERO, A. Aplicaciones derivadas de la fotoquímica de O - aciloximas. [En línea] (tesis) (Doctoral). Universidad de la Rioja, España. 2012. pp.128-129 [Consulta: 23 Agosto 2017]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=40347>

CAHLÍKOVÁ, et al. Alkaloids from Some Amaryllidaceae Species and Their Cholinesterase Activity. *Natural Product Communications* [En línea], 2012, (Czech Republic) vol. 7(5), pp.571-574. [Consulta: 27 septiembre 2017]. ISSN 1934578X. Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84861493826&partnerID=tZOtx3y1>

CASTELLANOS-CASTILLO, F.A. Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura - actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano. *Anales de Veterinaria de Murcia* [en línea] , 2014. pp. 92. [Consulta: 13 Agosto 2017] Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/39404/>.

CORTES, N. et al. Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [en línea], 2015 (Colombia). vol. 102, pp. 222-228. [Consulta: 17 Agosto 2017] ISSN 1873264X. DOI 10.1016/j.jpba.2014.09.022. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.022>.

CORTES, N. et al. Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. *Life Sciences*. vol 42, no. 50. (2015) (Colombia). pp. 43

CYTED. *La biodiversidad iberoamericana como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible (BIFRENES)*. [En línea]. 2016 [Consulta: 3 junio 2017]. Disponible en: http://www.cytcd.org/?q=es/detalle_proyecto&un=909

DAVIES, P. y MALONEY, A.J.F. Selective Loss of Central Cholinergic Neurons in Alzheimer'S Disease. *The Lancet*, vol. 308, no. 8000, (1976) pp. 1403. ISSN 01406736. DOI 10.1016/S0140-6736(76)91936-X.

DELACOURTE, A. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. *EMC - Tratado de Medicina* [en línea], 2002. vol. 6(4), pp. 1-11. [Consulta: 18 Agosto 2017] ISSN 16365410. DOI 10.1016/S1636-5410(02)70234-1. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1636541002702341>.

ECUADOR. ASAMBLEA NACIONAL. *En Ecuador más de 100 mil personas sufren de alzheimer y otras demencias* [en línea]. 2014. [Consulta: 3 junio 2017]. Disponible en: <http://www.asambleanacional.gob.ec/es/noticia/en-ecuador-mas-de-100-mil-personas-sufren-de-alzheimer-y>.

ECUADOR. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. *Prioridades de investigación en salud, 2013-2017.* [en línea], 2013 [Consulta: 3 junio 2017]. Disponible en: [https://www.ucuenca.edu.ec/images/facu_medicina/Investigacion/PRIORIDADES_INVESTIGACION_SALUD2013-2017\(1\).pdf](https://www.ucuenca.edu.ec/images/facu_medicina/Investigacion/PRIORIDADES_INVESTIGACION_SALUD2013-2017(1).pdf).

ELGORASHI, E.E., STAFFORD, G.I. y VAN STADEN, J. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, vol. 70, no. 3, (2004), pp. 260-262. ISSN 00320943. DOI 10.1055/s-2004-818919.

ELLMAN, G. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* [En línea], 1961, (United State of America) vol. 7(2). pp. 88-95. [Consulta: 13 febrero 2017]. ISSN 00062952. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>.

FERNÁNDEZ-VIADERO, C., RODRÍGUEZ, E. y COMBARROS, O. Genética y enfermedad de Alzheimer: población en riesgo. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, vol. 48, no. 1, (2013). pp. 39-44.

FLEURENCE, J. et al. Espectrometría de Masas. *Trends Food Sci Tech.* [en línea], 1999, vol. 10, pp. 25-28. [Consulta: 12 Agosto 2017] Disponible en: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf.

FLORES, M. y SEGURA, J. Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Medigraphic Artemisa*, vol. 6, no. 4 (2005). pp. 315-326.

GABRIEL, A.J. et al. Association between butyrylcholinesterase and cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease patients. *Neuroscience Letters*, vol. 641 (2017). pp. 101-106. ISSN 18727972. DOI 10.1016/j.neulet.2017.01.036.

GANDÍA, L. et al. Anticolinesterásicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. *REV NEUROL* [en línea], 2006 vol. 42(8), pp. 471-477. [Consulta: 20 Agosto 2017] ISSN 0210-0010. Disponible en: <http://www.revneurolog.com/VeureResum.asp?i=e&aof=80198075507726653755&Par1=ind.asp&Par2=42&Par3=08>.

GARCÍA, A.G. y GANDÍA, L. *Fronteras en la Enfermedad de Alzheimer* [en línea]. Madrid España: Universidad Autónoma de Madrid, 2002. [Consulta: 13 junio 2017]. Disponible en: http://www.farmaindustria.es/idc/groups/public/documents/publicaciones/farma_1049.pdf.

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

GUTIÉRREZ, M.C. y DROGUET, M., 2002. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial*, no. 122, (2002). pp. 35-41. ISSN 11316756.

- HAAS, C.** Molecular Biology of Alzheimer's disease. *Newark, NJ: Gordon & Breach*, (1999).
- HAGER, K. et al.** Effects of galantamine in a 2-year, randomized, placebo-controlled study in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*, vol 10, (2014). pp.391-401.
- HUAN, U. et al.** Identification of a neuroprotective and selective butyrylcholinesterase inhibitor derived from the natural alkaloid evodiamine. *European Journal of Medicinal Chemistry* [en línea], 2014, vol. 81, pp. 15-21. [Consulta:18 de Julio 2017]. ISSN 17683254.. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmec h.2014.05.002>.
- KONRATH, E.L. et al.** Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 65, no. 12, (2013). pp. 1701-1725. ISSN 00223573. DOI 10.1111/jphp.12090.
- LABORATORIO DE SISTEMÁTICA DE PLANTAS VASCULARES.** *Amaryllidaceae*. [en línea], 2013. [Consulta: 5 junio 2017]. Disponible en: http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/amaryllidaceae_amaryllidoideae.html.
- LEÓN, S., PITMAN, N., ENDARA, L. y ULLOA, C.** *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Segunda ed. Quito: Herbario QCA Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2011.
- LI, Y. et al.** Aurone Mannich base derivatives as promising multifunctional agents with acetylcholinesterase inhibition, anti- β amyloid aggregation and neuroprotective properties for the treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 126 (2017), pp. 762-775. ISSN 17683254. DOI 10.1016/j.ejmech.2016.12.009.
- LIKHITWITAYAWUID, K. et al.** Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *J Nat Prod*, vol. 56 (1993), pp. 1331-1338.

- LÓPEZ, S. et al.** Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life Sciences*, vol. 71, no. 21 (2002), pp. 2521-2529. ISSN 00243205. DOI 10.1016/S0024-3205(02)02034-9.
- MEEROW, A. W.** Amaryllidaceae. *Flora of Ecuador*, 1990, vol. 41 University of Gotenborg; Riksmuseum, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Goteborg, Stockholm, Quito.
- MEEROW, A.W., JOST, L., OLEAS, N.** Two new species of endemic Ecuadorean Amaryllidaceae (Asparagales, Amaryllidaceae, Amarylloideae, Eucharideae). *PhytoKeys*, vol.48, no.1, (2015), pp.1-9
- MINGA, D., ULLOA, C., VERDUGO, A.** A new species of *Phaedranassa* (Amaryllidaceae) from Ecuador. *Phytotaxa*, vol.192, no.1, (2015), pp.50-53. ISSN 1179-3155
- MCNULTY, J. et al.** Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: A potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. *Phytochemistry* [en línea], 2009, vol. 70(7), pp. 913-919. [Consulta: 29 julio 2017] ISSN 00319422. DOI 10.1016/j.phytochem.2009.04.012. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.04.012>.
- OLEAS, N.** Landscape Genetics of *Phaedranassa* Herb (Amaryllidaceae) in Ecuador. [en línea]. (tesis).(Maestría). *FIU Electronic Theses and Dissertations*. 2011. p.79. [Consulta el 01 Julio 2017]. Disponible en: <http://digitalcommons.fiu.edu/etd/443>.
- OLEAS, N.** Amaryllidaceae. In: León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara L., Ulloa Ulloa, C. & Navarrete, H. (Eds.) Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador, 2da. Edición. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, pp.87-90, 2011.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** *Demencia*. [en línea], 2017. [Consulta: 3 junio 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>.

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

ORTIZ, J.E. et al. Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and Their Cholinesterase-Inhibitory Activities: An in Vitro and in Silico Study. *Journal of Natural Products*, vol. 79, no. 5 (2016), pp. 1241-1248. ISSN 15206025. DOI 10.1021/acs.jnatprod.5b00785.

PLANTAS NATIVAS DE LA HOYA DE QUITO. *Phaedranassa dubia*. [en línea]. 2002. [Consulta: 6 junio 2017]. Disponible en: <http://plantasnativas.visitavirtualjbq.com/index.php/epoca/xix-humboldt-bonpland/22-phaedranassa-dubia>.

POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers*, vol. 155, no. 3 (2011), pp. 219-230. ISSN 12138118. DOI 10.5507/bp.2011.036.

RODRÍGUEZ, L. No Epidemiology of dementia and Alzheimer's diseases. *Ann Psychiatr Basic Clin Neurosci*, vol. 7 (1997), pp. 2.7.

ROMANO, M.F. et al. *Enfermedad de alzheimer. Enfermería Integral* [en línea], 2007, vol. 175, pp. 9-12. [Consulta: 29 Junio 2017]. Disponible en: <http://w.enfervalencia.org/ei/75/articulos-cientificos/1.pdf>.

SALAZAR VALLEJO, M. et al. *Tratado de psicofarmacología : bases y aplicación clínica*. S.l.: Editorial Médica Panamericana, 2012.

SÁNCHEZ, D. et al. 2015. Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. [en línea], 2015, vol. 11(72), pp. 4316-4322. [Consulta: 02 Agosto 2017]. ISSN 0304-5412. DOI 10.1016/j.med.2015.01.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.med.2015.01.003>.

SANCHEZ, G. y SALCEDA, R. Enzimas Polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *Reb*, vol. 27, no. 2 (2008), pp. 44-51.

SCHLIEBS, R. y ARENDT, T. "The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease". *J Neural Transm*, vol. 113, n° 11 (2006), (Germany) pp. 1625-1644.

TECLES, F., SUBIELA, S.M. y CERÓN, J.J. Influencia De Diversas Condiciones Analíticas En La Determinación De Colinesterasa En Sangre Entera Mediante el método de Ellman. *Anales de Veterinaria de Murcia*, vol. 80 (2001), pp. 67-79.

TORRAS-CLAVERIA, L. et al. Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Industrial Crops and Products* [en línea], 2013, vol. 43(1), pp. 237-244. [Consulta: 14 Agosto 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.034>.

VÁSQUEZ, L. y OSORIO, J. Variación de la Actividad de la Enzima Butirilcolinesterasa en Usuarias de Anticonceptivos Hormonales. *Anales de la Facultad de Medicina UNMSM*, vol. 61, no. 4 (2000), pp. 271-277.

VIDAL, C. Colinesterasas séricas, 1981, pp. 233-254.

VINUEZA RIVERA, A.G. Tamizaje fitoquímico e identificación de alcaloide de *Phaedranassa schizanta* Baker. (tesis). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador. 2014. pp.2

WALSH, R et al. Synergistic inhibition of butyrylcholinesterase by galantamine and citalopram. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [en línea], 2011, vol. 1810 (12), pp. 1230-1235. [Consulta: 12 septiembre 2017]. DOI 10.1016/j.bbagen.2011.08.010. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416511002078>.

WIESNER, J. et al. Acetylcholinesterases the structural similarities and differences. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [en línea], 2007, vol. 22(4), pp. 417-424. [Consulta: 30 Julio 2017]. ISSN 1475-6366. DOI 10.1080/14756360701421294. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14756360701421294>.

WILHELMSSEN, K.C. The tangled biology of tau. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 96 (1999) pp. 7120-7121.

WILKINSON, D.G. et al. Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs & aging* [en línea], 2004, vol. 21(7), pp. 453-78. [Consulta: 19 julio 2017]. ISSN 1170-229X. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15132713>.

ANEXOS

ANEXO A. Bulbo de *Phaedranassa dubia* seco y triturado.



FOTOGRAFÍA 1A. Bulbo de *P. dubia* seco y triturado.

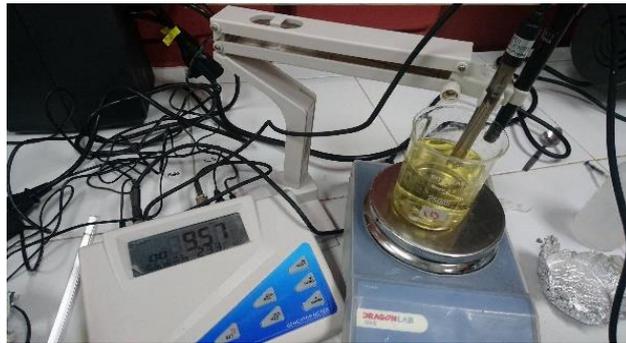
ANEXO B. Obtención del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia*. Maceración del material vegetal en metanol (FOTOGRAFÍA 1B), evaporación del solvente en rotavapor (FOTOGRAFÍA 2B), acidificación del extracto bruto seco (FOTOGRAFÍA 3B), desengrasado el extracto bruto ácido (FOTOGRAFÍA 4B), extracción con acetato de etilo (FOTOGRAFÍA 5B).



FOTOGRAFÍA 1B. Maceración del material vegetal en metanol.



FOTOGRAFÍA 2B. Evaporación del solvente en rotavapor.



FOTOGRAFÍA 3B. Acidificación del extracto bruto seco.



FOTOGRAFÍA 4B. Desengrasado del extracto bruto ácido.



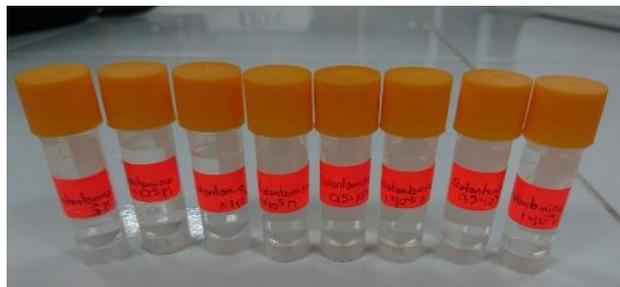
FOTOGRAFÍA 5B. Extracción de alcaloides con acetato de etilo.

ANEXO C. Extracto de Alcaloides del bulbo de *Phaedranassa dubia*.



FOTOGRAFÍA 1C. Extracto de alcaloides.

ANEXO D. Soluciones de galantamina (FOTOGRAFÍA 1D) y muestras de alcaloides (FOTOGRAFÍA 2D) empleados en el ensayo de actividad inhibitoria.



FOTOGRAFÍA 1D. Soluciones de galantamina empleadas.



FOTOGRAFÍA 2D. Muestras de alcaloides empleadas en el ensayo.

ANEXO E. Cabina de Flujo Laminar (FOTOGRAFÍA 1E), y espectrofotómetro ELISA empleados en el ensayo (FOTOGRAFÍA 2E).



FOTOGRAFÍA 1E. Cabina de Flujo laminar



FOTOGRAFÍA 2E. Espectrofotómetro ELISA.

ANEXO F. Curva de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) para obtención de IC₅₀ del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia* realizada por triplicado en microplacas individuales. (GRÁFICO 1F, GRÁFICO 2F, GRÁFICO 3F).

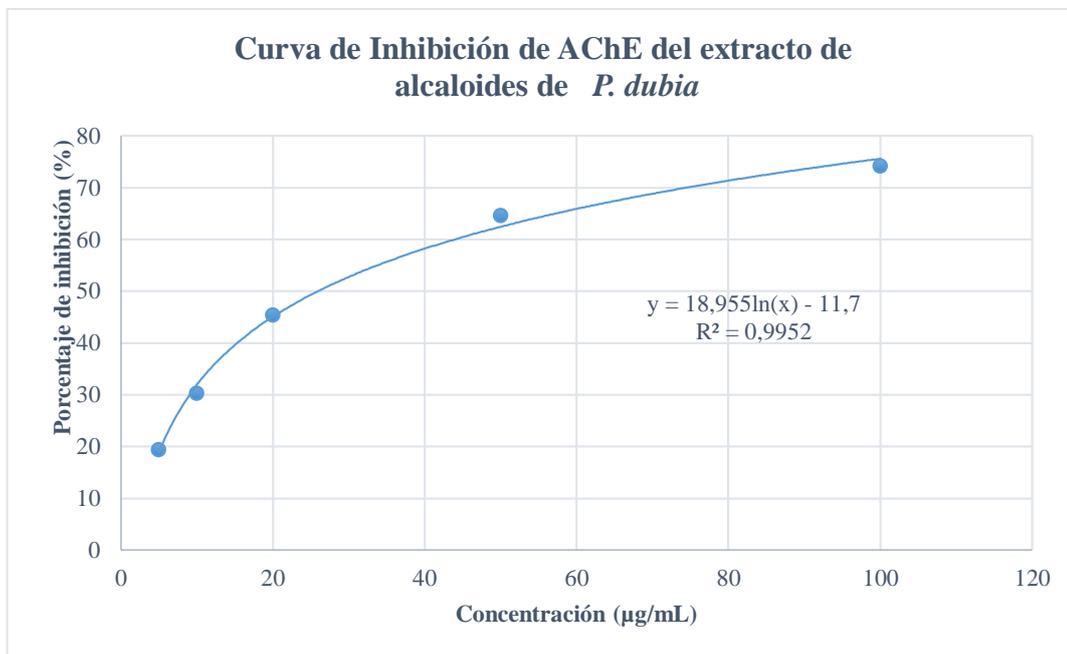


GRÁFICO 1F. Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa del extracto de alcaloides. Primera repetición.

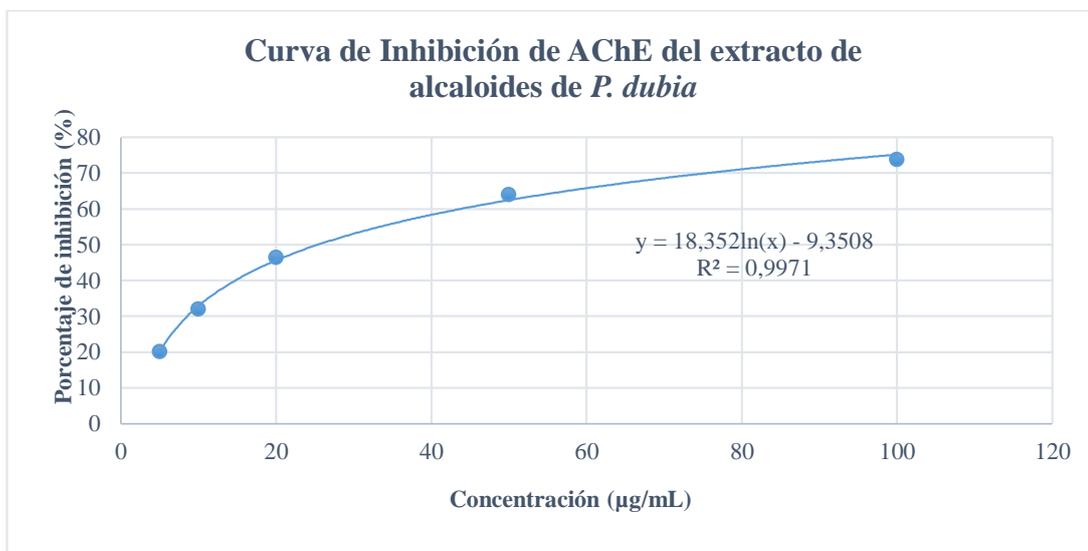


GRÁFICO 2F. Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa del extracto de alcaloides. Segunda repetición.

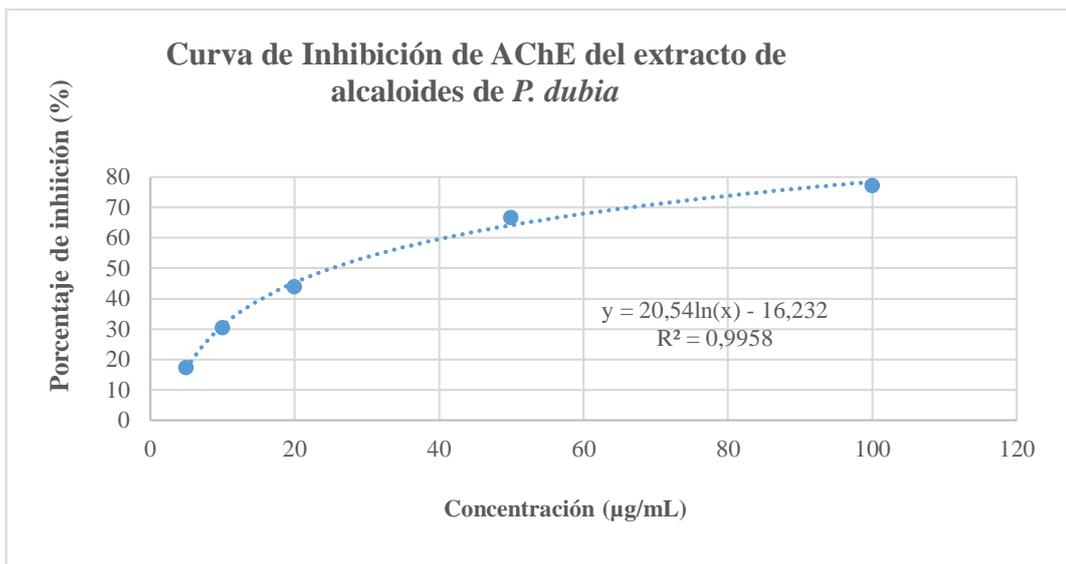


GRÁFICO 3F. Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa del extracto de alcaloides. Tercera repetición.

ANÉXO G. Curva de inhibición de butirilcolinesterasa (BuChE) para obtención de IC_{50} del extracto de alcaloides de *Phaedranassa dubia* realizada por triplicado en microplacas individuales. (GRÁFICO 1H, GRÁFICO 2H, GRÁFICO 3H)

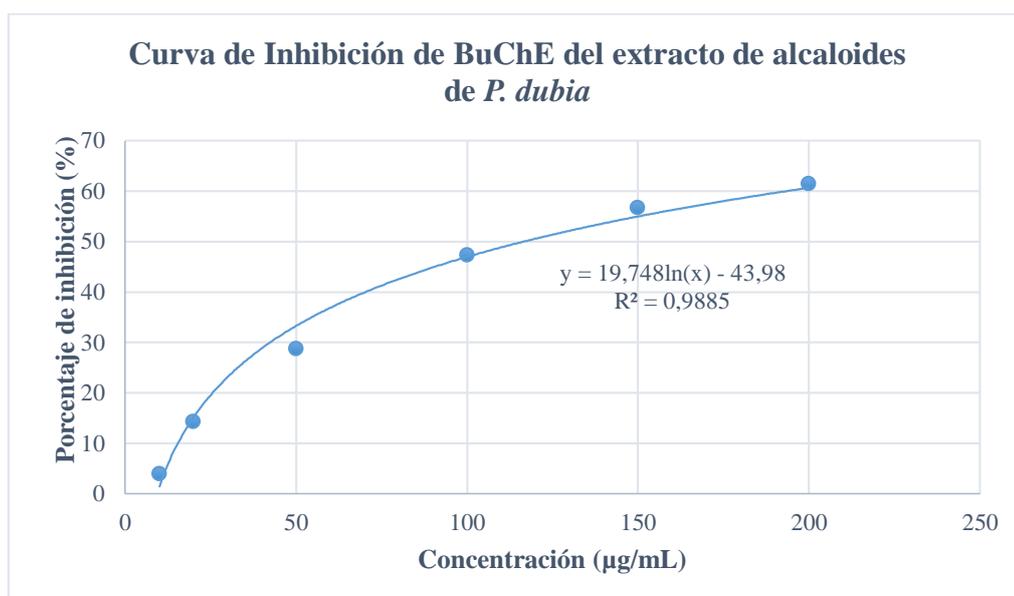


GRÁFICO 1H. Ensayo de inhibición de butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides. Primera repetición.

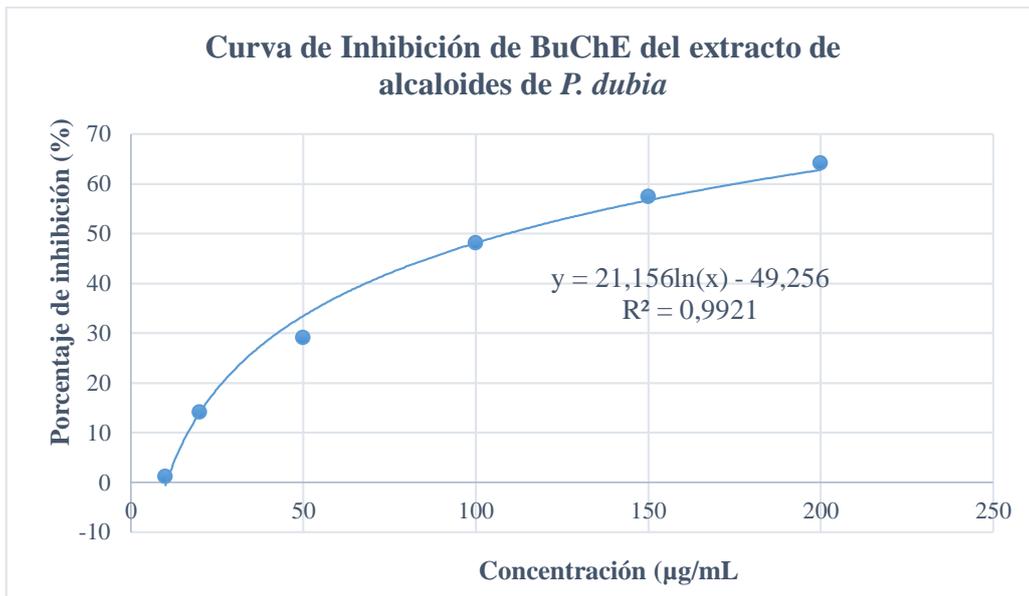


GRÁFICO 2H. Ensayo de inhibición de butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides.
Segunda repetición

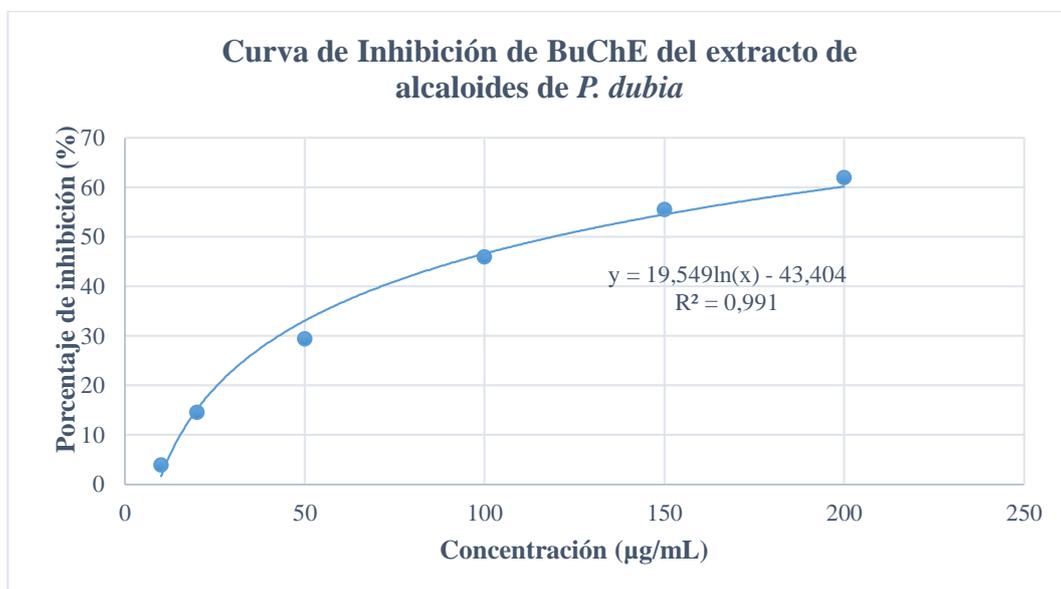


GRÁFICO 3H. Ensayo de inhibición de butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides.
Tercera repetición.