



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

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA
FRACCIÓN ALCALOIDAL DE *Phaedranassa cuencana*, SOBRE LAS
ENZIMAS ACETILCOLINESTERASA Y
BUTIRILCOLINESTERASA.”**

TRABAJO DE TITULACIÓN:
TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar por el grado académico de:
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: TATIANA KATHERINE JARAMILLO DÍAZ

TUTORA: Lcda. KAREN ACOSTA LEÓN, M.Sc.

Riobamba – Ecuador

2019

© 2019, Tatiana Katherine Jaramillo Díaz

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 LA FRACCIÓN ALCALOIDAL DE *Phaedranassa cuencana*, SOBRE LAS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA.”, de responsabilidad de la señorita Tatiana Katherine Jaramillo Díaz, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Lcda. Karen Acosta León., M.Sc.
**DIRECTORA DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF. Diego Vinueza Tapia., M.Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Tatiana Katherine Jaramillo Díaz, 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 otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

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

TATIANA KATHERINE JARAMILLO DÍAZ

Cédula de Identidad: 060386885-2

DERECHOS DE RESPONSABILIDAD

Yo, Tatiana Katherine Jaramillo Díaz, soy responsable del actual trabajo de grado que presento, el mismo que 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.

TATIANA KATHERINE JARAMILLO DÍAZ
Cédula de Identidad: 060386885-2

DEDICATORIA

Este Trabajo de titulación quiero dedicarlo a mis padres Vinicio Jaramillo Ricaurte y Yolanda Díaz Betancourt, porque este logro es más de ellos que mío, por ser siempre incondicionales, por entregarme amor a raudales, por ser mi ejemplo, por sus consejos, tiempo, ánimo y apoyo que me proporcionaron durante toda mi vida.

A mi hermana María Isabel por la ayuda, la preocupación y toda la paciencia.

A mi tío Andrés por siempre estar pendiente y sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles, por ser más que un tío, un hermano y un amigo.

A mis abuelitos Segundo Díaz y Olga Betancourt por ser mi ejemplo de lucha en la vida y ser quienes me impulsaron para llegar siempre más lejos.

A mis amigos por todas las aventuras y locuras vividas.

TATIANA.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a Dios y a la Virgen Dolorosa por ser mi fortaleza y mi guía para superar los obstáculos que se me presentaron para alcanzar mis sueños.

A mis padres por siempre tener una palabra de aliento en los momentos difíciles, por darme un abrazo cuando más lo necesitaba, por el apoyo incondicional y por la confianza que me brindan siempre.

A mi hermana por motivarme para alcanzar este logro, por escucharme y nunca abandonarme.

A mi tío Andrés y abuelita Olguita por el inmenso amor, los consejos y además por siempre estar en los buenos y los malos momentos.

A mi mejor amiga, Estefanía, por acompañarme, escucharme y estar conmigo siempre, en las buenas y en las malas.

Agradezco inmensamente a la Lcda. Karen Acosta M.Sc. por el tiempo, conocimientos y ayuda que me ha brindado siempre, además por estar dispuesta a apoyarnos, pero sobre todo por su amistad.

Un reconocimiento imperecedero hacia la Dra. Nora Oleas parte del grupo de investigación de la Universidad Tecnológica Indoamérica, y al catedrático del Grupo de investigación de la Universitat de Barcelona (España) Dr. Jaume Bastidas A., por su contribución durante la realización de este proyecto.

Tatiana.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

EA	Enfermedad de Alzheimer
AChE	Acetilcolinesterasa
BuChE	Butirilcolinesterasa
CYTED	Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
OMS	Organización Mundial de la Salud
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
ACh	Acetilcolina
AChEI	Inhibidor de acetilcolinesterasa
ATC	Yoduro de acetiltiocolina
BTC	Yoduro de butiriltiocolina
DTNB	5,5'-Ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)
PBS	Buffer fosfato salino
APP	Proteína Precursora Amiloidea
ApoE4	Apolipoproteína E4
PS1	Presenilina-1
PS2	Presenilina-2
SORL1	Receptor 1 relacionado con sortilina
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	xv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	4
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	4
1.1. Amaryllidaceae	4
1.1.1. Generalidades	4
1.1.1. Alcaloides presentes en Amaryllidaceae	5
1.1.2. Amaryllidaceae en Ecuador	6
1.1.3. Phaedranassa cuencana	6
1.2. Demencia	8
1.2.1. Enfermedad de Alzheimer y su historia	8
1.2.2. Hipótesis colinérgica	9
1.2.2.1. Acetilcolinesterasa	10
1.2.2.2. Butirilcolinesterasa	10
1.2.3. Hipótesis amiloidea	10
1.2.4. Hipótesis de proteínas tau	11
1.2.5. Tipos de Alzheimer.	12
1.2.6. Fases del Alzheimer	12
1.2.7. Síntomas	12
1.2.8. Factores de riesgo	13
1.2.9. Tipos tratamiento	13
1.2.9.1 Tratamiento farmacológico	13
1.2.9.2. Inhibidores de la acetilcolinesterasa.	13
1.2.9.3. Galantamina	14
1.2.10. Tratamiento no farmacológico	14
1.3.1. Cromatografía de gases	15
1.3.2. Espectrometría de masas	15
1.4. Método Ellman	16
CAPÍTULO II	17
2. METODOLOGÍA	17

2.1. Diseño de Estudio.....	17
2.1.1. Unidad de análisis.	17
2.1.2. Población a Estudiar.....	17
2.1.3. Cantidad de Muestra.....	17
2.2 Lugar de recolección del material vegetal	17
2.2.1 Selección de Muestra.....	17
2.3. Área de investigación	18
2.4. Determinación de la identidad del material vegetal	18
2.5. Materiales, equipos y reactivos	18
2.5.1. Material vegetal.....	18
2.5.2. Equipos.....	19
2.5.3 Materiales y Reactivos	19
2.6. Procesos y métodos	21
2.6.1. Acondicionamiento del material vegetal	21
2.6.2. Extracción de alcaloides	21
2.6.3. Separación e Identificación de alcaloides mediante (CG-EM)	22
2.7. Preparación de soluciones	23
2.7.1. Reactivos	23
2.7.2. Preparación de sustrato	25
2.7.3 Preparación de enzimas	25
2.8. Diluciones de galantamina	25
2.9. Diluciones de extracto de alcaloides de <i>Phaedranassa cuencana</i>	26
2.10. Ensayos de inhibición enzimática de colinesterasas	26
2.10.1 Cálculo de resultados.....	27
CAPÍTULO III.....	28
3.2 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas	28
3.3 Actividad inhibitoria de <i>Phaedranassa cuencana</i> sobre AChE.....	31
3.3.1. Primer screening de inhibición de <i>Phaedranassa cuencana</i> sobre AChE	31
3.3.2. Segundo screening de inhibición de <i>Phaedranassa cuencana</i> sobre AChE.	32
3.3.3 Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Phaedranassa cuencana</i> sobre AChE	33
3.4.1 Primer screening de inhibición de <i>Phaedranassa cuencana</i> sobre BuChE.....	34
3.4.2. Segundo screening de inhibición de <i>Phaedranassa cuencana</i> sobre BuChE.....	34
3.4.3. Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Phaedranassa cuencana</i> sobre BuChE	35
CONCLUSIONES	
RECOMENDACIONES	

BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1-1.** Factores de riesgo de la Enfermedad del Alzheimer.
- Tabla 1-2** Equipos utilizados en la investigación
- Tabla 2-2.** Materiales y Reactivos usados en las diferentes etapas de investigación
- Tabla 3-2.** Reactivos para alcanzar pH de PBS y solución salina.
- Tabla 4-2.** Reactivos ocupados en el PBS.
- Tabla 5-2.** Diluciones de galantamina.
- Tabla 6-2.** Concentraciones de *Phaedranassa cuencana* usadas en el ensayo de inhibición de colinesterasas.
- Tabla 1-3.** Resultados de la preparación del extracto de *Phaedranassa cuencana*.
- Tabla 2-3.** Alcaloides reconocidos en el extracto purificado del bulbo de *Phaedranassa cuencana*, a través de CG-EM.
- Tabla 3-3.** Actividades biológicas de alcaloides representativos de *Phaedranassa cuencana*.
- Tabla 4-3.** Resultados del primer screening de inhibición de *P. cuencana* sobre AChE.
- Tabla 5-3.** Resultados del segundo screening de inhibición de *P. cuencana* sobre AChE.
- Tabla 6-3:** Inhibición del extracto alcaloidal de *P. cuencana* sobre AChE.
- Tabla 7-3.** Resultados del primer screening de inhibición de *P. cuencana* sobre BuChE.
- Tabla 8-3.** Resultados del segundo screening de inhibición de *P. cuencana* sobre BuChE.
- Tabla 9-3.** Inhibición del extracto alcaloidal de *P. cuencana* sobre BuChE.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1-1.** Geodistribución de la familia Amaryllidaceae.
- Figura 2-1.** Clasificación de los alcaloides presentes en Amaryllidaceae.
- Figura 3-1.** *Phaedranassa cuencana*. **A.** Inflorescencia. **B.** Hábit vegetal. **C.** Flor abierta mostrando estambres. **D.** Hoja, lado adaxial **E.** Hoja, lado abaxial y bulbo
- Figura 4-1.** Geodistribución de *Phaedranassa cuencana*.
- Figura 5-1.** Hipótesis colinérgica
- Figura 6-1.** Representación de sitios de acción de acetilcolinesterasa
- Figura 7-1.** Neuronas en un cerebro sano y neuronas en un cerebro con EA- Hipótesis amiloidea
- Figura 8-1.** Neuronas en un cerebro sano y neuronas en un cerebro con EA- Hipótesis tau
- Figura 9-1.** Estructura de la galantamina.
- Figura 10-1.** Reacción esquemática del método de Ellman
- Figura 2-1.** Esquema para la obtención del extracto de alcaloides de *Phaedranassa cuencana*.
- Figura 1-3.** Porcentaje total de alcaloides de *P. cuencana*, obtenido mediante CG-EM.
- Figura 2-3:** Estructuras de los principales alcaloides presentes en el extracto alcaloidal de *Phaedranassa cuencana*.

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A.- Recolección de *P. cuencana*.

ANEXO B.- Preparación del extracto crudo a partir de bulbos de *P. cuencana*.

ANEXO C.- Extracción de alcaloides de *P. cuencana*.

ANEXO D.- Obtención del extracto puro de alcaloides de *P. cuencana*

ANEXO E.- Prueba de inhibición de colinesterasas.

ANEXO F.- Curvas de inhibición de AChE de *P. cuencana*; derivadas para el cálculo del IC50. Se asocian los % de inhibición de AChE vs. concentración del extracto alcaloidal (GFA, GFB, GFC)

ANEXO G.- Curvas de inhibición de BuChE de *P. cuencana*; derivadas para el cálculo del IC50. Se asocian los % de inhibición de BuChE vs. concentración del extracto alcaloidal (GGA, GGB, GGC)

ANEXO H.- Orden de movilización de vida silvestre de *P. cuencana*.

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo determinar la actividad inhibitoria sobre las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), por parte de la fracción alcaloidal de *Phaedranassa cuencana* (Amaryllidaceae). Se obtuvo el extracto alcaloidal del bulbo seco de *P. cuencana* a partir de una maceración con metanol, y el posterior uso de solventes orgánicos (éter etílico y acetato de etilo), además de cambios de pH, alcanzando un rendimiento de 0,137%. Posteriormente, los alcaloides se separaron e identificaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). La CG-EM mostró un total de 7 alcaloides identificados, entre ellos licorina con 56,68%, seguido de galantamina 18,90% y sanguinina 7,25%. Y en menor abundancia alcaloides de tipo licorina y galantamina. La actividad inhibitoria de AChE y BuChE se evaluó a través del método Ellman et al. con modificaciones, utilizando como compuesto de referencia al alcaloide galantamina. Se determinó la inhibición enzimática de *P. cuencana*, presentando valores $IC_{50} = 1,12 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, para AChE; resultado muy cercano al compuesto de referencia galantamina, el cual presenta un $IC_{50} = 0,3 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$. Por otro lugar, la inhibición que presentó para BuChE, fue $IC_{50} = 21,53 \pm 1,64 \mu\text{g/mL}$, observando que presenta menor actividad que la galantamina, $IC_{50} = 5,00 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$. Se pudo notar con estos resultados que, si bien su actividad inhibitoria es menor al compuesto de referencia, muestra una alta actividad inhibitoria tanto de acetilcolinesterasa como de butirilcolinesterasa. *P. cuencana*, según los resultados que se exponen, se considera una especie vegetal con alto potencial para el tratamiento de la de la enfermedad de Alzheimer; por ello, se recomienda estudios tanto fitoquímicos, farmacológicos como toxicológicos de la misma.

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

SUMMARY

The objective of this research was to determine the inhibitory activity on the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE), by the alkaloidal fraction of *Phaedranassa cuencana* (Amaryllidaceae). The alkaloidal extract of the dry bulb of *P. cuencana* was obtained from a maceration with methanol, and the subsequent use of organic solvents (ethyl ether and ethyl acetate), in addition to pH changes, reaching a yield of 0.137%. Subsequently, the alkaloids were separated and identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). GC-MS showed a total of 7 alkaloids, including lycorine with 56.68%, followed by galantamine 18.90%, and 7.25% sanguinine. And in smaller abundance lycorine and galantamine-type alkaloids. The inhibitory activity of AChE and BuChE was evaluated through Ellman's method with modifications using as the reference compound the alkaloid galantamine. Enzymatic inhibition of *P. cuencana* was determined presenting IC₅₀ values 1.12 ±0.05 µg/mL for AChE, result very close to the reference compound galantamine, which has an IC₅₀= 0.3 ±0.02 µg/mL. On the other hand, the inhibition that was presented for BuChE, was IC₅₀= 21.53 ±1.64 µg/mL, observing that it presents lower activity than galantamine IC₅₀= 5.00 ±0.36 µg/mL. It was known to note with the results that, although its inhibitory activity is lower than the reference compound, it shows a high inhibitory activity of both acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *P. cuencana* according to the results are exposed, is considered a plant species with high potential for the treatment of Alzheimer's disease, therefore it is recommended phytochemical, pharmacological, and toxicological studies of it.

Key words: <BIOCHEMISTRY>, <PHYTOCHEMISTRY>, <EXTRACT OF ALKALOIDS>, <BULB (*Phaedranassa cuencana*)>, <AMARYLLIDACEAE>, <CHOLINESTERASES>, <INHIBITORY ACTIVITY>, <ALZHEIMER'S DISEASE>.

INTRODUCCIÓN

El Alzheimer, es una enfermedad neurodegenerativa, crónica y progresiva, que ocasiona problemas relacionados con la pérdida de memoria, intelecto, comportamiento, además de incapacidad de realizar actividades de la vida diaria (Fish et al. 2018)(Alzheimer's association 2012) (Organización Mundial de la Salud, 2017).

Si bien la EA, es una enfermedad que afecta de forma principal a los adultos mayores, la demencia no es efecto normal del envejecimiento. Según estadísticas, se dice que entre el 5 y el 8 % de la población de 60 años o más padece de esta enfermedad en un momento determinado (Organización Mundial de la Salud, 2017).

Según la OMS, el Alzheimer alrededor del mundo afecta a unos 50 millones de personas, de estos se considera que un 60% habitan en países ingresos bajos y medios. Las cifras son muy preocupantes, pues cada año se registran unos 10 millones de nuevos casos. (Organización Mundial de la Salud, 2017). En el Ecuador, se dice que entre 80 mil y 100 mil personas padecen de esta enfermedad (Asamblea Nacional de la República del Ecuador, 2014).

Actualmente, para el tratamiento farmacológico se usan fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa como el donepezilo, galantamina y rivastigmina (Zúñiga Santamaría et al. 2018).

La familia de las Amaryllidaceae, contiene cerca de 70 géneros y 1600 especies (Acosta 2014) y presenta en su perfil alcaloideo el compuesto galantamina. Éste es un alcaloide clave en la disminución del deterioro cognitivo, uno de los primeros síntomas en la Enfermedad del Alzheimer (Marcet, 2015).

La galantamina, además de presentar actividades biológicas muy interesantes, tiene la peculiaridad de inhibir la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa. Estas dos enzimas se encuentran normalmente en un cerebro sano, pero cuando existe la enfermedad del Alzheimer incrementan progresiva y considerablemente (Marcet, 2015). Por tanto, especies de la familia Amaryllidaceae pueden ayudar a disminuir el déficit colinérgico característico de esta enfermedad.

El Ecuador es un país con gran biodiversidad, cuenta con muchas especies que no han sido estudiadas aún y que podrían tener importantes actividades biomédicas, como *Phaedranassa cuencana*. Esta especie es parte de la familia de las *Amaryllidaceae* y podría tener en su perfil alcaloideo galantamina,

además de otros metabolitos que nos ayuden en la inhibición de colinesterasas y que puedan contribuir en el tratamiento del Alzheimer.

Esta investigación forma parte del proyecto “La Biodiversidad Iberoamericana como Fuente de Recursos Naturales para una Explotación Sostenible – BIFRENES” perteneciente al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Este proyecto se centra en la búsqueda de especies vegetales que pertenecen a las Amaryllidaceae, con el fin de encontrar un alto contenido de galantamina, la cual posee una actividad inhibitoria comprobada frente a las colinesterasas (Bastida, et al., s.f.) y, por lo tanto, es un fármaco utilizado en el tratamiento del Alzheimer.

El presente proyecto de investigación, se enfoca en buscar especies nativas del Ecuador que presenten un potencial farmacéutico contra la enfermedad del Alzheimer, y así poder utilizarlo para el beneficio de la población, mejorando la calidad de vida tanto del paciente como de los familiares y contribuir a la comunidad científica.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de *P. cuencana* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

Objetivos Específicos

- Extraer la fracción alcaloidal de *P. cuencana*, mediante una extracción basada en cambios de pH y uso de solventes orgánicos.
- Determinar la concentración de inhibición media de *P. cuencana*, sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, a través del método modificado de Ellman et al.
- Separar e identificar los alcaloides que se encuentren en *P. cuencana*, utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Amaryllidaceae

1.1.1. Generalidades

Las Amaryllidaceae son una familia de hierbas perennes y monocotiledóneas. (Cedrón, et al., 2010)

Sus flores son muy vistosas, pueden ser de color blancas, rojas, verdes o amarillas, por lo general no tienen olor y comúnmente se fusionan en la parte baja tomando la forma de un tubo ya sea largo o corto (Merrow; Snijman 1998) (Departamento de Ecología y Ciencias Ambientales- UDELAR, 2017).

Se encuentra distribuida en zonas tropicales y subtropicales como: Suramérica, África y en la región mediterránea de Europa.

La familia Amaryllidaceae tiene alrededor de 70 géneros y 1600 especies (Acosta 2014), entre las más destacadas se encuentra: *Pancratium*, *Zephyranthes*, *Narcissus*, *Phaedranassa*, *Hymenocallis*, *Crinum*, entre otros (Merrow, 1990).

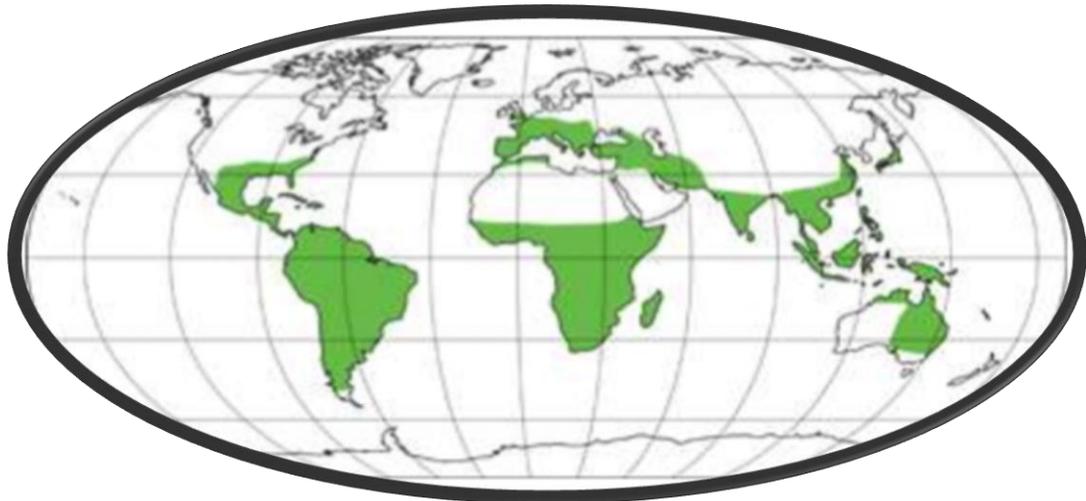


FIGURA 1-1.- Geodistribución de la familia Amaryllidaceae

Fuente: (Acosta 2014)

La Familia de las Amaryllidaceae, es conocida por ser ornamental, ya que destaca sus colores y formas. Ésta tiene tres subfamilias que son Amaryllioideae, la más conocida, además de Agapanthoideae y Allioideae- (Departamento de Ecología y Ciencias Ambientales- UDELAR, 2017).

Amaryllidaceae, presenta alcaloides con propiedades farmacológicas y biológicas, como la galantamina, alcaloide exclusivo de esta familia, este compuesto fue aislado por primera vez de las especies de *Galanthus*, y es considerado un inhibidor selectivo, reversible y competitivo de la acetilcolinesterasa de larga duración, por lo que se lo utiliza para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Bastidas, et al., 2011).

1.1.1. Alcaloides presentes en Amaryllidaceae

Esta familia de plantas se caracteriza por tener alcaloides de tipo isoquinolina. Se han aislado alrededor de 300 alcaloides diferentes, según su estructura, éstos varían considerablemente, pero se dice que están relacionados biogenéticamente. Por la variabilidad estructural que presentan, han sido clasificados en 9 tipos: norbeladina, licorina, homolicorina, crinina, haemantamina, narciclasina, tazetina, montanina y galantamina (figura 2-1). (Bastida et al. 2011).

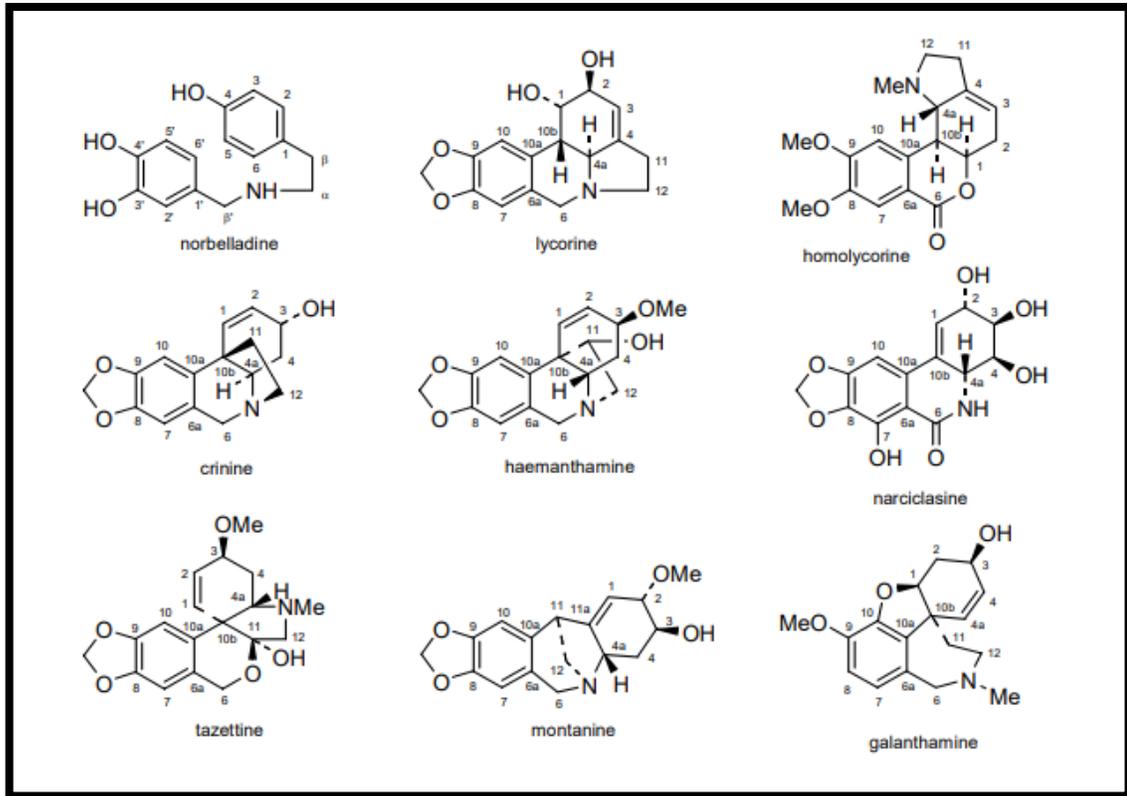


Figura 2-1. Clasificación de los alcaloides presentes en Amaryllidaceae.

Fuente: (Bastida et al. 2011)

1.1.2. *Amaryllidaceae en Ecuador*

En Ecuador se han encontrado 36 especies de Amaryllidaceae, de las cuales 12 son endémicas. Dentro de ellas podemos encontrar a: *P. cinérea*, *P. dubia*, *P. brevifolia*, *P. tungurague*, *P. cuencana*, *Eucharis grandiflora*, *E. formosa*, *E. moorei*, entre otras (Minga et al. 2015) (Merrow, et al., 2015).

1.1.3. *Phaedranassa cuencana*

P. cuencana fue descrita por primera vez en el año 2015, es conocida comúnmente como *urco* cebolla o cebolla del cerro y se caracteriza por tener una gran potencial ornamental (Minga et al. 2015).

P. cuencana tiene forma tubular y carnosa, cada flor presenta 6 pétalos de color rojo con los bordes distales de color verde oscuro; además, de bordes pálidos amarillos verdosos. Su bulbo es ancho y de color blanco entero.

La semilla es de color café oscura o negra y por lo general son planas (Minga et al. 2015).

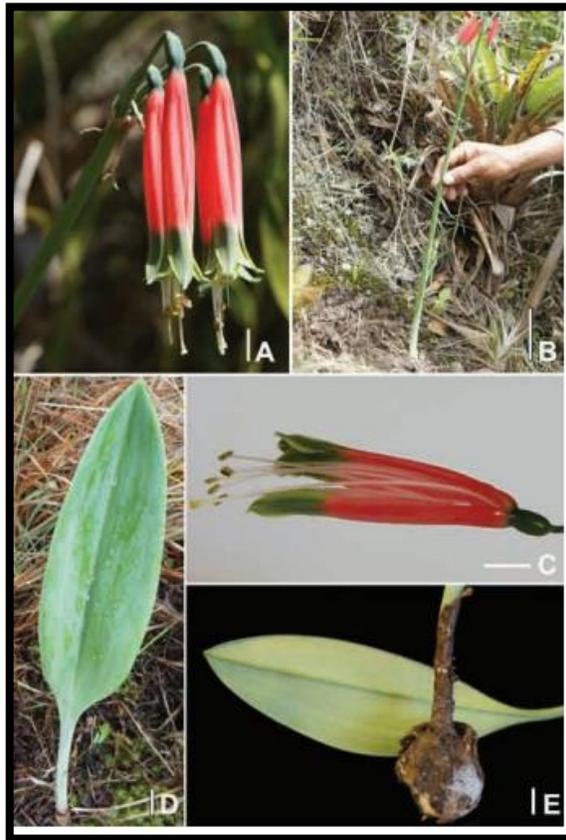


Figura 3-1. *Phaedranassa cuencana*. **A.** Inflorescencia. **B.** Hábit vegetal. **C.** Flor abierta mostrando estambres. **D.** Hoja, lado adaxial **E.** Hoja, lado abaxial y bulbo.

Fuente:(Minga et al. 2015)

Se puede encontrar en acantilados y carreteras del sur de Ecuador, en la provincia de Azuay y el límite con Cañar. *P. cuencana* ha sobrevivido a la deforestación, incendios, construcciones hechas por el hombre, etc. (Minga et al. 2015).

A pesar de todos los inconvenientes que ha tenido esta especie e incluso estar considerada en peligro de extinción, no se encuentra dentro del Sistema de Áreas Protegidas (Minga et al. 2015).



Figura 4-1. Geodistribución de *Phaedranassa cuencana*.

Fuente: (Minga et al. 2015)

1.2. Demencia

Demencia se compone del prefijo, “de” que significa ausencia y “mens” alma, espíritu o inteligencia; ésta es una manera de describir a una persona que ha perdido la capacidad de auto-manejo (Acosta et al. 2012).

Esta enfermedad es de tipo cognitivo-conductual, pues hay desajustes de comportamiento y no sólo mentales.

La principal demencia que afecta alrededor de mundo es la enfermedad del Alzheimer, aproximadamente al 60% de la población de mayores de 65 años (Alzheimer’s association 2012) (Organización Mundial de la Salud, 2017).

1.2.1. Enfermedad de Alzheimer y su historia

El Alzheimer, es el principal tipo de demencia a nivel mundial, presenta neurodegeneración grave, el primer síntoma y el más alarmante es la pérdida de memoria. Presenta además otros síntomas como alteración del comportamiento e incapacidad de realizar actividades de la vida diaria que antes no le demandaban mucho esfuerzo (Fish et al. 2018; Alzheimer’s association 2012).

La primera vez que se describió este tipo de demencia, lo hizo el médico, psiquiatra, Alois Alzheimer en el año de 1901, quien tuvo una paciente Auguste Deter, de 51 años de edad que presentaba pérdida

de memoria y confusiones, alucinaciones e incluso con el tiempo, perdió la capacidad de hacer cosas habituales para ella (Singh et al. 2013).

Tras haberla analizado durante años, en 1906 Auguste, falleció lo que le permitió a Alois, estudiar el cerebro y de esta manera llegó a la conclusión que éste presentaba similitudes con un anciano con demencia senil, además de reconocer unas placas esféricas que hoy en día las conocemos como placas beta-amiloideas (Singh et al. 2013) (Alzheimer360, 2017).

1.2.2. Hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica, se basa principalmente en la pérdida de neuronas colinérgicas, que afectan áreas del cerebro que están relacionadas con la memoria (Singh et al. 2013).

La disminución del neurotransmisor acetilcolina, en el cerebro de un paciente con Alzheimer, se produce por una mayor actividad de acetilcolinesterasa, enzima que hidroliza al neurotransmisor, produciendo una degradación aumentada de acetilcolina (Singh et al. 2013).

La disminución de este neurotransmisor está asociado a la pérdida de memoria progresiva, es por ello que la ciencia ha realizado investigaciones, que permitan la inhibición de acetilcolinesterasa, incrementando acetilcolina en el espacio sináptico (Singh et al. 2013).

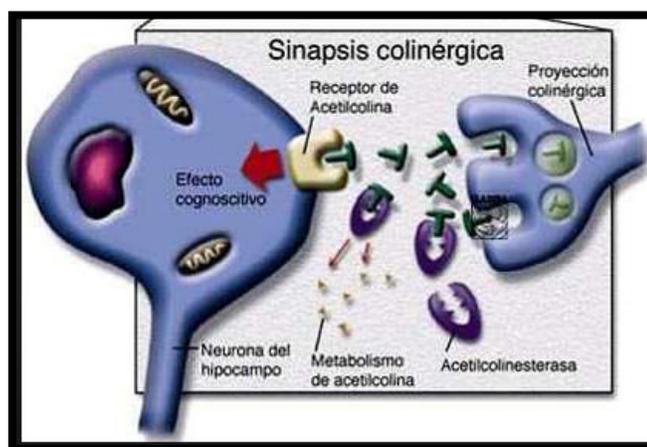


Figura 5-1. Hipótesis colinérgica

Fuente: (Singh et al. 2013)

1.2.2.1. *Acetilcolinesterasa*

Esta enzima es parte de la familia de proteínas α/β hidrolasas, enzimas que tienen similitudes en la parte estructural, incluye también a las carboxilasas, lipasas y colinesterasas.

La acetilcolinesterasa hidroliza a la acetilcolina durante la sinapsis colinérgica (Singh et al. 2013).

En los pacientes que presentan Alzheimer, esta enzima se incrementa considerablemente, además de que influye en la agregación de péptido $A\beta$, formando así placas amiloides y ovillos neurofibrilares- (Singh et al. 2013).

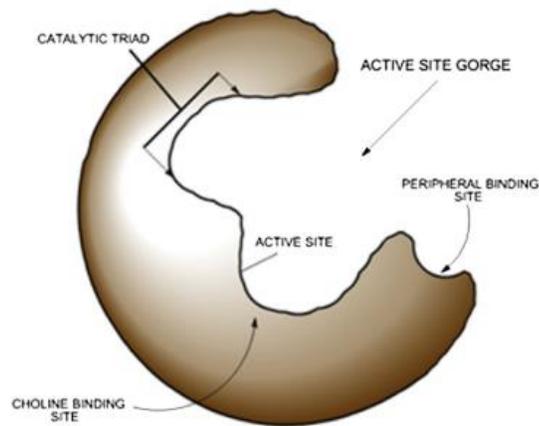


Figura 6-1. Representación de sitios de acción de acetilcolinesterasa

Fuente: (Singh et al. 2013)

1.2.2.2. *Butirilcolinesterasa*

Enzima perteneciente al grupo de las hidrolasas, presenta menor especificidad que la AChE para hidrolizar a la acetilcolina, pero mayor afinidad por la succinilcolina. Esta succinilcolina se metaboliza en el hígado, cuando se presenta algún daño a nivel hepático (Chigurupati, et al., 2016).

1.2.3. *Hipótesis amiloidea*

Esta teoría se basa principalmente en la formación de unas placas que se caracterizan por contener una proteína llamada “beta amiloide”, estas pueden destruir y dañar las células del cerebro de muchas maneras, e incluso afectar en la sinapsis. Sin embargo, aún es desconocido la muerte de las neuronas, pero la acumulación de estas placas son la principal sospecha (Alvarado, 2012)(Singh et al. 2013).

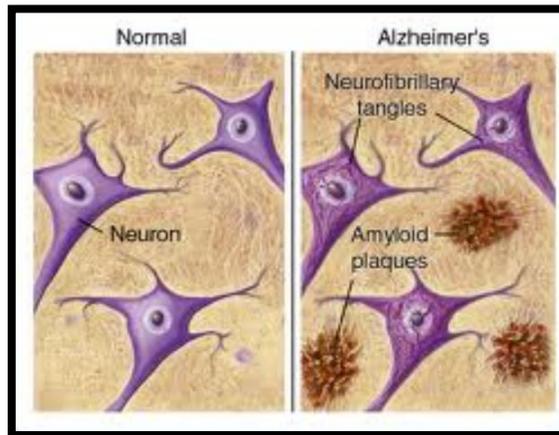


Figura 7-1. Neuronas en un cerebro sano y neuronas en un cerebro con EA- Hipótesis amiloidea

Fuente: (Alvarado, 2012)

1.2.4. Hipótesis de proteínas tau

Para que el cerebro funcione correctamente, depende de un sistema interno y transporte, éste transporta nutrientes a lo largo de todas las prolongaciones. Todo este sistema necesita de las proteínas “tau”; esta proteína se encuentra presente el sistema estabilizando a los microtúbulos. Cuando la tau se altera (hiperfosforila), empieza a formar ovillos anormales, que dan lugar a una desintegración de los microtúbulos, provocando un fallo en el transporte, lo que tiene gran importancia ya que se produce fallos en la comunicación, disminución y muerte neuronal (Romano, et al., 2007) (Singh et al. 2013).

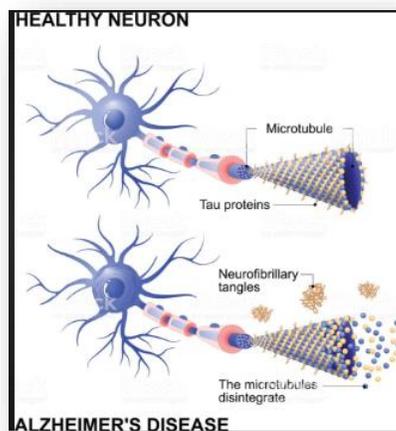


Figura 8-1. Neuronas en un cerebro sano y neuronas en un cerebro con EA- Hipótesis tau

Fuente: (Alvarado, 2012)

1.2.5. Tipos de Alzheimer.

Existen dos tipos de Enfermedad de Alzheimer (Singh et al. 2013).

- Enfermedad del Alzheimer esporádica: incremento de la muerte neuronal, por lo tanto, un declive paulatino de la cognición.
- Enfermedad del Alzheimer familiar: se produce de una manera mucho más acelerada, presenta mutaciones en la proteína precursora amiloidea (APP), Apolipoproteína E4, presenilina-1 y presenilina-2 (PS1 y PS2) y el receptor 1 relacionado con sortilina (SORL1)

1.2.6. Fases del Alzheimer

La Enfermedad del Alzheimer se puede clasificar en tres fases: (Universidad Internacional de Valencia, 2017).

- Leve: los síntomas son ligeros, los pacientes, presentan olvidos cotidianos, necesitan supervisión solamente en actividades complejas, pues aún mantienen su autonomía.
- Moderada: el paciente depende de una persona que lo cuide y que lo ayude a realizar actividades cotidianas. No puede recordar datos personales y comprender lo que se le explica es muy complicado.
- Avanzados: el paciente es absolutamente dependiente. Ya no logra reconocer a quien lo rodea, ni siquiera a él mismo.

1.2.7. Síntomas

La EA, se caracteriza por un déficit gradual y progresivo del área de la cognición en el cerebro, además, afecta áreas del cerebro que regulan el aprendizaje, memoria, atención y emocional. Los síntomas incluyen: (Singh et al. 2013).

- Pérdida de memoria (dificultad de recordar información reciente)
- Alteración en el humor y comportamiento
- Problemas de lenguaje
- Dificultad de Praxis (incapacidad de aprender algo nuevo)
- Déficit de atención

1.2.8. Factores de riesgo

En la tabla 1-1 se detallan los principales factores de riesgo que afectan el Alzheimer se encuentran los siguientes

Tabla 1-1. Factores de riesgo de la Enfermedad del Alzheimer

Factores de Riesgo	Descripción
Edad	Principal factor de riesgo en la EA, pues a mayor edad, mayor riesgo de enfermedad
Sexo	Mayor incidencia en mujeres que en hombres, esto se debe en parte a que tienen una vida más larga.
Estilo de vida	Tabaquismo, falta de ejercicio, obesidad.
Historia familiar	Alrededor de un 40% de los sujetos afectados de EA presentan una incidencia familiar de demencia.
Dieta	Una dieta con un consumo alto en antioxidantes, suplementos dietéticos, parece ser un neuroprotector.

Fuente: (Barranco-Quintana, et al., 2015)

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

1.2.9. Tipos tratamiento

1.2.9.1 Tratamiento farmacológico

Para el tratamiento farmacológico se ha probado la eficacia de los inhibidores de la acetilcolinesterasa, lo que provocan estos medicamentos es incremento de acetilcolina, neurotransmisor que se ve disminuido en el cerebro, responsable de la EA, según la hipótesis colinérgica (Zhan *et al.*, 2017, p. 3).

El consumo de vitaminas como B6, B12 y ácido fólico ayudan a que las funciones cognitivas se mantengan (Romano, et al., 2007).

1.2.9.2. Inhibidores de la acetilcolinesterasa.

Se denominan inhibidores de la acetilcolinesterasa, al grupo de fármacos que bloquean la acción de las enzimas colinesterasas, provocando un incremento de acetilcolina en el espacio sináptico (Wang y Zhang 2018).

Estos medicamentos logran resultados clínicos limitados, pero contribuyen a ralentizar la enfermedad del Alzheimer. Los inhibidores de las colinesterasas más conocidos son: donezepilo, rivastigmina y galantamina (Wang y Zhang 2018).

1.2.9.3. Galantamina

La galantamina es un alcaloide que fue aislado de *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae) en el año de 1952 (Zhan *et al.*, 2017, p. 3).

La FDA ha aprobado a la galantamina como uno de los 5 medicamentos para el tratamiento paliativo de la enfermedad del Alzheimer, tiene como mecanismo de acción ser inhibidor selectivo, competitivo y reversible de las colinesterasas cerebrales (Zhan *et al.*, 2017, p. 3).

Se ha comprobado también que el uso prolongado de este medicamento, es tolerado de buena manera, no genera efectos adversos graves. Es por ello que este alcaloide es bien utilizado para tratar la EA (Zhan *et al.*, 2017, p. 3).

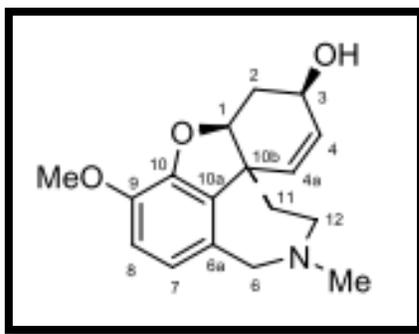


Figura 9-1. Estructura de la Galantamina.
Fuente:(Bergoñon Fuster 1994)

1.2.10. Tratamiento no farmacológico

El tratamiento no farmacológico para el Alzheimer, también llamada terapia blanda, ésta, no busca la cura de esta enfermedad, más bien la psicoestimulación, para conseguir cambios en la conducta del paciente, tratando de minimizar el déficit, además de rehabilitar las funciones cognitivas (Brenes, 2018).

1.3. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas

Es un método considerado como una herramienta clave para separar, identificar y separar componentes ya sean volátiles o semivolátiles de una muestra (Gutiérrez and Droguet, 2002).

Esta técnica suele ser utilizada para confirmar la presencia o ausencia de un compuesto determinado, se lleva a cabo mediante el cotejo de un cromatograma de una sustancia pura, siempre y cuando la obtención de las dos sustancias haya sido bajo las mismas condiciones (Gutiérrez and Droguet, 2002).

1.3.1. Cromatografía de gases

Técnica de separación, que tiene como característica obtener la disociación de componente de una muestra problema. El problema con este método es que, ya separada la muestra, detectado los componentes, el único dato que conseguimos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Esta información no es apta para una identificación adecuada, más aún cuando el análisis se lo haga a muestras con muchos componentes (Gutiérrez and Droguet, 2002).

1.3.2. Espectrometría de masas

La Espectrometría de masas tiene la capacidad de identificar casi sin equivocaciones cualquier sustancia en estado puro, pero cuando los compuestos de la muestra no están separados previamente, se vuelve casi imposible identificarlo, pues el espectro que se conseguirá será de extrema complejidad (Gutiérrez and Droguet, 2002).

Entonces, se puede decir que mucho mejor es este método acoplado de análisis cualitativo, pues al combinar CG (Cromatografía de gases) con EM (Espectrometría de Masas), forman una técnica acoplada de CG-EM, y con este procedimiento se une la capacidad de separación de la cromatografía de gases, como la técnica de identificación de la espectrometría de masas, pudiendo así separar e identificar mezclas complejas, utilizando pequeñas cantidades de muestra (Gutiérrez and Droguet, 2002).

1.4. Método Ellman

El método Ellman, es una técnica fotométrica muy sensible, se utiliza para medir la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa, mediante el cambio de coloración amarillento que se produce cuando la tiocolina interacciona con ditiobisnitrobenzoato como se muestra en figura 10-1 (Ellman, 1961).

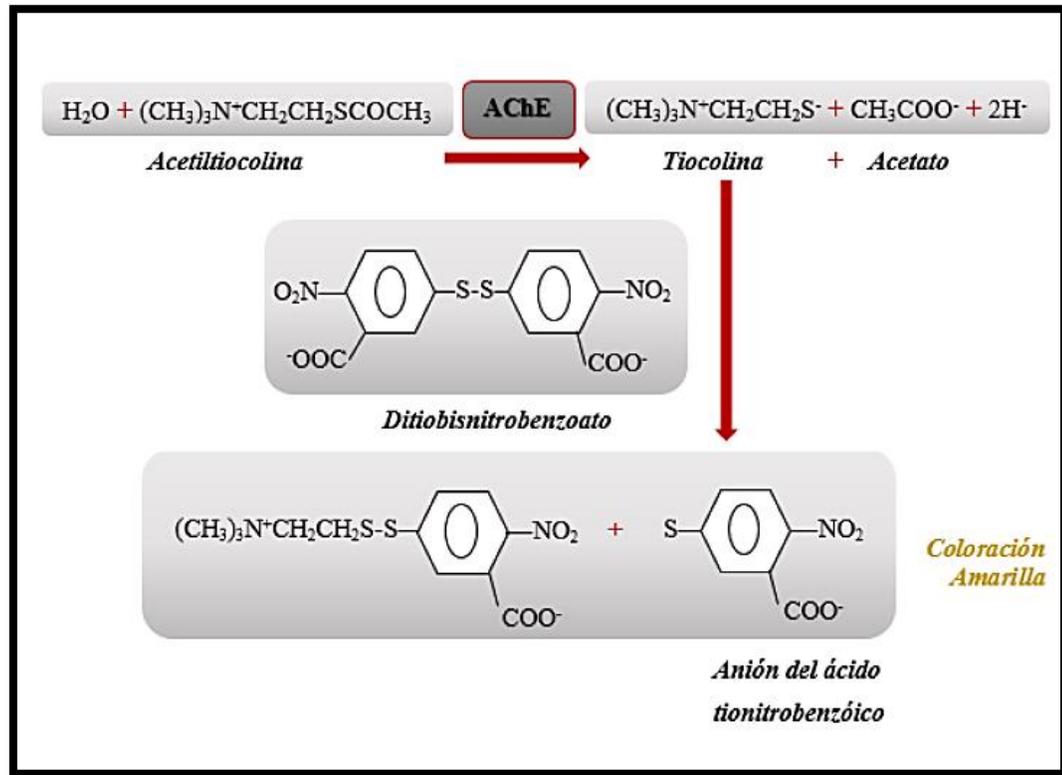


Figura 10-1. Reacción esquemática del método de Ellman

Fuente: (Ellman, 1961)

Para poder realizar la medición de la coloración amarilla, se utiliza un Espectrofotómetro UV-visible, a una longitud de onda de 405 nm (Ellman, 1961).

Al ser muy sensible este método, podemos utilizarlo con pequeñas cantidades de tejido o bajas concentraciones de enzima. Por lo tanto, permite el estudio meticuloso de la actividad de acetilcolinesterasa, ya que a medida que avanza la hidrólisis de esta enzima; se puede medir por medio de la aparición del producto de la reacción (Ellman, 1961).

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Diseño de Estudio

Esta investigación es un diseño experimental que tiene como finalidad la evaluación de la actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE por parte del extracto de alcaloides de bulbos de *P. cuencana*.

2.1.1. Unidad de análisis.

La unidad de análisis del presente trabajo fue el extracto alcaloidal obtenido de los bulbos de *P. cuencana*.

2.1.2. Población a Estudiar

Bulbos de *P. cuencana*.

2.1.3. Cantidad de Muestra

3 bulbos frescos de *P. cuencana* fueron recolectados por medio de un muestreo aleatorio simple.

2.2 Lugar de recolección del material vegetal

El lugar de recolección de *P. cuencana* fue la provincia de Azuay, cantón Cuenca, comunidad de Padre Urco. Tanto la recolección como investigación de la especie se realizó bajo Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos "LA BIODIVERSIDAD DE AMARYLLIDACEAE COMO FUENTE DE RECURSOS NATURALES PARA SU EXPLOTACIÓN SOSTENIBLE" (No. MAE-DNB-CM-2015-0054). Además, se transportó el material vegetal desde su lugar de origen hasta la ESPOCH con la Orden de Movilización de Vida Silvestre No.142-DPA-MA-2018.

2.2.1 Selección de Muestra

Para la recolección del material vegetal se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

- **Criterios de inclusión:** se procedió a seleccionar a las mejores especies vegetales, es decir a las que a simple vista presenten vitalidad y buen estado.
- **Criterios de exclusión:** se descartó a aquellas plantas que presentaron daños en su superficie ya sea por descomposición, acción de animales, clima, o contaminación microbiana.

2.3. Área de investigación

Este trabajo de investigación se realizó en el cantón Riobamba, ubicado provincia de Chimborazo, concretamente en el Laboratorio de Productos Naturales (Facultad de Ciencias) de la ESPOCH, como parte del Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia (GIPRONAF).

Paralelamente, la Universidad de Barcelona (España) colaboró en esta investigación, realizando los análisis de identificación de alcaloides.

2.4. Determinación de la identidad del material vegetal

La determinación de la identidad de *P. cuencana* fue realizada por la Dra. Nora Oleas, botánica a cargo del Herbario de la Universidad Técnica Indoamérica (Quito - Ecuador).

2.5. Materiales, equipos y reactivos

2.5.1. Material vegetal

200 g de bulbos frescos de *P. cuencana*.

2.5.2. Equipos

Tabla 1-2. Equipos utilizados en la investigación

Procesos	Equipos
Preparación del material vegetal	Estufa con extracción de aire RedLine by Binder
	Molino Arthur H. Thomas C.O
	Balanza analítica HDM
Obtención del extracto alcaloidal	Sonicador
	Rotavapor
	Sorbona
	pH-metro
Preparación de reactivos	Agitador magnético
	Sorbona
	pH-metro
	Agitador Vórtex
Conservación de reactivos	Refrigerador
	Congelador (-20° C)
Determinación de la actividad inhibitoria de las enzimas colinesterasas	Agitador Vórtex
	Computador
	Cronómetro
	Centrífuga
	Lector de Microplacas Thermo Scientific
Identificación de alcaloides	Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

2.5.3 Materiales y Reactivos

Tabla 2-2. Materiales y Reactivos usados en las diferentes etapas de investigación

Cantidad	Material	Etapas	Reactivos
3	Balón de aforo de 100 mL	Preparación de reactivos	<ul style="list-style-type: none"> Ácido clorhídrico HCl 0,5 N Hidróxido de sodio NaOH 0,5 N
1	Balón de aforo de 500 mL		
1	Probeta de 100 mL		
1	Pipeta graduada de 10 mL		
1	Pipeta graduada de 5 mL		
2	Matraz de 1000 mL		
1	Espátula		
1	Microespátula		
4	Frascos ámbar de 500 mL		
1	Frasco ámbar de 1000 mL		
1	Probeta de 1000 mL		
1	Probeta de 100 mL		

1	Papel filtro	Obtención de extracto alcaloidal	<ul style="list-style-type: none"> Ácido sulfúrico H_2SO_4 (2 % v/v) Éter etílico (C_2H_5) Hidróxido de amonio NH_4OH (25 % v/v) Acetato de etilo $C_4H_8O_2$ Sulfato de Sodio Anhidro Na_2SO_4 Goma arábiga
2	Vaso de Precipitación de 500 mL		
2	Vaso de precipitación de 250 mL		
1	Balón de rotavapor de 500 mL		
1	Embudo de separación de 500 mL		
1	Frasco de vidrio tipo vial de 5 mL		
1	Desecador		
1	Balón de aforo de 50 mL		
1	Microespátula		
150	Tubos Eppendorf 5 mL		
150	Tubos Eppendorf 0,5 mL		
1	Tubo de plástico graduado de 40 mL		
2	Tubos plásticos graduados de 4 mL		
14	Tubos graduados falcon de 2 mL		
1000	Puntas azules para micropipeta		
2000	Puntas amarillas para micropipetas		
1	Microplaca de 96 pocillos		
1	Dispensador de líquidos para pipeta Multicanal		
4	Bloques de hielo		
2	Rollos de papel tipo toalla		
-	Papel aluminio		
1	Piseta		

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

2.6. Procesos y métodos

2.6.1. Acondicionamiento del material vegetal

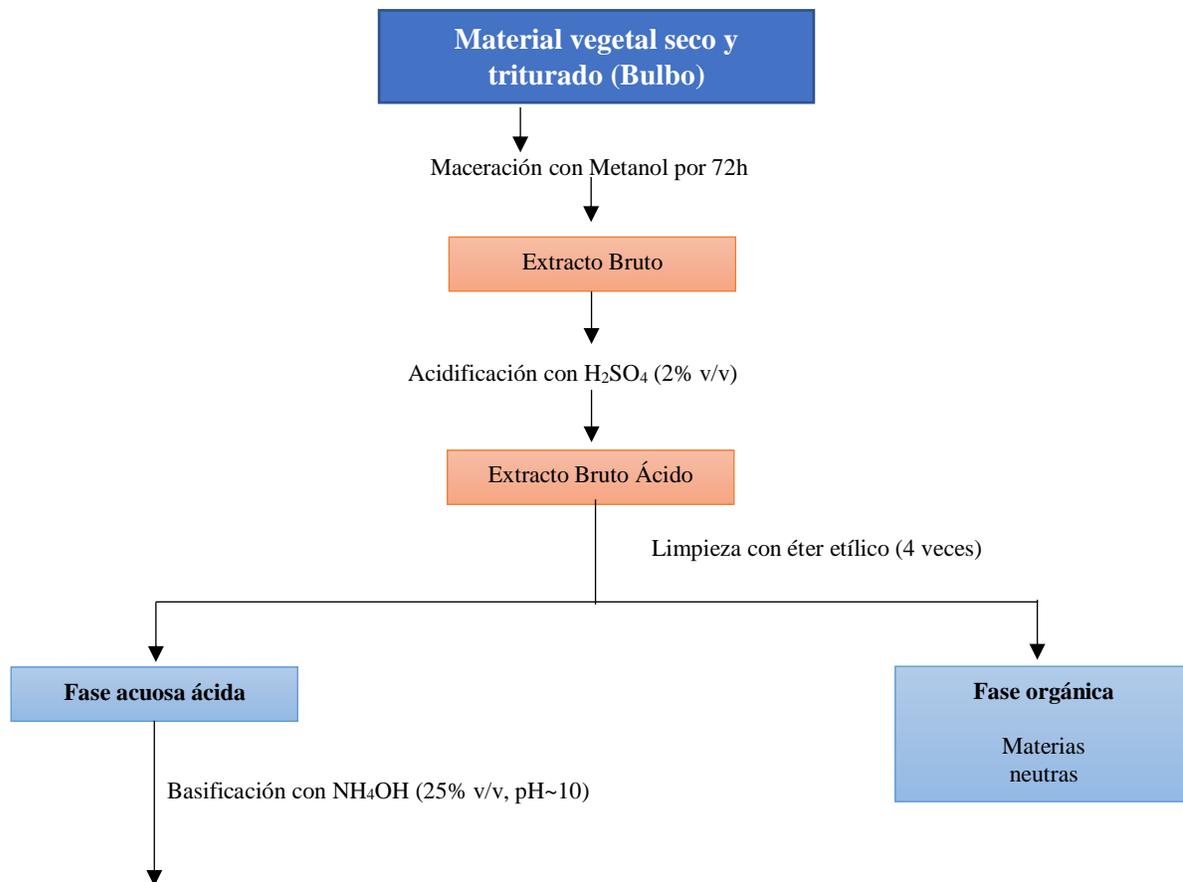
Los bulbos de *Phaedranassa cuencana* fueron limpiados cuidadosamente y seccionados en trozos de cerca de 1,5 cm; a continuación, se colocaron en una estufa de extracción de aire durante 48 horas a 60 °C, para deshidratarlos. Posterior a esto, se trituro el material vegetal seco en un molino Arthur H. Thomas C.O. y se conservó en un ambiente fresco y seco.

2.6.2. Extracción de alcaloides

Luego de haber realizado el acondicionamiento de los bulbos de *P. cuencana*, se pesaron 20 gramos de material seco y, utilizando 800 mL de metanol, se maceró por 50 horas. Además, se utilizó el sonicador durante el proceso de maceración en intervalos de 1 a 2 horas, diariamente.

Se filtró el macerado y se obtuvo el extracto bruto líquido; utilizando el rotavapor a una temperatura de 50 °C y a presión reducida, se evaporó el solvente, consiguiendo así el extracto crudo.

Proceso de extracción de alcaloides se detalla en la figura 2-1.



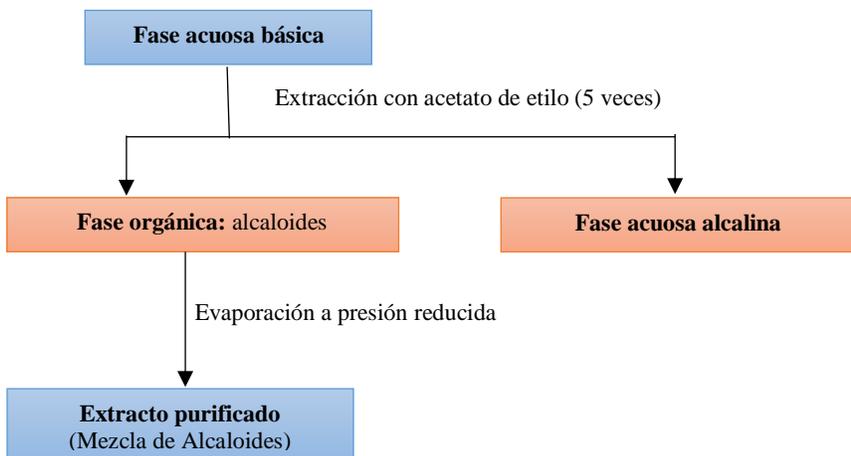


Figura 2-1. Esquema para la extracción de alcaloides de *Phaedranassa cuencana*. (Acosta, 2014)

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

Se utilizó H_2SO_4 (2 % v/v) para acidificar el extracto crudo, seguidamente se realizó una limpieza con éter etílico para eliminar las grasas, clorofilas, mucílagos y otros componentes. Se eliminó la fase etérea y se continuó la extracción con la fase acuosa, donde se encontraban los alcaloides con otros compuestos polares (Acosta, 2014) (Arango, 2008).

Posteriormente, se añadió NH_4OH (25 % v/v) a la fase acuosa ácida, hasta alcanzar un pH de 10. Se agregó acetato de etilo, en la cual quedaron disueltos los alcaloides en forma básica (Arango, 2008). A continuación, se añadió sulfato de sodio anhidro y goma arábiga para retener los residuos de agua presentes en el extracto. Seguidamente, se filtró y utilizando el rotavapor a 50 °C, se evaporó el solvente a presión reducida, obteniendo así el extracto de alcaloides.

2.6.3. Separación e Identificación de alcaloides mediante (CG-EM)

Para la separación e identificación de los alcaloides presentes en la especie vegetal *P. cuencana*, se utilizó el método de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. Se utilizó un dispositivo Cromatógrafo de Gases Agilent, modelo 6890, acoplado a un espectrómetro de masas, modelo 5975, éste funciona a 70 eV y en la fuente iónica a 230 °C.

El aparato de cromatografía utilizado posee una columna SAPIENS-XS-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), funciona con una fase estacionaria de fenilmetilsilicona al 5 %. Los cambios de la temperatura que se utilizó durante el proceso fueron:

- Aumento de la temperatura desde 55 °C hasta 100 °C (60 °C/min)
- Dos minutos a 100 °C
- Aumento de 100 °C hasta 180 °C (15 °C/min)
- Un minuto a 180 °C
- Aumento de 180 °C hasta 300°C (5°C/min)

El inyector trabajó a 280 °C, con un flujo de helio de 0,8 ml/min, además, para incrementar la sensibilidad de este método, se usó splitless, el cual permite una mayor eficacia en comparación a otras técnicas de inyección (Olguín & Rodríguez, 2004).

Se utilizó como referencia a la codeína (0,05 mg/mL). En el análisis de datos se ocupó el software AMDIS 2.71 (NIST), éste aportó para corroborar la pureza de las señales y establecer los índices de retención.

2.7. Preparación de soluciones

2.7.1. Reactivos

Tabla 3-2. Reactivos para alcanzar pH de PBS y Solución Salina

Soluciones	Concentración
NAOH	0,5 N
HCl	0,5 N

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

- **Solución Salina (Na_2HPO_4)**

La solución salina se elaboró pesando Na_2HPO_4 a una concentración de 0,04 M, posteriormente se aforó a 1000 mL utilizando agua desionizada. Esta solución debe estar a un pH específico de 7,5 para lo que se ocupó HCl (0,5 N) en pequeñas cantidades hasta ajustarlo.

- **Buffer fosfato salino (PBS)**

Tabla 4-2. Reactivos ocupados en el PBS

Reactivos	Concentración
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	8 mM
Bifosfato de sodio (NaH_2PO_4)	2,3 mM
Cloruro de sodio (NaCl)	0,15 M
Agua desionizada	1000 mL

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

El PBS necesita un pH de 7,5 para ajustarlo se empleó NaOH (0,5 N).

Nota: Tanto el PBS como la solución salina fueron almacenados en frascos ámbar y conservados en refrigeración (4 °C).

- **Ácido 5,5- ditio-bis-2- nitrobenzoico (DTNB)**

El DTNB se utilizó a una concentración de 2 mg/mL, el reactivo empleado fue D-8130, adquirido en la empresa Sigma-Aldrich. Se conservó a temperatura de congelación (-20 °C). Esta solución se considera estable alrededor de 3 meses.

- **Yoduro de acetiltiocolina (ATC)**

En la preparación de ATC, se pesó yoduro de acetilcolina, a esto se agregó solución salina para disolverlo consiguiendo una concentración de 1,7 mg/200 µL. El reactivo empleado fue adquirido en la empresa Sigma-Aldrich. Se almacenó a temperatura de congelación (-20 °C). Esta solución se considera estable alrededor de 3 meses.

- **Yoduro de Butiriltiocolina (BTC)**

En la preparación de BTC, se pesó yoduro de butiriltiocolina, a esto se agregó solución salina para disolverlo, se obtuvo una concentración de 1,9 mg/200 µL. El reactivo empleado fue adquirido en la empresa Sigma-Aldrich. Se almacenó a temperatura de congelación (-20 °C)). Esta solución se considera estable alrededor de 3 meses.

2.7.2. Preparación de sustrato

Mientras se realiza el ensayo, en un balón aforado de 25 mL, lavado, secado y forrado con papel aluminio con anterioridad, se debe adicionar DTNB y complementar con ATC o BTC según sea el ensayo que se vaya a realizar, para finalizar la preparación aforar con solución salina y se conservar a temperatura de 4 °C.

2.7.3 Preparación de enzimas

- **Acetilcolinesterasa (AChE)**

Para AChE se utilizó una concentración final de 0,195 U/mL y se conservó a la temperatura de congelación -20 °C.

La enzima empleada fue AChE de anguila eléctrica *Electrophorus electricus* (C3389). El reactivo fue adquirido en la empresa Sigma-Aldrich.

- **Butirilcolinesterasa (BuChE)**

-Para BuChE se utilizó una concentración final de 0,260 U/mL y se conservó a temperatura de congelación (-20 °C).

La enzima empleada fue BuChE de suero de equino (C7512). El reactivo fue adquirido en la empresa Sigma-Aldrich.

2.8. Diluciones de galantamina

En la elaboración de las diluciones, se empleó una tableta de galantamina de 12 mg (Buxton): el comprimido se trituró y se añadió PBS para disolverlo.

Se manejó una concentración 1 mg/mL, la solución se colocó en tubos graduados Falcon; se almacenaron y conservaron a temperatura de refrigeración 4°C

Tabla 5-2. Diluciones de Galantamina

Solución N°	Concentración
1	1*10 ⁻³ M
2	1*10 ⁻⁴ M
3	1*10 ⁻⁵ M
4	0.5*10 ⁻⁵ M
5	1*10 ⁻⁶ M
6	0.5*10 ⁻⁶ M
7	1*10 ⁻⁷ M

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

Nota: Las concentraciones son empleadas para AChE (Soluciones 2-7) y BuChE (soluciones de 1-6)

2.9. Diluciones de extracto de alcaloides de *Phaedranassa cuencana*

A partir del extracto alcaloidal de *Phaedranassa cuencana*, se preparó la solución madre a una concentración de 10 mg/mL.

Para que la muestra se homogenice con el solvente, además, de la completa disolución de los alcaloides, se aplicaron baños de ultrasonido en combinación con agitador vórtex.

Se dejó reposar la muestra con el fin de que las partículas insolubles precipiten, para los ensayos se tomó el sobrenadante.

Cabe mencionar que las concentraciones utilizadas en los ensayos de inhibición enzimática fueron preparadas a partir de la solución madre, empleando PBS como disolvente.

Tabla 6-2. Concentraciones de *Phaedranassa cuencana* usadas en el ensayo de inhibición de colinesterasas.

Nº dilución	Conc. (µg/mL) del extracto para AChE	Conc. (µg/mL) del extracto para BuChE
1	10	150
2	5	100
3	2,5	50
4	1	25
5	0,5	10
6	0,1	5

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

2.10. Ensayos de inhibición enzimática de colinesterasas

Para la realización de este ensayo, se siguió el método Ellman et al. con algunas modificaciones. (Ellman *et al.*, 1961); (Ortiz. Javier, 2016). Se utilizaron microplacas *Eppendorf* de 96 pocillos, donde se colocaron 50 µL del extracto alcaloidal o del estándar galantamina disueltos en PBS y 50 µL de AChE o BuChE disueltas en la misma solución.

En la elaboración del blanco muestra se colocaron en los pocillos 50 µL de la muestra y 150 µL de PBS; para el control se tomaron 50 µL de PBS y 50 µL de enzima; finalmente para el blanco control se colocaron 100 µL de PBS.

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

2.10.1 Cálculo de resultados

- **Porcentaje de inhibición**

Se calcula mediante la fórmula:

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

En donde:

M: Lectura de absorbancia de muestra

C: Lectura de absorbancia de control

BM: Lectura de absorbancia de blanco muestra

BC: Lectura de absorbancia de blanco control

- **Concentración inhibición media (IC₅₀)**

Para obtener el IC₅₀, se hizo una gráfica de ecuación de la recta, en la cual se utilizó promedios de % de inhibición calculado (eje de ordenadas) y las concentraciones de los extractos usados (eje de abscisas); una vez derivada la línea de tendencia logarítmica con su respectiva ecuación.

Con los datos obtenidos, se calculó el IC₅₀, el cual representa la concentración de extracto que inhibe un 50 % las enzimas.

El IC₅₀ es consecuencia del promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones individuales.

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención del extracto alcaloidal de *Phaedranassa cuencana*

Se pesaron 20 gramos de muestra seca de *P. cuencana*, después del proceso de maceración y extracción se obtuvieron 27,4 mg de extracto rico en alcaloides, obteniendo un rendimiento de 0,137 %.

El porcentaje de rendimiento permite medir la efectividad de un procedimiento de síntesis (Pérez, 2009). Al comparar el rendimiento obtenido de *P. cuencana* con otras especies endémicas de Ecuador como *P. cinérea* 0,11 %, *P. tunguraguae* 0,15 %, *P. dubia* 0,2 %, *P. glaucifora* 0,3 %, se puede observar que los valores se encuentran muy cercanos y que no existe una diferencia considerable. (Inca, 2017; Baldeón, 2018; Montero, 2018; Salazar, 2017).

Tabla 1-3. Resultados de la preparación del extracto de *Phaedranassa cuencana*.

Material vegetal	Muestra seca (g)	Volumen de metanol (mL)	Extracto rico en alcaloides (mg)	% Rendimiento
Bulbos de <i>Phaedranassa cuencana</i>	20 g	800 mL	27,4 mg	0,137 %

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

3.2 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

En la tabla 2-3 se presentan los resultados arrojados de la CG-EM del estudio realizado a *P. cuencana*.

Tabla 2-3. Alcaloides reconocidos en el extracto purificado del bulbo de *Phaedranassa cuencana*, a través de CG-EM.

Alcaloides	Rt	RI	% Total
Galantamina	22,256	2386,0	18,90
Sanguinina	22,529	2403,1	7,25
N-demetilgalantamina	22,906	2428,3	<0,1
Codeína*	22,950	2431,3	17,17
Anhidrolicorina	23,983	2500,5	<0,1
11,12-dehidroanhidrolicorina	25,538	2604,8	<0,1
1-O-acetil-licorina	27,027	2704,5	<0,1
Licorina	27,598	2742,9	56,68

Rt: tiempo de retención **RI:** índice de retención **% Total:** porcentaje total de los alcaloides presentes en *Phaedranassa cuencana*.

* Compuesto de Referencia

Fuente: Universitat de Barcelona

Realizado por: Luciana Tallini, 2019

En los resultados obtenidos de la técnica de CG- EM realizado al extracto alcaloidal de *P. cuencana*, presenta un total de 7 alcaloides identificados, siendo el alcaloide más representativo la licorina con un 56,68 %.

Licorina es uno de los alcaloides más abundantes de la familia de las Amaryllidaceae; es un metabolito importante a nivel farmacológico y biomédico, ya que presenta una gran actividad antiviral frente a la poliomeilitis, coxsackie y herpes tipo 1 (Cabezas *et al.*, 2013).

Además, tiene actividad considerable como inhibidor de la acetilcolinesterasa, pudiendo ser utilizado en el tratamiento del Alzheimer, posee también actividad antifúngica contra *Candida albicans*; antiparasitaria, antibacteriana, emética, antitumoral, antiinflamatoria, antiplaquetaria y antifertil- (Acosta, 2014) (Cabezas *et al.*, 2013).

Un estudio *in silico* de licorina demuestra que posee una gran biodisponibilidad oral; además, los ensayos de toxicidad muestran que no causa alteraciones en el material genético provocando mutagenicidad, tumorigenicidad, irritación o efectos de reproducción celular (Bendaif *et al.*, 2018).

El segundo metabolito más abundante fue galantamina (18,90 %), este compuesto es muy importante ya que presenta una acción prolongada, es selectivo, reversible, competitivo y posee una alta biodisponibilidad; su acción inhibidora de la acetilcolinesterasa, hace que los niveles colinérgicos cerebrales se incrementen, lo que lo vuelve muy útil para el tratamiento del Alzheimer (Sanchez *et al.*, 2011)(López *et al.*, 2002).

Uno de los efectos positivos más notables de galantamina es la mejoría de la cognición y la calidad de vida de pacientes con EA, pues el individuo puede realizar sus actividades diarias de forma normal (Cahlíková *et al.*, 2012).

P. cuencana presentó además otros alcaloides como sanguinina (7,25 %), anhidrolicorina (<0,1 %), N-demetilgalantamina (<0,1 %), 11,12-dehidroanhidrolicorina (<0,1 %), 1-O-acetil-licorina.

La sanguinina (9-O-demetilgalantamina), ha mostrado ser un inhibidor 10 veces más poderoso que la misma galantamina *in vitro*, el grupo hidroxilo adicional que posee este compuesto, puede explicar la fuerte actividad inhibitoria de este compuesto (López *et al.*, 2002). A pesar de que la sanguinina es un inhibidor más potente que la galantamina, su baja abundancia natural ha impedido considerablemente su desarrollo como medicamento, debido a esto la búsqueda de nuevos inhibidores de la AChE con mejores perfiles biológicos continúa siendo de gran interés para los químicos (McNulty, *et al.*, 2010).

Existen alcaloides derivados de la licorina que poseen actividad inhibitoria frente a AChE como 1-O-acetil-licorina, pues posee un IC₅₀ = 0,96 μM ± 0,04 (Nair, Aremu and Van Staden, 2011).

En el caso del alcaloide anhidrolicorina presenta propiedades biológicas de las cuales las principales son inhibidor de la biosíntesis del ácido ascórbico, la inhibición del crecimiento y la división celular en plantas superiores, algas y levaduras. Asimismo, tiene una importante actividad antibacteriana. Pero la primordial cualidad de este compuesto es su actividad antitumoral (Guo *et al.*, 2016).

Pese a que no existe evidencia de estudios fitoquímicos de *P. cuencana*; se realizó un análisis comparativo entre otras especies de la misma familia que son endémicas del Ecuador como *P. dubia*, *P. tunguraguae*, *P. glauciflora*, en las se pudo apreciar que en estas especies también predomina la licorina en porcentajes de 54,10 %; 46,97 % y 75,01 %, respectivamente (Inca, 2017; Baldeón, 2018; Montero, 2018).

Cabe destacar que, respecto a la presencia de galantamina, se observa que *P. cuencana* (18,90 %) es la especie vegetal que posee mayor porcentaje de este alcaloide en relación a *P. dubia* (4,54 %), *P. tunguraguae* (0,36 %), *P. glauciflora* (<0,1 %), *P. cinérea* (10,24 %) (Inca, 2017; Baldeón, 2018; Montero, 2018; Salazar, 2017).

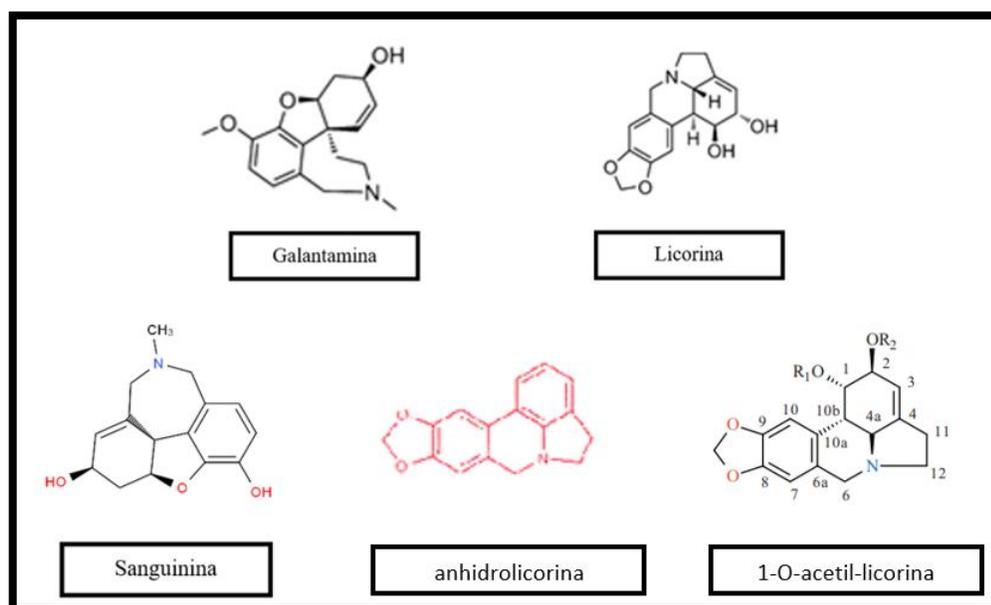


Figura 1-3: Estructuras de los principales alcaloides presentes en el extracto alcaloidal de *Phaedranassa cuencana* (Jahn *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2016).

Tabla 3-3. Actividades biológicas de alcaloides representativos de *Phaedranassa cuencana*.

Alcaloides	Actividad biológica
Licorina	Inhibidor enzimático, emético, analgésico, anti-inflamatorio, estimulante respiratorio, anticancerígeno, antiviral y expectorante.
Galantamina	Inhibidor enzimático, analgésico, anticonvulsivo, hipotensivo, antitumoral
Sanguinina	Potente actividad inhibitoria enzimática
1-O- acetil- Licorina	Potente actividad inhibitoria enzimática
Anhidrolicorina	Inhibidor de la biosíntesis del ácido ascórbico, inhibidor del crecimiento y la división celular en plantas superiores, algas y levaduras. Actividad antibacteriana. antitumoral

Fuente: (López *et al.*, 2002; Nair, Aremu and Van Staden, 2011; Jahn *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2016).

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

3.3 Actividad inhibitoria de *Phaedranassa cuencana* sobre AChE

3.3.1. Primer screening de inhibición de *Phaedranassa cuencana* sobre AChE

Tabla 4-3. Resultados del primer screening de inhibición de *P. cuencana* sobre AChE

Concentración extracto de alcaloides ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de Inhibición de AChE* (%)
1	52,475 \pm 0,556
10	83,284 \pm 0,583
50	90,493 \pm 0,266
100	93,565 \pm 0,072

*El resultado es la media de 3 repeticiones

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

En la tabla 4-3 se presentan las 4 concentraciones y los porcentajes de inhibición con su respectiva desviación estándar obtenidos en el primer *screening*.

Se puede observar que la máxima concentración del extracto de alcaloides de *P. cuencana*, 100 $\mu\text{g/mL}$ tiene un porcentaje de inhibición de 93,565 \pm 0,072 %; y la mínima concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ posee una inhibición del 52,475 \pm 0,556 %.

Después de analizar estos resultados, se pudo determinar las 6 concentraciones con las que se realizó el segundo *screening*; las concentraciones fueron: 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; con las cuales se obtuvo la ecuación de la recta, la misma que nos ayudará a calcular el IC_{50} (Cahlíková *et al.*, 2012).

3.3.2. Segundo *screening* de inhibición de *Phaedranassa cuencana* sobre AChE.

En la tabla 5-3 se muestran los resultados de los porcentajes de inhibición sobre AChE.

Tabla 5-3: Resultados del segundo *screening* de inhibición de *P. cuencana* sobre AChE.

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentajes de Inhibición de AChE (%)
10	83,78 \pm 0,24
5	73,05 \pm 1,58
2,5	62,52 \pm 1,28
1	49 \pm 0,63
0,1	12,31 \pm 0,48

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019.

En este segundo *screening*, se observa que a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, el porcentaje de inhibición es de 83,78 \pm 0,24 %. Estos resultados nos proporcionan la información acerca del comportamiento que tiene el extracto de alcaloides de *P. cuencana*, frente a la enzima acetilcolinesterasa, además con la determinación de las concentraciones utilizadas en la tabla 5-3 se pudo conseguir que dos se encuentren por encima del 50 % de inhibición y dos por debajo del mismo, de esta manera nos aseguramos que este método sea válido (López *et al.*, 2002).

3.3.3 Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Phaedranassa cuencana* sobre AChE

Tabla 6-3: Inhibición del extracto alcaloidal de *P. cuencana* sobre AChE

Compuesto	IC ₅₀ AChE (µg/mL)
Galantamina *	0,30 ± 0,02 R ² = 0,99
Extracto de alcaloides de <i>Phaedranassa cuencana</i>	1,12 ± 0,05 R ² = 0,99

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

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

Durante esta etapa, se estableció la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *P. cuencana* sobre la enzima de AChE. Los resultados de la tabla 6-3 indican que la especie vegetal estudiada presenta un IC₅₀ = 1,12 ± 0,05 µg/mL, el cual indica una alta actividad inhibitoria sobre AChE. Galantamina, utilizada como referencia, muestra un IC₅₀ = 0,30 ± 0,02 µg/mL, podemos observar resultados bastantes cercanos entre este alcaloide y el extracto alcaloidal de *P. cuencana*.

Al no haber registros bibliográficos de *P. cuencana*, se comparó con otras especies endémicas del Ecuador: *P. cinérea* IC₅₀ = 37,6 ± 0,097 µg/mL (Salazar, 2017); *P. dubia* IC₅₀ = 25,48 ± 0,3 µg/mL (Inca, 2017); *P. tunguraguae* IC₅₀ = 11,12 ± 1,87 µg/mL (Montero, 2018) y *P. glauciflora* IC₅₀ = 39,94 ± 5,09 µg/mL (Baldeón, 2018). Se puede observar que todas las especies de este género presentan una alta actividad inhibitoria sobre AChE, siendo la más destacable la acción de *P. cuencana*.

La actividad inhibitoria que posee *P. cuencana* sobre AChE (IC₅₀ = 1,12 µM ± 0,05), puede deberse al perfil alcaloideo que se obtuvo a través de CG-EM, por la presencia de compuestos predominantes como la licorina (IC₅₀ = 213 µM ± 1) (Elgorashi, et al., 2004), la galantamina (IC₅₀ = 1,07 µM ± 0,18) (López et al., 2002), la sanguinina (IC₅₀ = 0,1 µM ± 0,01) (López et al., 2002), O-acetil-licorina (IC₅₀ = 0,96 µM ± 0,04) (Nair, Aremu and Van Staden, 2011), ya que al estar combinados son mucho más potentes y selectivos y pueden potenciar la actividad inhibitoria.

Se realizó una comparación con otra especie de *Amaryllidaceae* como el extracto alcaloidal de *Zephyranthes carinata* con un IC₅₀ de 5,97 ± 0,24 µg/mL, en su perfil alcaloideo presenta 3-epimacronina y licoramina, que son de interés para la inhibición de acetilcolinesterasa (Cortes et al., 2014).

Estos resultados nos impulsan a realizar más estudios sobre esta especie, pues presenta un gran potencial para tratar la Enfermedad de Alzheimer.

3.4. Actividad inhibitoria de *Phaedranassa cuencana* sobre BuChE

3.4.1 Primer screening de inhibición de *Phaedranassa cuencana* sobre BuChE

En la tabla 7-3 se muestran las concentraciones y los resultados de las pruebas iniciales de la inhibición de BuChE sobre *P. cuencana*.

Tabla 7-3. Resultados del primer screening de inhibición de *P. cuencana* sobre BuChE.

Concentración extracto de alcaloides ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de Inhibición de BuChE* (%)
1	4,69 \pm 0,2
10	32,78 \pm 2,33
50	65,75 \pm 0,67
100	83,72 \pm 1,92

*El resultado es la media de 3 repeticiones

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

Los valores que se encuentran en la tabla 7-3 muestran que a una concentración de 100 $\mu\text{g/ mL}$ se logró inhibir un 83,72 \pm 1,92 %.

Con estos datos se resuelve utilizar las siguientes concentraciones 150; 100; 50; 25;10; 5 $\mu\text{g/ mL}$ para el cálculo del IC_{50} , ya que, para avalar este método, se necesitan como mínimo dos concentraciones por arriba y dos por debajo del 50 % de inhibición.

3.4.2. Segundo screening de inhibición de *Phaedranassa cuencana* sobre BuChE

En la tabla 8-3 se muestran los resultados de los porcentajes de inhibición sobre BuChE

Tabla 8-3: Resultados del segundo screening de inhibición de *P. cuencana* sobre BuChE.

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentajes de Inhibición de BuChE (%)
150	83,64 \pm 1,2
100	75,86 \pm 1,58
50	66,05 \pm 1,79
25	50,40 \pm 2,24
10	36,93 \pm 6,64
5	25,43 \pm 0,29

*El resultado es la media de 3 repeticiones

Elaborado por: Tatiana Jaramillo,2019

En la tabla 8-3, se presentan los porcentajes de inhibición que posee el extracto alcaloideo de *P. cuencana*, se muestra que a una concentración de 150 µg/mL se logró obtener un porcentaje de inhibición máximo de $83,64 \pm 1,2$ % y a una concentración de 5 µg/mL, presenta un valor mínimo de $25,43 \pm 0,25$ %. Se observa que la concentración es directamente proporcional al porcentaje de inhibición.

3.4.3. Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Phaedranassa cuencana* sobre BuChE

Tabla 9-3: Inhibición del extracto alcaloidal de *P. cuencana* sobre BuChE.

Compuesto	IC ₅₀ BuChE (µg/mL)
Galantamina *	$5,00 \pm 0,36$ R ² = 0,96
Extracto de alcaloides de <i>Phaedranassa cuencana</i>	$21,53 \pm 1,64$ R ² = 0,99

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

Realizado por: Tatiana Jaramillo, 2019

En la tabla 9-3 se muestran los resultados de la inhibición del extracto de *P. cuencana*, sobre BuChE, IC₅₀ = $21,53 \pm 1,64$ µg/mL, se comparó con galantamina (compuesto de referencia) la cual presenta un IC₅₀ = $5,00 \pm 0,36$ µg/mL, se observa que existe diferencia.

Además, se realizó un análisis comparativo con otras especies endémicas del Ecuador, de la familia de *Amarillydaceae*, como *P. cinérea* IC₅₀ = $108,505 \pm 8,978$ µg/mL (Salazar, 2017) *P. dubia* IC₅₀ = $114,96 \pm 4,94$ µg/mL (Inca, 2017), *P. tunguraguae* IC₅₀ = $64,49 \pm 1,34$ µg/mL (Montero, 2018), *P. glauciflora* IC₅₀ = $323,62 \pm 3,51$ µg/mL (Baldeón, 2018), se ve claramente que *P. cuencana*, presenta una actividad inhibitoria alta, pues el valor de IC₅₀ está muy cercano a los rangos que reporta galantamina (entre 14 y 22 µg/mL) (Ortiz. Javier, 2016).

Conjuntamente se comparó con otras especies de la familia de *Amarillydaceae* como: *Galanthus cilicicus* con un IC₅₀ de 8,14 µg/mL (Kaya *et al.*, 2017) y *Narcissus poeticus* con un IC₅₀ de $23,0 \pm 1,0$ µg/mL (Bastida *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

- Se extrajo la fracción alcaloidal del bulbo de *P. cuencana*, mediante procesos de extracción basados en cambios de pH utilizando solventes obteniendo un rendimiento de extracción del 0,137 %. _____
- Se determinó la actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa por parte del extracto alcaloidal *P. cuencana* mediante el método de Ellman et al. con modificaciones, obteniendo valores de IC₅₀ de $1,12 \pm 0,05$ $\mu\text{g/mL}$ para AChE y de $21,53 \pm 1,64$ $\mu\text{g/mL}$ para BuChE. Además, se comparó con el valor obtenido por galantamina, compuesto utilizado como referencia, el cual presentó valores de IC₅₀ de $0,3 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$ y IC₅₀= $5,00 \pm 0,36$ $\mu\text{g/mL}$ para AChE y BuChE, respectivamente. Estos valores indican una alta actividad inhibitoria de *P. cuencana* sobre ambas colinesterasas.
- Se obtuvo el perfil alcaloidal de *P. cuencana*, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, identificándose 7 alcaloides: licorina con 56,68 %, galantamina 18,90 %, sanguinina 7,25 % y, en menor cantidad alcaloides de tipo licorina y galantamina.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda tanto el cuidado como la propagación de *P. cuencana*, especie endémica del Ecuador que se encuentra en peligro de extinción y que tiene un alto potencial farmacológico.
- Es recomendable, realizar estudios fitoquímicos y farmacológicos, puesto que *P. cuencana*, posee según su perfil de alcaloides, muchas actividades biológicas, que podrían contribuir de manera positiva al ser humano.
- Se recomienda, que durante los ensayos de inhibición (método Ellman et al, con modificaciones), se controle factores como la temperatura, luz, tiempos de lectura, reactivos y pipeteo, ya que estos pueden influir positiva o negativamente a los resultados.
- Efectuar estudios de toxicidad, ya que éste es un parámetro muy importante para el desarrollo de medicamentos.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, D., BRUSCO, L., FUENTES, P., GUERRA, M., MENA, R., NITRINI, R., TRUJILLO, Z. y VENTURA, R., 2012. *La enfermedad de una perspectiva y tratamiento: Alzheimer, diagnóstico latinoamericana*. Primera Ed. México: s.n. ISBN 9786077743491.

ACOSTA, K., 2014. *IDENTIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES DE Stenomesson aurantiacum (Kunth) Herb. Un* [en línea]. S.l.: Universitat de Barcelona. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1541/1/T-SENESCYT-00674.pdf>.

ACOSTA, K., PIGNI, N., OLEAS, N. y BASTIDA, J., 2014. Identification of the alkaloids of stenomesson aurantiacum (Kunth) herb an amaryllidaceae species from the ecuadorian andes. *Pharmacologyonline*, vol. 3, no. December, pp. 178-183. ISSN 18278620. DOI 10.1155/2013/468909.

ALVARADO, YÉSICA. 2012. Alzheimer. [En línea] 2012. [Citado el: 10 de diciembre de 2018.] <http://enfermedad-alzheimer.blogspot.com/2012/11/alzheimer-medicosgriegos-y-romanos.html>.

ALZHEIMER360. 2017. ALOIS ALZHEIMER: CONOCE LA HISTORIA DEL MÉDICO QUE DESCUBRIÓ LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. [En línea] 2017. [Citado el: 10 de Diciembre de 2018.] <http://alzheimer360.com/alois-alzheimer/>.

ALZHERMER'S ASSOCIATION, 2012. Información Básica Sobre ¿Qué Es La Enfermedad De Alzheimer? *Alzheimer's association*,

ARANGO, G., 2008. Universidad De Antioquia Alcaloides Y Compuestos Nitrogenados. , pp. 84.

ASAMBLEA NACIONAL DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR. 2014. [En línea] 2014. [Citado el: 7 de Diciembre de 2018.] <https://www.asambleanacional.gob.ec/es/contenido/en-ecuador-mas-de-100-mil-personas-sufren-de-alzheimer-y>.

BALDEÓN, V., 2018. *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DE Phaedranassa glauciflora SOBRE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA*. S.l.: s.n.

BARRANCO-QUINTANA, J.L., Y OTROS. 2015. *Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer*. 2015, PubMed, págs. 613-618.

BASTIDA, J., BERKOV, S., TORRAS CLAVERÍA, L., PIGNI, N.B., ANDRADRE, J.P. De, MARTÍNEZ, V., CODINA MAHRER, C. y VILADOMAT MEYA, F., 2011. *Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids* [en línea]. S.l.: s.n. ISBN 9788178955285. Disponible en: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/21374>.

Bastida, J. *et al.* (2002) ‘Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts’, 71, pp. 2521–2529.

Bastida, J. y otros, s.f. *LA BIODIVERSIDAD IBEROAMERICANA COMO FUENTE DE RECURSOS NATURALES PARA SU EXPLOTACIÓN SOSTENIBLE*. [En línea] Available at: <https://www.researchgate.net/project/LA-BIODIVERSIDAD-IBEROAMERICANA-COMO-FUENTE-DE-RECURSOS-NATURALES-PARA-SU-EXPLOTACION-SOSTENIBLE> [Último acceso: diciembre 2018].

BENDAIF, H., MELHAOUI, A., RAMDANI, M., ELMSELLEM, H., DOUEZ, C. y EL OUADI, Y., 2018. Antibacterial activity and virtual screening by molecular docking of lycorine from *Pancreaticum foetidum* Pom (Moroccan endemic Amaryllidaceae). *Microbial Pathogenesis* [en línea], vol. 115, pp. 138-145. ISSN 10961208. DOI 10.1016/j.micpath.2017.12.037. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.037>.

BERGOÑÓN FUSTER, S., 1994. Isolation and chemical characterization of alkaloids of the Amaryllidaceae type. “in vitro” of *Narcissus confusus* Unit of Plant Physiology Department of Natural Products, Plant Biology and Edaphology University of Barcelona. *Universidad de Barcelona* [en línea], pp. 290. Disponible en: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2629/02.SBF_2de2.pdf?sequence=2.

BRENES, ADRIANA. 2018. Alzheimer. [En línea] 2018. [Citado el: 11 de Diciembre de 2018.] <http://investigaciondealzheimer.blogspot.com/2010/12/tratamiento-no-farmacologico-para-el.html>.

CABEZAS, F., PIGNI, N., BASTIDA, J., CODINA, C. y VILADOMAT, F., 2013. Analisis del contenido alcaloidico de *caliphuria subdentata baker* (amaryllidaceae) por el metodo CG-EM. *Revista Latinoamericana de Quimica*, vol. 41, no. 1, pp. 68-73. ISSN 03705943.

CAHLÍKOVÁ, L., BENEŠOVÁ, N., MACÁKOVÁ, K., KUČERA, R., HRSTKA, V., KLIMEŠ, J., JAHODÁŘ, L. y OPLETAL, L., 2012. Alkaloids from some amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications* [en línea], vol. 7, no. 5, pp. 571-574. ISSN 1934578X. Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84861493826&partnerID=tZOtx3y1>.

Cedrón, J., Del Arco, A. & Braun, 2010. Chemistry and Biology of *Pancreatium* Alkaloids. *ELSEIVER*

CHIGURUPATI, SRIDEVI, Y OTROS. 2016. 2016, Bioorganic Chemistry, *Identification of novel acetylcholinesterase inhibitors: Indolopyrazoline derivatives and molecular docking studies*. Vol. 67, págs. 9-17.

Cortes, N. *et al.* (2014) ‘Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants’, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.jpba.2014.09.022.

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y CIENCIAS AMBIENTALES- UDELAR. 2017. Laboratorio de Sistemática de Plantas Vasculares. [En línea] 2017. [Citado el: 8 de diciembre de 2018.] http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/amaryllidaceae_amaryllidoideae.html.

Elgorashi, E., Stafford, G. & Staden, J. v., 2004. Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitory Effects of Amaryllidaceae Alkaloids. *PubMed*, Issue PubMed, p. 260.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V. y FEATHERSTONE, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* [en línea], vol. 7, no. 2, pp. 88-95. ISSN 00062952. DOI 10.1016/0006-2952(61)90145-9. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>.

FISH, P. V., STEADMAN, D., BAYLE, E.D. y WHITING, P., 2018. New Approaches for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [en línea], ISSN 0960894X. DOI 10.1016/j.bmcl.2018.11.034. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X18309016>.

GUO, Y., LI, J., LIU, Y., MA, Y. y CHENG, H., 2016. Inclusion complexes of anhydrolycorine with cyclodextrins: Preparation, characterization, and anticancer activity. *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 94, no. April, pp. 1-32. ISSN 00084042. DOI 10.1139/cjc-2015-0462.

GUTIÉRREZ, M.C. y DROGUET, M., 2002. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: Identification of Off-Odours Compounds. *Boletín Intexter (UPC)*, vol. 122, pp. 35-41. ISSN 11316756 (ISSN). DOI 10.1002/cssc.200900123.

INCA, S., 2017. *DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE Phaedranassa dubia*”. S.l.: s.n.

JAHN, S., SEIWERT, B., KRETZING, S., ABRAHAM, G., REGENTHAL, R. y KARST, U., 2012. Metabolic studies of the Amaryllidaceous alkaloids galantamine and lycorine based on electrochemical simulation in addition to in vivo and in vitro models. *Analytica Chimica Acta* [en línea], vol. 756, pp. 60-72. ISSN 00032670. DOI 10.1016/j.aca.2012.10.042. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.042>.

Kaya, G. I. *et al.* (2017) 'South African Journal of Botany Chemical characterization and biological activity of an endemic Amaryllidaceae species: *Galanthus cilicicus*', *South African Journal of Botany*. South African Association of Botanists, 108(1341), pp. 256–260. doi: 10.1016/j.sajb.2016.11.008.

LABORATORIO DE SISTEMÁTICA DE PLANTAS VASCULARES. [En línea] [Citado el: 8 de diciembre de 2018.] http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/amaryllidaceae_amaryllidoideae.html.

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

MARCET, SILVIA. 2015. [En línea] 2015. [Citado el: 8 de diciembre de 2018.] <http://www.suplementos.unsj.edu.ar/octubre73/?p=127>.

MCNULTY, J. Y OTROS, 2010. Structure–activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volumen 20, pp. 5290-5294.

MERROW, ALAN. 1990. 1990, Harling G, Andersson L. (Eds) Flora of Ecuador, *Amaryllidaceae*. Vol. 41, págs. 1-52.

MERROW, ALAN, JOST, LOU Y OLEAS, NORA. 2015. *Dos nuevas especies de Amaryllidaceae endémicas del Ecuador (Asparagales, Amaryllidaceae, Amarylloideae, Eucharideae)*. 2015, PhytoKeys, Vol. 48, págs. 1-9.

MERROW; SNIJMAN, D., 1998. *Amaryllidaceae*. , pp. 1-6.

MINGA, D., ULLOA, C.U., OLEAS, N. y VERDUGO, A., 2015. A new species of *Phaedranassa* (Amaryllidaceae) from Ecuador. *Phytotaxa*, vol. 192, no. 1, pp. 50-53. ISSN 11793163. DOI

10.11646/phytotaxa.192.1.6.

MONTERO, E., 2018. *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DE Phaedranassa tunguraguae*". S.l.: s.n.

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

OLGUÍN, L. & RODRÍGUEZ, H., 2004. *CROMATOGRAFÍA DE GASES*. [En línea] Available at: http://ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_gases.pdf [Último acceso: diciembre 2018].

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2017. Organización Mundial de la Salud. [En línea] 2017. [Citado el: 8 de Diciembre de 2018.] <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.

ORTIZ, JAVIER, E., 2016. Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and Their Cholinesterase- Inhibitory Activities: An in Vitro and in Silico Study. *Journal of Natural Products*, vol. 79, pp. 1241-1248. DOI 10.1021/acs.jnatprod.5b00785.

PÉREZ, J., 2009. *REACCIONES QUÍMICAS*. [En línea] Available at: https://bloqs.xtec.cat/debianita/files/2014/03/REACCIONES-QU%C3%8DMICAS-rev_2013-copia.pdf [Último acceso: enero 2019].

ROMANO, MARTÍN, Y OTROS. 2007. *Enfermedad del Alzheimer* https://www.academia.edu/11806378/ENFERMEDAD_DE_ALZHEIMER, 2007, Revista de la VIa Cátedra de Medicina, Vol. 175.

SANCHEZ MORILLO, J., PÉREZ, M., BALLESTERES, G., COLLADO, V.P., 2011. Alteración de la actividad de la butirilcolinesterasa en pacientes con enfermedad de Alzheimer tratados con inhibidores de la acetilcolinesterasa. *Neurología*, vol. 26, no. 4, pp. 247-248. ISSN 02134853. DOI 10.1016/j.nrl.2010.09.027.

SALAZAR, C. (2017) *DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE Phaedranassa cinerea*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador

SINGH, M., KAUR, M., KUKREJA, H., CHUGH, R., SILAKARI, O. y SINGH, D., 2013. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection.

European Journal of Medicinal Chemistry [en línea], vol. 70, pp. 165-188. ISSN 17683254. DOI 10.1016/j.ejmech.2013.09.050. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.050>.

WANG, H. y ZHANG, H., 2018. Reconsideration of Anticholinesterase Therapeutic Strategies against Alzheimer's Disease. *ACS Chemical Neuroscience* [en línea], pp. acschemneuro.8b00391. ISSN 1948-7193. DOI 10.1021/acschemneuro.8b00391. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acschemneuro.8b00391>.

Zhan, G. *et al.* (2017) 'Amaryllidaceae alkaloids with new framework types from *Zephyranthes candida* as potent acetylcholinesterase inhibitors', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 127, pp. 771–780. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.10.057.

ZÚÑIGA SANTAMARÍA, T., YESCAS GÓMEZ, P., FRICKE GALINDO, I., GONZÁLEZ GONZÁLEZ, M., ORTEGA VÁZQUEZ, A. y LÓPEZ LÓPEZ, M., 2018. Pharmacogenetic studies in Alzheimer disease. *Neurologia*, ISSN 15781968. DOI 10.1016/j.nrl.2018.03.025.

ANEXOS

ANEXO A.- Recolección de *P. cuencana*.



ANEXO B.- Preparación del extracto crudo a partir de bulbos de *P. cuencana*.



Maceración del material vegetal seco y triturado.



Intervalos de sonicación

ANEXO C.- Extracción de alcaloides de *P. cuencana*.



Filtración del extracto



Limpieza y desengrasado



Concentración del extracto y evaporación del solvente

ANEXO D.- Obtención del extracto puro de alcaloides de *P. cuencana*



ANEXO E.- Prueba de inhibición de colinesterasas.



Lector de microplacas



Microplaca de 96 pocillos

ANEXO F.- Curvas de inhibición de AChE de *P. cuencana*; derivadas para el cálculo del IC50. Se asocian los % de inhibición de AChE vs. concentración del extracto alcaloidal (GFA, GFB, GFC)

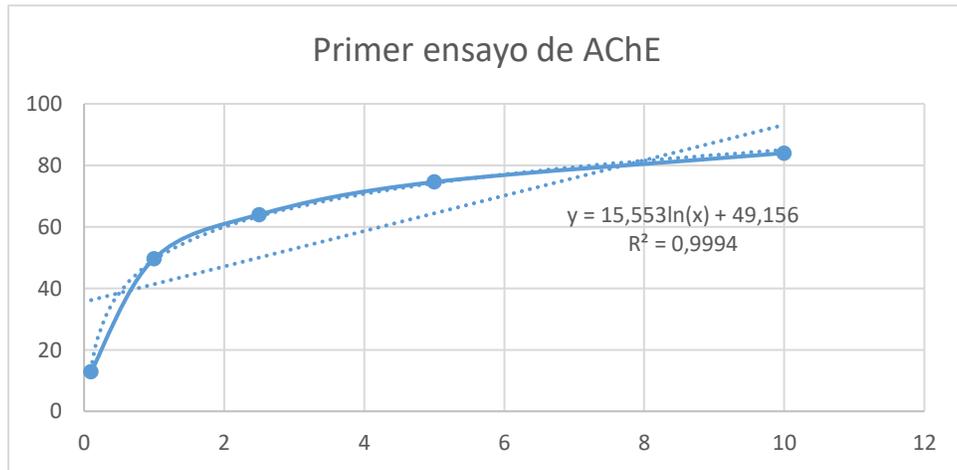


Gráfico FA.- Primer ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal *P. cuencana*.

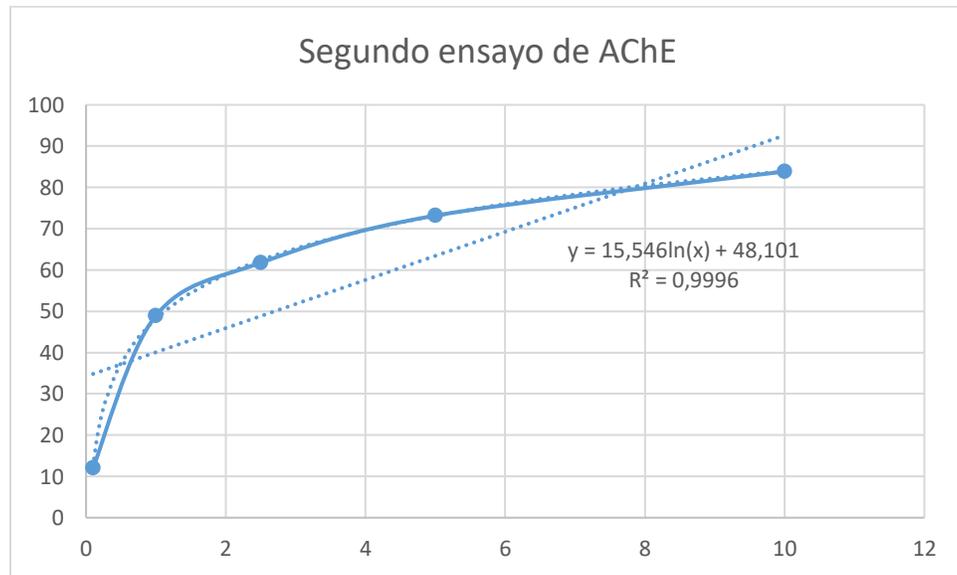


Gráfico FB.- Segundo ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal *P. cuencana*

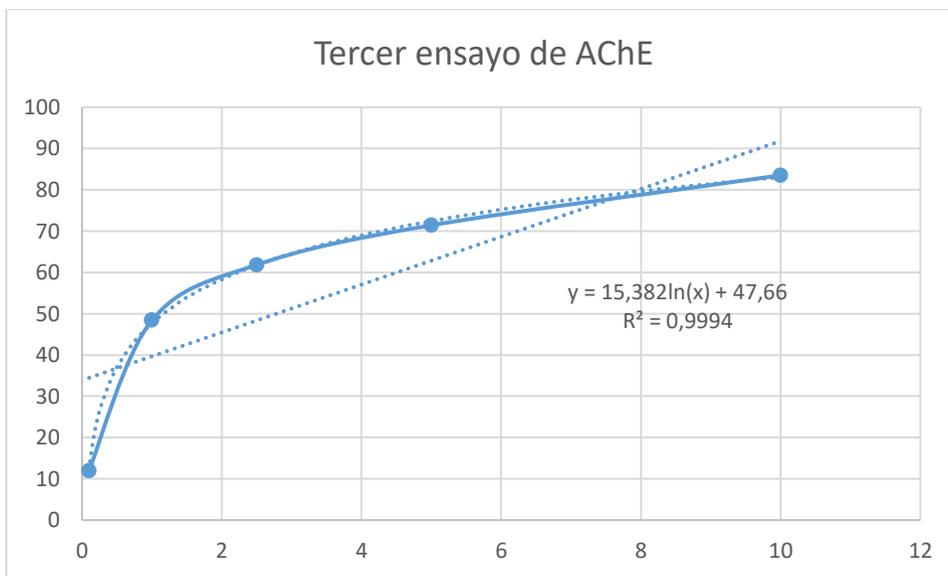


Gráfico FC.- Tercer ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal *Phaedranassa cuencana*.

ANEXO G.- Curvas de inhibición de BuChE de *P. cuencana*; derivadas para el cálculo del IC50. Se asocian los % de inhibición de BuChE vs. concentración del extracto alcaloidal (GGA, GGB, GGC)

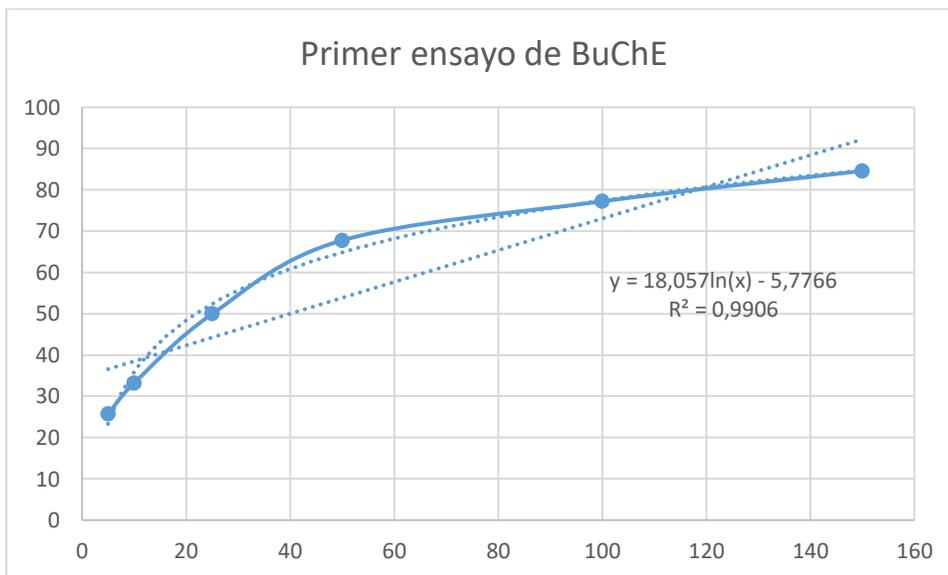


Gráfico GA.- Primer ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal *P. cuencana*

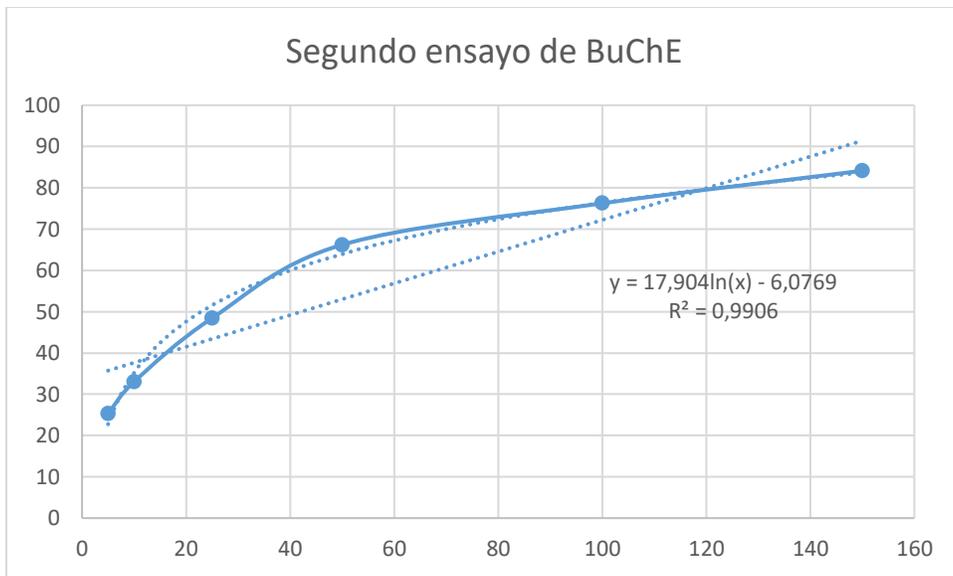


Gráfico GB.- Segundo ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal *P. cuencana*

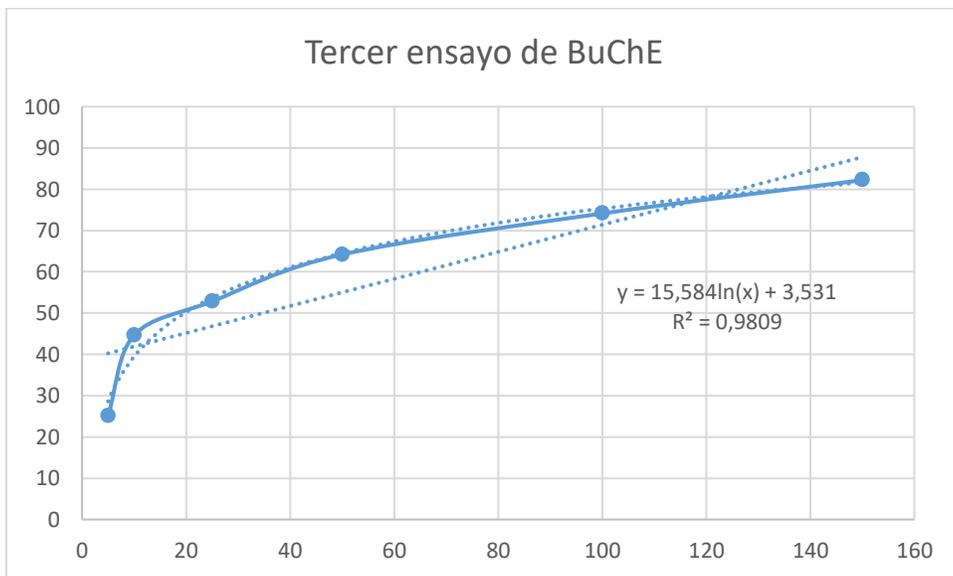


Gráfico GC.- Tercer ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal *P. cuencana*

ANEXO H.- Orden de movilización de vida silvestre de *P. cuencana*.



ORDEN DE MOVILIZACIÓN DE VIDA SILVESTRE

N. 142- DPA-MA-2018

Cuenca, 03 de Septiembre del 2018

El Ministerio del Ambiente, en base a las disposiciones emitidas por parte de la Lcda. María Victoria Chiriboga Nielsen VICEMINISTRA DEL AMBIENTE, SUBROGANTE mediante Memorando Nro. MAE-VMA-2018-0095-M, de fecha 18 de mayo de 2018, que entre otros aspectos manifiesta que mientras se de la etapa de transición de esta competencia a la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), el Ministerio del Ambiente continuará otorgando los permisos de colecta, guías de movilidad de recursos biológicos y demás permisos o autorizaciones relacionadas con manejo *ex situ* de recursos biológicos, por lo que, en base a esta disposición así como a las solicitudes de la Lcda Karen Lisseth Acosta León, Investigadora de la Escuela Politécnica del Chimborazo y Srta Tatiana Katherine Jaramillo Díaz, así como al Contrato Marco MAE-DNB-CM-2015-0054 se AUTORIZA la Movilización de las siguientes plantas y muestras:

Nombre común	Nombre científico	Familia	Número/cantidad de muestras
Indeterminado (Reino Vegetal)	<i>Phaedranassa cuencana</i>	Amarillydaceae	2 plantas enteras
Indeterminado (Reino Vegetal)	<i>Phaedranassa cuencana</i>	Amarillydaceae	Hojas y Flores (partes constitutivas).

DATOS PARA LA MOVILIZACIÓN:

FECHA DE LA MOVILIZACIÓN: Martes 4 de Septiembre del 2018 al 5 de septiembre del 2018.

MOTIVO DE LA MOVILIZACIÓN: investigación.

LUGAR DE LA MOVILIZACIÓN: desde el sector Padre Urco/cantón Cuenca, Provincia del Azuay hasta la Escuela Politécnica del Chimborazo, ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo (dos plantas enteras) y a la Universidad Tecnológica Indoamérica, ciudad de Quito, Provincia de Pichincha (hojas y flores).

TIPO DE TRANSPORTE A UTILIZAR: Terrestre, Cooperativa de Transportes Patria.

RESPONSABLE DE LA MOVILIZACIÓN: Srta Tatiana Katherine Jaramillo Díaz, CI N. 060386885-2



Ministerio del Ambiente

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DEL AZUAY
MINISTERIO DEL AMBIENTE DEL AZUAY

Atentamente

Ing. Rafael Ochoa A

ANEXO I.- Contrato Marco de acceso a los Recursos genéticos del Proyecto de Investigación Científica denominado "La Biodiversidad de Amaryllidaceae como fuente de Recursos Naturales para su explotación sostenible"

 SECRETARIA GENERAL
RECIBIDO 08 FEB 2017
REGISTRO 6039
FOLIO 333
 Ministerio del Ambiente

CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DENOMINADO: "LA BIODIVERSIDAD DE AMARYLLIDACEAE COMO FUENTE DE RECURSOS NATURALES PARA SU EXPLOTACIÓN SOSTENIBLE" CELEBRADO ENTRE EL ESTADO ECUATORIANO, A TRAVÉS DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE; Y, LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA

MAE – DNB – CM – 2015 – 0054

COMPARECIENTES:

A la suscripción del presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos comparecen, por una parte el Ministerio del Ambiente, a través de la Subsecretaría de Patrimonio Natural, legalmente representado por el Biólogo Francisco José Prieto Abuja, en su calidad de Subsecretario de Patrimonio Natural, delegado de la máxima autoridad conforme se desprende del Acuerdo Ministerial Nro. 024 de 09 de marzo de 2016, publicado en el Registro Oficial Nro. 725 de 04 de abril de 2016, a quien en adelante se le denominará "MAE"; y, por otra parte, la Universidad Tecnológica Indoamérica, debidamente representada por el Doctor Franklin Edmundo Tapia Defaz, en su calidad de Rector, conforme se desprende del Nombramiento de Autoridad Nro. 007-2015 de 15 de julio de 2015, certificado el 23 de diciembre de 2016 por el Doctor Pablo Suarez Secretario Procurador de la Universidad Tecnológica Indoamérica, que se agrega como documento habilitante y a quien en adelante se le denominará "UTI".

Las partes convienen en celebrar, el presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos respecto de la solicitud del proyecto de investigación científica denominado "La biodiversidad de Amaryllidaceae como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible", contenido y estipulado en las siguientes cláusulas:

PRIMERA. ANTECEDENTES.-

1. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 3, numeral 7 y 83, numerales 6 y 13 establece como deberes y responsabilidades del Estado y de sus habitantes el resguardo del patrimonio cultural y natural del país, así como también el respeto a los derechos de la naturaleza, la preservación de un ambiente sano y utilización de los recursos naturales de modo racional, sustentable y sostenible;
2. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 14, 74, 275, 276, 387, 388 reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*. Declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados. Además, establece como un requerimiento para el buen vivir, que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades gocen efectivamente de sus derechos, y ejerzan responsabilidades en el marco de la interculturalidad, del respeto a sus diversidades, y de la convivencia armónica con la naturaleza;
3. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 313 y 400 establecen que el Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad y el patrimonio genético, considerados sectores estratégicos, sobre los cuales el Estado se reserva el derecho de administrar, regular, controlar y gestionar de acuerdo a los principios de sostenibilidad ambiental, precaución, prevención y eficiencia;
4. La Constitución de la República del Ecuador, en el artículo 322 reconoce la propiedad intelectual de acuerdo con las condiciones que señale la ley, así como prohíbe toda forma de apropiación en el ámbito de las ciencias, tecnologías, saberes ancestrales y sobre los recursos genéticos que contienen la diversidad biológica y la agrobiodiversidad;
5. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 385, 386, 387 y 388, establece como una


SS / WR / RA / JR / ER / EN