



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA FRACCIÓN ALCALOIDAL DE *Crinum kunthianum* SOBRE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA”

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: GABRIELA BEATRIZ CANDO LARA

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

Riobamba –Ecuador

2019

© 2019, Gabriela Beatriz Cando Lara

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: Tipo Trabajo Experimental, “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA FRACCIÓN ALCALOIDAL DE *Crinum kunthianum* SOBRE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA”, de responsabilidad de la señorita Gabriela Beatriz Cando Lara, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Lic. Karen Acosta León M.Sc.



2019-06-25

DIRECTOR/A DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Dra. Susana Abdo M.Sc.



2019-06-25

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Gabriela Beatriz Cando Lara soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la tesis del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.



Gabriela Beatriz Cando Lara

Cédula de Identidad: 0604787689

DEDICATORIA

A Dios por darme la dicha de la vida, por nunca desampararme y siempre guiarme por el camino correcto para cumplir con parte de mis metas planteadas en compañía de las personas que amo.

A mis padres, Luis y Beatriz quienes han sido el mejor ejemplo de perseverancia, lucha, sacrificio y respeto. Por siempre brindarme amor y apoyo incondicional a través de este largo camino el cual hemos podido recorrer juntos.

Gabriela C.

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios y la Virgen Auxiliadora por guiar e iluminar mis pasos, por brindarme la vida y las personas que he encontrado a en este largo camino.

A mis padres que han sido un pilar fundamental y me han ayudado día a día a cumplir este sueño, gracias por haber confiado ciegamente en mí, gracias porque todo se lo debo a ustedes.

Agradezco infinitamente a mis hermanos, Fernando, Mayra y Henry que han estado presentes durante toda mi vida, en cada tropiezo y en cada alegría.

Un profundo agradecimiento a la Lcda. Karen Acosta, M.Sc., por haber encaminado este trabajo de titulación, colaborando siempre con su experiencia y sabiduría a resolver problemas, gracias también por haberme brindado su amistad y confianza a lo largo de la vida estudiantil.

Gracias a la Dra. Susana Abdo y al BQF. Diego Vinueza M.Sc., por ser parte importante de este trabajo de titulación ya que con un consejo o con sus conocimientos han sido de gran ayuda para superar este reto.

A mis primos, tíos y tías que con cada palabra y gesto han sido un gran apoyo para no quebrantarme ante las dificultades de la vida, por siempre haberme dado fuerzas y consejos para continuar adelante siendo cada día una mejor persona.

A mis amigos, quienes me enseñaron que no es el tiempo, sino cuánto realmente te conoce cada persona, gracias por haber compartido grandes experiencias llenas de dolor y alegría, porque a pesar de las caídas y la distancia nunca se derrumbó nuestra amistad y bastaba un abrazo fuerte para liberar todo el estrés de un día difícil.

Gabriela C.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ATC	Yoduro de acetiltiocolina
BIFRENES	Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
BuChE	Butirilcolinesterasa
BTC	Yoduro de butiriltiocolina
CAT	Colinacetiltransferasa
Ch	Colina
CG-EM	Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de masas
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
FDA	Administración de Droga y Alimentos (Siglas en inglés)
IC50	Concentración inhibitoria máxima media
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xvi
SUMMARY.....	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1.	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1.	Biodiversidad del Ecuador	5
1.2.	Familia Amaryllidaceas.....	5
1.2.1.	Amaryllidaceae en Ecuador	6
1.2.2.	Alcaloides de la familia Amaryllidaceae	7
1.2.3.	Importancia farmacológica de alcaloides de Amaryllidaceas	8
1.3.	Género <i>Crinum</i>	9
1.4.	<i>Crinum kunthianum</i>.....	10
1.5.	Enfermedad de Alzheimer	11
1.5.1.	Descripción	11
1.5.2.	Etapas y síntomas	12
1.5.3.	Factores de riesgo.....	12
1.5.4.	Diagnóstico	13
1.5.5.	Etiología de la enfermedad de Alzheimer.....	13
1.5.5.1.	Hipótesis colinérgica	14
1.5.5.2.	Hipótesis de la cascada amiloide.....	14
1.5.5.3.	Hipótesis viral	15
1.5.5.4.	Otras teorías	15

1.5.6.	Alteraciones neurobioquímicas	16
1.5.7.	Tratamiento.....	17
1.5.7.1.	Tratamiento no farmacológico	17
1.5.7.2.	Tratamiento farmacológico.....	17
1.5.8.	Galantamina	19
1.5.9.	Colinesterasas	20
1.5.9.1.	Acetilcolinesterasa	20
1.5.9.2.	Butirilcolinesterasa.....	21
1.6.	Extracción con disolventes	22
1.7.	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	22
1.7.1.	Cromatografía de gases (CG).....	22
1.7.2.	Espectrometría de masas (MS)	23
1.8.	Método de Ellman	24

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO.....	25
2.1.	Población de estudio	25
2.2.	Tamaño de la muestra	25
2.3.	Lugar de Investigación.....	25
2.4.	Equipos, Materiales y Reactivos	25
2.4.1.	Equipos	25
2.4.2.	Reactivos	26
2.4.3.	Materiales	27
2.5.	Recolección del material vegetal	29
2.6.	Identificación botánica	29

2.7.	Preparación del material vegetal	29
2.8.	Extracción de alcaloides	30
2.9.	Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)	30
2.10.	Preparación de muestras para los ensayos de inhibición enzimática de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa	31
2.10.1.	Preparación de soluciones.....	31
2.10.2.	Preparación de sustratos	32
2.10.3.	Enzimas	32
2.10.4.	Galantamina (compuesto de referencia)	32
2.10.5.	Muestra de alcaloides de <i>Crinum kunthianum</i>	33
2.10.5.1.	Dilución 1.....	33
2.10.5.2.	Dilución 2.....	33
2.11.	Ensayos de inhibición enzimática de AChE y BuChE	34
2.12.	Análisis de datos	35
2.13.	Curva de inhibición enzimática para calcular el IC50.....	35

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	36
3.1.	Extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i>	36
3.2.	Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	36
3.3.	Determinación de la actividad inhibitoria de AChE y BuChE	41
3.3.1.	Primera parte: Actividad inhibitoria enzimática del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> en dilución 1.....	41

3.3.1.1.	Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> sobre acetilcolinesterasa	41
3.3.1.2.	Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> sobre butirilcolinesterasa	44
3.3.2.	Segunda parte: Actividad inhibitoria enzimática del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> en dilución 2.....	46
3.3.2.1.	Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> sobre acetilcolinesterasa	46
3.3.2.2.	Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> sobre butirilcolinesterasa	48
3.3.3.	Tercera parte: Actividad inhibitoria enzimática del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> en dilución 3.....	49
3.3.3.1.	Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> sobre acetilcolinesterasa	49
3.3.3.2.	Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> sobre butirilcolinesterasa	51
3.3.4.	Cuarta parte: Análisis de las diferentes diluciones	52
3.3.4.1.	Acetilcolinesterasa	52
3.3.4.2.	Butirilcolinesterasa.....	54
CONCLUSIONES		56
RECOMENDACIONES.....		57
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Equipos empleados en los procedimientos.....	25
Tabla 2-2: Reactivos empleados en los procedimientos.....	26
Tabla 3-2: Materiales empleados en los procedimientos.....	27
Tabla 4-2: Concentraciones del compuesto de referencia (Galantamina) usadas en los ensayos de inhibición de AChE y BuChE respectivamente.....	32
Tabla 5-2: Concentraciones de <i>Crinum kunthianum</i> empleadas en los ensayos de inhibición para AChE y BuChE.....	33
Tabla 1-3: Rendimiento de alcaloides de <i>Crinum kunthianum</i> mediante extracción metanólica.....	36
Tabla 2-3: Alcaloides identificados mediante CG-EM del extracto puro de alcaloides del bulbo de <i>Crinum kunthianum</i>	37
Tabla 3-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> (Primer análisis).....	42
Tabla 4-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> (Segundo análisis).....	42
Tabla 5-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> en dilución 1 sobre la enzima AChE y su respectivo R^2	43
Tabla 6-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> (Primer análisis).....	44
Tabla 7-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> (Segundo análisis).....	45
Tabla 8-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> en dilución 1 sobre la enzima BuChE y su respectivo R^2	45
Tabla 9-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> , dilución 2.....	46

Tabla 10-3: Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de <i>Crinum kunthianum</i> en dilución 2 sobre la enzima AChE y su respectivo R ²	47
Tabla 11-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> , dilución 2.....	48
Tabla 12-3: Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de <i>Crinum kunthianum</i> en dilución 2 sobre la enzima BuChE y su respectivo R ²	49
Tabla 13-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> , dilución 3.....	50
Tabla 14-3: Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de <i>Crinum kunthianum</i> en dilución 3 sobre la enzima AChE y su respectivo R ²	50
Tabla 15-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>Crinum kunthianum</i> , dilución 3.....	51
Tabla 16-3: Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de <i>Crinum kunthianum</i> en dilución 3 sobre la enzima BuChE y su respectivo R ²	52
Tabla 17-3: Resultados de las tres diferentes diluciones analizadas para acetilcolinesterasa.....	53
Tabla 18-3: Resultados de las tres diferentes diluciones analizadas para butirilcolinesterasa.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Distribución de la Familia Amaryllidaceae en el mundo.....	6
Figura 2-1: Estructuras de los Alcaloides de Amaryllidaceae.....	8
Figura 3-1: Distribución Geográfica de <i>Crinum kunthianum</i> , Nativa desde América Central hasta el Ecuador.....	10
Figura 4-1: <i>Crinum kunthianum</i> , a la orilla del río Guayas.....	11
Figura 5-1: Sinapsis colinérgica.....	21
Figura 6-1: Principio del método Ellman.....	24
Figura 1-3: Alcaloides identificados en el extracto alcaloidal de bulbos de <i>Crinum kunthianum</i> ...	38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Abundancia de alcaloides del extracto purificado del bulbo de <i>Crinum kunthianum</i> ($\mu\text{g gal}/100\text{mg}$).....	37
--	----

RESUMEN

Crinum kunthianum es una especie endémica del Ecuador, perteneciente a la familia Amaryllidaceae la cual se caracteriza por producir alcaloides, de importancia para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer. El presente trabajo de titulación tiene como objetivo determinar la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de bulbos de *Crinum kunthianum* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa. Los alcaloides de esta especie se obtuvieron a través de un protocolo de cambios de pH y uso de solventes orgánicos obteniendo un rendimiento total de alcaloides del 1.899%. Se identificaron los alcaloides presentes en el extracto purificado mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. La determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa se realizó mediante un método colorimétrico, usando galantamina como compuesto de referencia, calculando la concentración inhibitoria 50 (IC50). Se identificaron 11 alcaloides en total, siendo bowdensina el más abundante con 63.0587 ($\mu\text{g gal}/100\text{mg PS}$), seguido de licorina con 35.3075 ($\mu\text{g gal}/100\text{mg PS}$) y en menor abundancia se encuentra los alcaloides anhidrolicorina, 1-O-acetillicorina y 2-O-acetillicorina. La actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* sobre la enzima acetilcolinesterasa se evaluó variando la concentración del cosolvente, siendo el mejor resultado la dilución 2 con cosolvente B dando un IC50 de 44.26 ± 0.64 en comparación al IC50 de 0.49 ± 0.20 correspondiente al compuesto de referencia galantamina. En cuanto a la actividad inhibitoria sobre butirilcolinesterasa se observó que en la dilución 3 del cosolvente B se obtuvo un IC50 de 39.14 ± 2.03 , mientras que galantamina dio un resultado de IC50 de 15.36 ± 0.98 . La actividad inhibitoria de *Crinum kunthianum* sobre ambas enzimas se consideran altas aunque la actividad de galantamina es mayor. Se recomienda realizar más estudios sobre *Crinum kunthianum*, ya que presenta algunos metabolitos de interés farmacológico y existe muy poca información sobre esta especie.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <AMARYLLIDACEAE>, <*Crinum kunthianum*>, <ALCALOIDES>, <ACTIVIDAD INHIBITORIA>, <COLINESTERASAS>

SUMMARY

Crinum kunthianum is an endemic species of Ecuador, belonging to the family, Amaryllidaceae, which is characterized by alkaloids, the importance of the treatment of Alzheimer's disease. The objective of the present titration work is to determine the inhibitory activity of the alkaloidal extract of *Crinum kunthianum* bulbs on the enzymes acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. The alkaloidal of this species were obtained through a protocol of pH changes and the use of organic solvents, obtaining a total alkaloid yield of 1,899 %. Identification of the alkaloids present in the purified extract by gas chromatography coupled to Mass Spectrometry. The determination of the inhibitory activity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase was carried out by means of a colorimetric method, using galantamine as the reference compound, calculating the inhibitory concentration 50 (IC₅₀). A total of 11 alkaloids were identified, bowdensin being the most abundant with 63.0587 (µg gal / 100mg DW), followed by liquorine with 35.3075 (µg gal / 100mg DW) and in less cases the anhydrolicorin alkaloids are found, 1-0 -acetylcollin and 2-0-acetylcollin. The inhibitory activity of the alkaline extract of *Crinum kunthianum* on the acetylcholinesterase enzyme was evaluated by varying the concentration of the cosolvent, the best result being dilution with dilution 2 of cosolvent B whose IC₅₀ was 44.26 ± 0.64, compared to IC₅₀ 0.49 ± 0.20 corresponding to the galantamine reference compound. Regarding the inhibitory activity on butyrylcholinesterase it is said that in the dilution with dilution 3 of cosolvent B an IC₅₀ of 39.14 ± 2.03 was obtained, while galantamine gave an IC₅₀ result of 15.36 ± 0.98. The inhibitory activity of the primary science on the enzymes is considered high although the activity of galantamine is higher. It is recommended to carry out more studies on *Crinum kunthianum*, since it has some metabolites of pharmacological interest and there is very little information about this species.

Key words: <BIOCHEMISTRY>, <AMARYLLIDACEAE>, <*Crinum kunthianum*>, <ALKALOIDS>, <ACTIVITY INHIBITORY>, <COLINESTERASAS>, <ALZHEIMER>



INTRODUCCIÓN

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa, conocida por ser la forma más común de demencia, caracterizada por una lenta y progresiva pérdida de las funciones cerebrales y déficits cognitivos como el deterioro de la memoria y el pensamiento, afectando así la calidad de vida en los adultos mayores (Garzón et al., 2018).

Las personas que padecen esta patología pierden constantemente acetilcolina, cuya función principal es la comunicación entre células nerviosas para la realización de actividades mentales como el aprendizaje, la memoria, el pensamiento, entre otras (Sánchez et al., 2016: pp.9-10).

Según informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en la actualidad existen alrededor de 50 millones de personas afectadas por esta patología, con un incremento de nuevos casos cada 3.2 segundos y se estima que para el año 2050 cerca de 131,5 millones de personas mayores a 65 años padecerán de la enfermedad de Alzheimer (EA) (OMS y OPS, 2013).

En Ecuador se estima que aproximadamente 59 mil personas padecen de Alzheimer y otras demencias relacionadas, en su mayoría afecta a personas de la tercera edad y población que presenta ingresos económicos medios y bajos, por lo que se ha considerado un problema de salud pública (La Hora, 2017).

El costo económico que conlleva el tratamiento es elevado, debido a que no tiene cura, lo que se espera es controlar y ralentizar los síntomas y signos como: el deterioro de la memoria, intelecto, comportamiento y la capacidad de realizar las actividades cotidianas; con el fin de que el paciente pueda llevar un estilo de vida adecuado y no tenga que depender en su totalidad de otras personas (Sánchez et al., 2016).

Para el gobierno de los Estados Unidos el Alzheimer se ha convertido en una prioridad de Salud Pública, al ser una enfermedad que no tiene cura es necesario que se desarrollen nuevas estrategias para controlar los síntomas, así como para prevenir dicha patología desde los inicios de la vida (Alzheimer's Association, 2015).

Una de las estrategias para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer es el uso de inhibidores de acetilcolinesterasa como lo es la galantamina, metabolito que aprobó la FDA en el 2001 para el tratamiento paliativo en estadio temprano (Marcet, 2015, p.3).

Las estrategias de mejora colinérgica han estado a la vanguardia de los esfuerzos para paliar farmacológicamente los síntomas cognitivos (Orhan y Sener, 2005: p. 3). Galantamina es un alcaloide que fue aislado por primera vez de especies del género *Galanthus* perteneciente a la familia Amaryllidaceae, es muy conocido por ser inhibidor potente y reversible de acetilcolinesterasa en el tratamiento de la Enfermedad del Alzheimer (Marcet, 2015, p.2).

En estudios realizados, se ha indicado que la galantamina extraída de las especies de Amaryllidaceae estudiadas es de aproximadamente 250 kg al año, esta cantidad no es suficiente, ya que se ha observado que las cifras de la enfermedad se duplica año tras año (Marcet, 2015, p.3). Ante esta problemática se ve la necesidad de encontrar otras fuentes de galantamina y/o investigar otras estrategias para el tratamiento del Alzheimer.

La mayor cantidad de especies de Amaryllidaceae se encuentran al Sur de África, muchas de las cuales son usadas en las prácticas medicinales tradicionales de los pueblos indígenas de la región, gracias a su valor terapéutico-económico y su abundancia natural. Esta familia ofrece una plataforma diversa y accesible para el descubrimiento de fármacos basados en fitoquímicos (Nair et al., 2013: p.1).

Se han realizado distintos estudios sobre la familia Amaryllidaceae dando como resultado actividades farmacológicas variadas, dependiendo del género de estudio. El género *Crinum* presenta actividad como tónicos o laxantes, usándose en enfermedades pectorales, reumatismo e incluso hemorroides. Especies del género *Eucrosia* se usa en el tratamiento de patologías cardíacas y se emplea para afecciones de la piel como picadura de mosquitos o mordedura de serpientes, por otro lado, *Caliphuria* se usa en forma de emplasto para afecciones de faringe y laringe (Cabezas et al., 2007: pp. 237-239).

El primer alcaloide de Amaryllidaceae aislado fue licorina a partir de *Narcissus pseudonarcissus* por Gerrad en 1874, desde entonces se han realizado múltiples estudios observando un mayor interés sobre el análisis del contenido alcaloidal por su amplia utilización farmacológica. Los principales alcaloides aislados de Amaryllidaceae son la galantamina, licorina y tazetina que presentan una amplia actividad inhibitoria sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa (Cabezas et al., 2013).

En cuanto a estudios sobre la inhibición de acetilcolinesterasa, se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre plantas, metabolitos vegetales o a partir de organismos marinos, los cuales han dado resultados favorecedores sobre la actividad inhibitoria y han sido destinados a más

estudios para posteriormente ser empleados en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Castellanos, 2014: p. 3).

Al saber que múltiples especies de la familia Amaryllidaceae presentan alcaloides que tienen actividad inhibitoria sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa es importante realizar estudios sobre otras especies de esta familia (Carretero, 2003, pp.1-3).

En cuanto a la especie *Crinum kunthianum* se han realizado muy pocos estudios, uno de ellos y el más representativo es el aislamiento e identificación de alcaloides de esta especie, localizada en Colombia, con la presencia de alcaloides como: hippadina, trisferidina, pratorimina, pratorinina, licorina, crinamidina, bufanidrina, undulatina, hamayna, 1-epideacetilbowdensina y powellina (Cabezas et al., 2007: pp. 237-239). Es necesario realizar estudios de esta especie recolectados en distinta distribución geográfica ya que la calidad de sus metabolitos depende de factores como la fotosíntesis, asimilación de nutrientes, polinización, entre otros.

Es por ello que este trabajo tiene como objetivo determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en el extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* (Amaryllidaceae).

Dentro del contexto, esta investigación forma parte del proyecto “LA BIODIVERSIDAD IBEROAMERICANA COMO FUENTE DE RECURSOS NATURALES PARA SU EXPLOTACIÓN SOSTENIBLE (BIFRENES)”, el cual tiene como objetivo establecer bases para el aprovechamiento de los recursos naturales en busca de principios activos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, y a la vez promover una participación justa y equitativa de las comunidades campesinas e indígenas en los beneficios derivados del desarrollo de este proyecto (CYTED, 2016).

Además, a largo término este trabajo contribuye con el objetivo 1 del Plan Toda una Vida, que indica que el Estado debe garantizar una vida digna con iguales oportunidades para todas las personas, con el fin de que cumplan sus propósitos a lo largo de la vida (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, 2017: pp. 53-55).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de *Crinum kunthianum* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el extracto bruto de alcaloides a partir de bulbos secos de la especie *Crinum kunthianum*, mediante un protocolo basado en cambios de pH y uso de solventes orgánicos.
- Identificar los alcaloides presentes en el extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* obtenido mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.
- Evaluar la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides totales de *Crinum kunthianum* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa mediante un método colorimétrico, usando como compuesto de referencia galantamina.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Biodiversidad del Ecuador

Ecuador se encuentra dentro de los 17 países megadiversos del mundo, a pesar de ser un país con territorio reducido alberga alrededor del 75% de todos los animales y plantas del planeta (ForosEcuador, 2018).

Su gran biodiversidad se debe a la combinación de múltiples factores como: su ubicación geográfica, la presencia de la cordillera de los andes, la influencia de la cuenca amazónica y corrientes marinas del océano pacífico, así como la cantidad de sol y oscuridad apropiada que recibe el país al estar justo en el centro del planeta, por todas estas razones nos ofrece un lugar mágico con gran variedad de climas para la concentración de la vida (ForosEcuador, 2018).

El Ecuador posee alrededor de 46 ecosistemas que incluyen la sierra, los páramos, los bosques tropicales, selvas y desiertos, los cuales albergan y dan vida a un sin número de especies animales y vegetales, muchas de estas son únicas en el mundo (Tardioli, 2017).

En Ecuador se han declarado seis reservas de la biosfera, entre ellas se encuentran: Galápagos, Yasuní, Sumaco, Podocarpus, El Cóndor, Macizo de Cajas y Bosque Seco, estos lugares garantizan la supervivencia de todas las especies animales y vegetales que habitan en estas zonas, protegiendo así su biodiversidad y la perpetuación de las especies (ForosEcuador, 2018).

La gran diversidad de flora ecuatoriana ha sido reconocida y estudiada desde hace mucho tiempo, esto se ve plasmado en el Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador, donde se encuentran aproximadamente 17000 especies de plantas que han sido analizadas a través de los años, pero aún existen otras que no han sido estudiadas en su totalidad (Balslev et al., 2008: pp. 16-18).

1.2. Familia Amaryllidaceas

La familia Amaryllidaceae pertenece a las plantas monocotiledóneas dentro de la orden Asparagales, es una hierba perenne no trepadora con bulbos cubiertos por catáfilas, sus hojas están

basalmente dispuestas, generalmente aplanadas, dorsiventrales y lineales, sus flores son muy llamativas y cuenta con dos o tres pétalos de color amarillo, blanco, rosado, púrpura o rojo (López y Espejo, 2002: p.1-2).

Esta familia está compuesta de aproximadamente 73 géneros y más de 1600 especies distribuidas extensamente (Figura 1) en las zonas trópicas, tienen un importante crecimiento al Sur de África, en menor escala en los Andes de América del Sur y otras especies se encuentran en el mediterráneo (UNNE, 2010, pp: 89-91).



Figura 1-1: Distribución de la Familia Amaryllidaceae en el mundo

Fuente: Stevens, 2001, p. 1

Entre los géneros más importantes dentro de esta familia se encuentran: *Crinum* con 130 especies, *Hippeastrum* con 70 especies, *Zephyranthes* con 60 especies, *Hymenocallis* con 50 especies y el género *Cyrtanthus* con 50 especies, bien distribuidas en las zonas antes mencionadas (Bonifacino, 2017).

Las plantas de la familia Amaryllidaceae se caracterizan por sintetizar galantamina, un tipo particular de alcaloide que ha demostrado tener amplio espectro de actividad biológica, además de su potencial quimiotaxonómico, esta familia es la única productora de dicho alcaloide usado como potente inhibidor de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa siendo de gran importancia en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Marcet, 2015, p.3).

1.2.1. Amaryllidaceae en Ecuador

En el Ecuador están presentes 36 especies de la familia Amaryllidaceae, distribuidas entre 0 y 4000m de altitud, 12 especies son consideradas endémicas y corresponden a los géneros de *Phaedranassa* y *Eucrosia*, las mismas se encuentran en peligro de extinción. Las especies de esta

familia son consideradas plantas ornamentales y su correlación con este fin podría causar un gran impacto en el interés de conservar dicha familia (León et al., 2012: p. 87).

La población varía constantemente según su género, al presentar el país una geografía y clima muy variado es normal que las plantas sean diferentes en cuanto a género y especie a pesar de que se encuentren a menos de un Km de distancia entre sí (León et al., 2012: p. 87).

1.2.2. Alcaloides de la familia Amaryllidaceae

Amaryllidaceae se divide en tres subfamilias; la Alilóideas, Amarillidóideas y Agapantóideas de las cuales solo se han encontrado alcaloides de interés farmacológico en la subfamilia Amaryllidóidea (Rafaat et al., 2012: p. 1884).

La mayor parte de investigaciones sobre alcaloides se llevó a cabo en los años sesenta y principio de los setenta, siendo licorina el primer alcaloide aislado desde *Narcissus pseudonarcissus* en 1874 (Cabezas et al., 2013: pp. 1-2).

Por la presencia de alcaloides se han estudiado más de 200 especies de la familia Amaryllidaceae, los cuales presentan un amplio rango de actividad biológica, como son: analgésicos, antimaláricos, antimicrobianos, citotóxicos, anticonvulsivos, hipotensivos, antiinflamatorios, antivirales, antitumorales, protozoicidas, expectorantes, estimulantes respiratorios, insecticidas, antimitóticos, inhibidores enzimáticos, entre otros (Cabezas et al., 2013: pp. 1-2).

Estos alcaloides presentan características similares entre sí, como: un anillo compuesto de C1 a C6 y otro de -N-C2-C6 como bloque estructural, derivado biogénicamente de los aminoácidos L-Tirosina y L-Fenilalanina, su pka varía entre 6 y 9 lo que le da características de basicidad. Cada alcaloide contiene un solo átomo de nitrógeno el cual puede ser secundario, terciario o cuaternario y el número de carbonos se encuentra entre 16 y 20 átomos (Bastidas et al., 2011: pp. 65-66).

En la actualidad se han aislado más de 300 alcaloides de amaryllidaceas y aunque sus estructuras varían considerablemente sus alcaloides se consideran relacionados biogénicamente y se pueden clasificar en nueve tipos de esqueletos, como se observa en la figura 2: norbeladina, licorina, homolicorina, crinina, hemantamina, narciclasina, tazetina, montanina y galantamina (Bastidas et al., 2011: pp. 65-66).

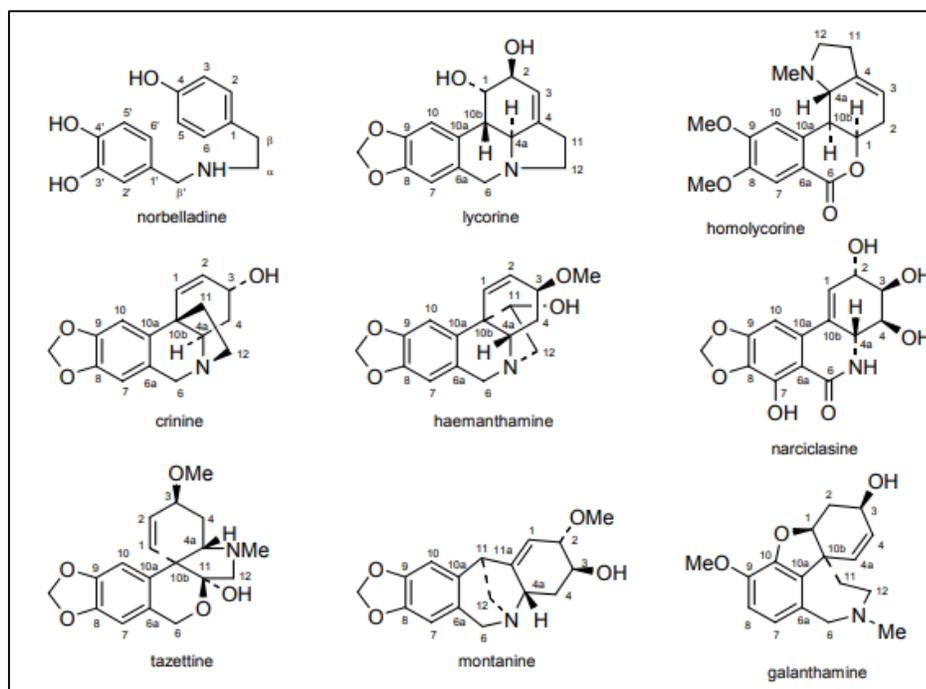


Figura 2-1: Estructuras de los Alcaloides de Amaryllidaceae

Fuente: Bastidas et al., 2011: pp. 65-66

A pesar de la gran variedad de propiedades farmacológicas y biológicas, galantamina es el alcaloide más usado terapéuticamente en enfermedades como el Alzheimer.

1.2.3. *Importancia farmacológica de alcaloides de Amaryllidaceae*

Atraves de los años y a medida que las investigaciones han ido avanzando, se han realizado múltiples análisis en plantas, con el fin de encontrar nuevas fuentes de principios activos para solucionar problemas de salud, ya que cada vez las enfermedades van progresando y los medicamentos existentes van perdiendo la batalla ante muchas patologías (Bergoñon, 1994, pp.160-163).

Desde la antigüedad la familia Amaryllidaceae adjunta un gran número de aplicaciones médicas, esto se dio a conocer por las investigaciones que se han realizado sobre los alcaloides aislados y extractos purificados de esta familia. A continuación, se muestran las acciones farmacológicas más importantes (Bergoñon, 1994: pp.160-163):

- Acetilcaranina.- Antineoplásica sobre la leucemia linfocítica murínica P-388.
- Crinamina.- Antineoplásica moderada sobre la leucemia de Rauscher
- Crinasiadina.- Bacteriostática

- Galantamina.- Anticolinesterásico a nivel periférico de menor potencial, incremento del poder aeróbico del atleta, terapia antialzheimer: especificidad por acetilcolinesterasa central.
- Hemantamina.- Antineoplásica moderada sobre la leucemia de Rauscher
- Hipeastrina,. Antivírica potente sobre Herpes simplex
- Licorenina.- Antiprotozoaria
- Licorina.- Antineoplásica, Antivírica, Antiprotozoaria
- Pretazetina.- Antineoplásica, Antivírica.
- Ungeremina.- Antineoplásica, antibacteriana.

1.3. Género *Crinum*

La familia Amaryllidaceae comprende un gran número de plantas monocotiledóneas en la que se destaca el género *Crinum*, su nombre proviene del griego “*Krinon*” lo que significa “Lirio blanco” el cual fue descrito por primera vez a mediados del siglo XVIII por Linnaeus (Refaat et al., 2012: p. 1883).

Crinum son plantas herbáceas perennes que se encuentra distribuido en las regiones tropicales, subtropicales y templadas cálidas de Asia, Australia, África y América. También se le conoce como lirio de playa (Pacific Bulb Society, 2016).

En cuanto a sus características, este género presenta hojas anchas y carnosas en forma de cinta que surgen del bulbo y forman el tallo, puede llegar a medir de 1 a 5 pies de altura dependiendo de la especie, las flores generalmente aparecen en mayo, junio o agosto (Refaat et al., 2012a: p. 1883).

En todo el mundo *Crinum* tiene un gran valor ornamental por sus flores muy llamativas. Sin embargo, algunos bulbos se emplean como antitumoral, inmunoestimulante, analgésico, antiviral, antimalárico, antibacteriana y antifúngica (Refaat et al., 2012a: p. 1883).

El género *Crinum* consta con más de 100 especies conocidas, a continuación se muestran algunas de ellas según la descripción de Dimitri (1987): *Crinum africanum*, *Crinum amabile*, *Crinum americanum*, *Crinum ammocharoides*, *Crinum asiaticum*, *Crinum bulbispermum*, *Crinum buphanoides*, *Crinum congolense*, *Crinum giganteum*, *Crinum jagus*, *Crinum kirkii*, *Crinum macowanii*, *Crinum moorei*, *Crinum podophyllum*, *Crinum powellii*, *Crinum purpurascens*, *Crinum speciosum*, *Crinum zeylanicum*, *Crinum commelini*, *Crinum crassipes*, *Crinum crispum*, *Crinum*

dariensis, *Crinum erubescens*, *Crinum graminicola*, *Crinum heterostyla*, *Crinum longifolium*, *Crinum pedunculatum*, *Crinum sanderianum*, *Crinum scabrum*, *Crinum urceolatum*.

Durante los últimos diez años en género *Crinum* se han realizado múltiples investigaciones de las cuales se ha logrado aislar e identificar aproximadamente 180 alcaloides, alrededor de 120 pertenecen a las bases de crinina y licorina, y entre los alcaloides menos comunes se encuentran belladina, galantamina, licorenina, narciclasina, entre otros (Rafaat et al., 2012c: p. 3630).

1.4. *Crinum kunthianum*

Según la organización Tropicos, *Crinum kunthianum* es una hierba bulbosa con 80 cm de altura, presenta flores blancas con estambres morados. Se encuentra distribuido desde América Central hasta el Ecuador (Figura 3), específicamente está ubicada en la región costera de las provincias de Guayas y Los Ríos.

Crinum kunthianum se ha considerado una de las especies más frecuentes en la región costera del Ecuador, según un estudio realizado en la Isla Santay ubicada en el río Guayas, se considera que esta especie es nativa del país (Herrera, et al., 2018: pp. 19-22).

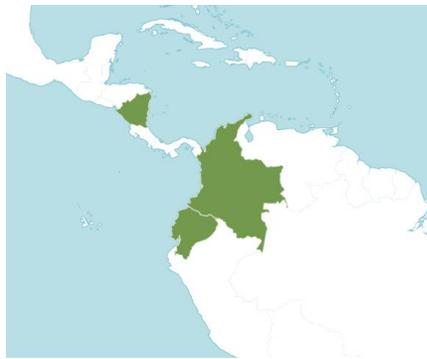


Figura 3-1: Distribución Geográfica de *Crinum kunthianum*,
Nativa desde América Central hasta el Ecuador

Fuente: Plants of the World online, 2017

Según Magill et al., (2016) el taxón de *Crinum kunthianum* se identifica de la siguiente forma:

- Reino: plantae
- Filo: Tracheophyta
- Clase: Liliopsida
- Orden: Asparagales

- Familia: Amaryllidaceae
- Género: *Crinum*
- Epíteto específico: *kunthianum*
- Clasificación más alta: Plantae, Monocotyledonae, Liliales, Amaryllidaceae
- Nombre científico: *Crinum kunthianum*

Las investigaciones sobre esta especie son escasas. En junio de 1997 se realizó un estudio en Colombia (Pompeya) donde se aislaron alcaloides de las hojas de *Crinum kunthianum*, recolectadas en su período de floración. Se registraron 4 estructuras diferentes que fueron de tipo licoquina, narciclasina, crinina y haemanthamina (Cabezas et al., 2007: p. 238).



Figura 4-1: *Crinum kunthianum*, a la orilla del río Guayas

Realizado por: Gabriela Cando, 2018

1.5. Enfermedad de Alzheimer

1.5.1. Descripción

El Alzheimer es un complejo proceso neurodegenerativo con múltiples etiologías, caracterizada por una lenta y progresiva pérdida de las funciones cerebrales superiores, ocasionada por la presencia de placas seniles en la corteza cerebral, degeneración neurofibrilar, pérdida de sinapsis y muerte neuronal, y una acumulación de péptidos B-amiloide (Garzón et al., 2018).

El Alzheimer se constituye en una de las enfermedades más frecuentes y graves padecidas en la vejez, representando del 50 al 70% de casos, dado que está relacionada con el envejecimiento progresivo de la población (González, 2005: pp. 2-3). Aproximadamente afecta al 10% de individuos que tienen de 65 años en adelante (Garzón et al., 2018).

Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (1994), esta enfermedad constituye múltiples déficits cognitivos como el deterioro de la memoria y el pensamiento, afectando actividades personales y cotidianas, con evolución lenta (González, 2005, p. 3).

El primer estudio conocido sobre la enfermedad de Alzheimer se llevó a cabo en una mujer de 51 años de edad por Alois Alzheimer en 1906, en la cual observó que las facultades mentales se fueron deteriorando progresivamente, al morir la paciente se le realizó la autopsia cerebral en la que se reveló la degeneración de las terminaciones nerviosas en la corteza del cerebro y un haz enmarañado de fibrillas (Feria, 2005, pp. 7-8).

Las personas que padece esta patología pierden constantemente acetilcolina, cuya función principal es la comunicación entre células nerviosas que participan en la realización de actividades mentales como el aprendizaje, la memoria, el pensamiento, entre otras (Sánchez et al., 2016: pp.9-10).

1.5.2. Etapas y síntomas

La enfermedad de Alzheimer avanza lenta y progresivamente en tres etapas, pero cada persona experimenta síntomas y signos de forma distinta (Alzheimer's Association, 2018).

Etapa temprana: la persona aún puede participar en actividades sociales regulares, a su vez experimentan periodos de pérdida de memoria, olvido de palabras o la posición de ciertos objetos (Alzheimer's Association, 2018).

Etapa moderada: es la etapa más prolongada de la enfermedad, empiezan a olvidar y confundir palabras, actúan de forma inesperada, incluso ya se observa dificultad en la realización de actividades cotidianas y en la expresión de ideas (Alzheimer's Association, 2018).

Etapa final: a medida que la memoria y las actividades cognitivas van empeorando se pierde la aptitud de responder a su entorno y controlar sus movimientos, además esta etapa es la más grave, por ello es necesaria la ayuda de personas para la realización de las actividades diarias (Alzheimer's Association, 2018).

1.5.3. Factores de riesgo

- Herencia familiar: El 40 % de pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer presentan antecedentes familiares, generalmente aparece antes de los 60 años.

- Medioambientales: una dieta rica en grasa y el tabaquismo favorece la aparición de la enfermedad.
- Factor genético: asociado a tres loci genéticos: proteína precursora amiloide, presenilina-1 y presenilina-2 (Garzón, et al., 2018).
- Sexo: presenta una ligera prevalencia en mujeres, esto se puede dar por el desequilibrio hormonal que se atraviesan en el proceso de menopausia.
- Edad: es el principal factor de riesgo de la enfermedad, generalmente se observa en personas de la tercera edad, aun pudiéndose observar síntomas en personas más jóvenes (Sánchez et al., 2016: p. 10).

1.5.4. Diagnóstico

La enfermedad de Alzheimer puede diagnosticarse hasta con un 90 % de certeza, con la gama de análisis clínicos y pruebas de cognición disponibles, pero el diagnóstico más certero se realiza con estudios post-mórtem del cerebro del paciente (Acosta et al., 2012: p. 83).

El diagnóstico se basa en analizar la patología de forma macroscópica, observando la anatomía del cerebro que en general presenta atrofia cerebral simétrica y difusa, con un aumento de la profundidad de los surcos, dilatación del ventrículo y reducción del peso y volumen cerebral y se ven afectaciones principalmente en el hipocampo, área transentorrinal, corteza entorrinal y lóbulos temporales y frontales (Acosta et al., 2012: pp. 83-84).

En los estudios post-mortem se observa a nivel microscópico la presencia de lesiones en el tejido cerebral con formaciones de ovillos neurofibrilares, neuritas distróficas y placas neuríticas (Acosta et al., 2012: p. 84).

1.5.5. Etiología de la enfermedad de Alzheimer

El origen y causa de la enfermedad no es conocida a ciencia cierta, sin embargo, tras investigaciones realizadas en los últimos 20 años se ha determinado que la aparición de placas seniles y ovillos neurofibrilares son consecuencia de la muerte neuronal progresiva (Martínez, 2009, p. 25).

El Alzheimer es responsable de casi el 80% de casos de demencia, el promedio de vida desde que aparecen los indicios de la enfermedad es de 8 años, pero existen pacientes que pueden vivir hasta 20 años más, dependiendo de la edad y el tratamiento que reciba (Alzheimer's Association, 2018).

Existen algunas investigaciones que explican la causa de esta enfermedad, dentro de estas tenemos las siguientes hipótesis:

1.5.5.1. Hipótesis colinérgica

Es la más antigua de las hipótesis, en la que indica que el descenso descontrolado de acetilcolina en distintas áreas cerebrales, la corteza e hipocampo, es la causa principal del desarrollo de Alzheimer, como consecuencia se identifica la pérdida de neuronas y receptores colinérgicos, cambios en la estructura y cantidad de colinesterasa y una menor actividad de los receptores colinérgicos (Domínguez et al., 2018: p. 29).

La acetilcolina interactúa con receptores nicotínicos y muscarínicos para regular la liberación de neurotransmisores, es por ello que los agonistas nicotínicos mejoran los síntomas y signos de la enfermedad de Alzheimer (Soler y Jordán, 2011: pp. 5-8).

Los receptores muscarínicos del lóbulo temporal participan en la memoria y el aprendizaje tras impulsos repetidos que consolidan información para la memoria a corto plazo y facilita su codificación en la memoria a largo plazo (Soler y Jordán, 2011: pp. 5-8).

La hipótesis colinérgica apunta a una síntesis reducida de acetilcolina produciendo así neuroinflamación masiva, creando resistencia a los medicamentos que tratan la deficiencia colinérgica (Domínguez et al., 2018: p. 29).

1.5.5.2. Hipótesis de la cascada amiloide

El desequilibrio entre la producción y el aclaramiento del beta-amiloide lleva a la neurodegeneración y la demencia típica de la enfermedad de Alzheimer, esta hipótesis ha sido estudiada por muchos experimentos en distintos laboratorios (Soler y Jordan, 2011: p.10).

La alteración en el cromosoma 21 es responsable de la aparición del Alzheimer, a su vez la estimulación del beta-amiloide en la histopatología de la enfermedad sugirió la mutación de un gen que codifica la síntesis de proteína precursora del beta-amiloide (Asili, 2006: p. 69).

Se conoce que otros dos cromosomas pueden estar alterados: el cromosoma 14 que se involucra en la producción temprana del Alzheimer, y el cromosoma 19 que está implicado en la aparición tardía de la enfermedad. Se ha observado también que en ciertos pacientes ninguno de estos tres

cromosomas se encuentra involucrado, por ello que se cree que deben existir otros cromosomas que se encuentren afectados (Asili, 2006: p. 69).

La hipótesis establece que la progresión de la enfermedad de Alzheimer se da por el aumento de la concentración de la proteína beta- amiloide hasta niveles tóxicos, esta es causada por la desorganización de los mecanismos de regulación controlados por distintos genes, ocasionando así lesión y muerte celular, lo que produce mayor acumulación de beta-amiloide, formando un círculo vicioso de degeneración (Asili, 2006: pp. 69-70).

1.5.5.3. Hipótesis viral

Desde 1980 se han realizado múltiples estudios que asocian el Alzheimer a bacterias y virus, recientemente se ha establecido, que el virus del herpes simple tipo 1 es un factor importante para la aparición de la enfermedad (Itzhaki, 2018, p.2).

Se cree que el virus de herpes simple llega al cerebro aprovechándose de la debilidad inmunológica y establece una infección latente donde se activan los factores de estrés, la supresión inmunológica o varias infecciones, formando placas de proteínas, halladas en los cerebros de pacientes con Alzheimer (Itzhaki, 2018, p.2).

En otras investigaciones se ha probado que el gen que utiliza el virus del herpes simple para eludir la vigilancia del sistema inmune es el TAP2, el cual presenta un riesgo de padecer Alzheimer. Así mismo, se ha probado que la proteína PKR (proteína quinasa R) frecuente en cerebros de enfermos de Alzheimer es activada por el virus de herpes labial (Martínez, 2009, pp.39-40).

Los estudios realizados no prueban específicamente que el virus cause la aparición o progresión del Alzheimer.

1.5.5.4. Otras teorías

Se han realizado nuevos estudios sobre la influencia de los procesos oxidativos en el cerebro, así como que los oxidantes pueden brindar efectos neuroprotectores, también se ha estudiado el efecto de la inflamación neuronal y el uso de antiinflamatorios en la enfermedad del Alzheimer (Martínez, 2009, p.40).

Ninguna de las teorías establecidas excluye a las demás, es decir existe la posibilidad que en algunos casos sean causados por uno de estos factores o por otros, incluso puede ser una combinación de varios factores (Martínez, 2009, p.40).

1.5.6. Alteraciones neurobioquímicas

Hasta cierto punto en la enfermedad de Alzheimer se observa un deterioro en la neurotransmisión central, siendo el sistema colinérgico el más deteriorado, identificándose la disminución del 50 al 90% de los niveles de la enzima sintetizadora de acetilcolina y acetilcolinesterasa llamada colinacetiltransferasa (CAT) (González, 2005, p. 12).

En diversos estudios se indica una deficiencia de la actividad de la CAT, evidenciadas más en terminaciones colinérgicas, como el neocórtex e hipocampo. Por otra parte, la reducción en la tasa de acetilcolina es más intensa que la de la CAT lo que parece indicar que su regulación está ligada al aporte de colina y acetilcoenzima (González, 2005, p. 12).

Aunque múltiples investigadores coinciden en que la enfermedad de Alzheimer se da principalmente a la deficiencia de transmisores acetilcolinérgicos en áreas cerebrales, otros autores no están de acuerdo debido a que el déficit colinérgico no se ha observado en casos iniciales de la enfermedad (González, 2005, p. 13).

El sistema catecolaminérgico en pacientes con Alzheimer se encuentra alterado en las áreas cerebrales de pacientes de edad temprana (antes de los 50 años), por otra parte, el sistema serotoninérgico afecta el lóbulo temporal pudiendo ser el responsable de reacciones agresivas y de irritabilidad (González, 2005, p. 13).

En algunos casos se aprecia un descenso de vasopresina cerebral y un aumento de oxitocina en el hipocampo. Entre los aminoácidos alterados se encuentra disminuido el glutamato y el GABA que puede ser una de las causas de la degeneración neuronal propia de la enfermedad de Alzheimer (González, 2005, p. 13).

En estudios neuropatológicos se ha observado acumulaciones anormales de mitocondrias que parecen preceder a la acumulación amiloide. Así mismo, se evidencia una oxidación disminuida de la glucosa en el cerebro (González, 2005d, p. 13).

1.5.7. Tratamiento

A pesar de que la enfermedad de Alzheimer no tiene cura, a lo largo de los años se han desarrollado estrategias farmacológicas y no farmacológicas para controlar y prevenir los síntomas y signos, así como ralentizar el progreso de la enfermedad, con el fin de que el paciente pueda llevar un mejor estilo de vida.

1.5.7.1. Tratamiento no farmacológico

El tratamiento incluye una amplia gama de atención interdisciplinaria enfocada al paciente y las personas que se encuentran a su cuidado, con la participación activa de fisioterapeutas, fonaudiólogos, terapeutas ocupacionales, psicólogos, entre otros (Alberca, 2001, p.66).

Este tratamiento está orientado a la conducta, las emociones, la cognición o estimulación, los mismos se encuentran respaldados por investigaciones y la práctica clínica (Alberca, 2001, p.66).

Con la atención conjunta de los profesionales mencionados y la ayuda familiar, se espera mejorar la calidad de vida de los pacientes, como consecuencia del incremento de la capacidad funcional en el contexto del déficit existente (Alberca, 2001, p.66).

1.5.7.2. Tratamiento farmacológico

Los medicamentos existentes para tratar la enfermedad actúan previniendo las consecuencias del déficit cognitivo y los cambios que se presentan en las actividades diarias, sin curar la enfermedad. Estos fármacos aportan alivio al 50 por ciento de los pacientes, sin embargo, los resultados del tratamiento pueden variar mucho de una persona a otra (Peyronnet, 2011, p. 92).

Mientras la enfermedad de Alzheimer progresa las neuronas se van muriendo y la sinapsis se va perdiendo, ocasionando la pérdida de memoria y la alteración de otras funciones intelectuales (APEAD, 2012).

En la actualidad existen cuatro medicamentos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) para el tratamiento seguro y efectivo del Alzheimer, los fármacos admitidos son: tacrina, donepezil, rivastigmina y galantamina (Isaacson, 2011, p. 55).

Se ha estudiado un fármaco denominado renacenz el cual fue desarrollado por científicos austríacos, él mismo se basa en una proteína natural denominada carebrolysina que permite ralentizar la degradación de las neuronas y aumentar el desarrollo, fortalecimiento y protección de las mismas (APEAD, 2012).

Entre los medicamentos existentes siempre ha habido una inclinación por los inhibidores de acetilcolinesterasa ya que pueden disminuir la progresión de la enfermedad, en la actualidad se están empleando los inhibidores de acetil y butirilcolinesterasa en conjunto (Castellanos, 2014, pp. 2-5).

Inhibidores de acetilcolinesterasa

Como se ha mencionado antes, la enfermedad de Alzheimer implica la pérdida de neuronas que utilizan acetilcolina como neurotransmisor. Fármacos empleados en etapas tempranas de la enfermedad intentan restablecer el déficit impidiendo el trabajo de una enzima de degradación de la acetilcolina, de esta forma aumentan los niveles de acetilcolina en el espacio sináptico (Peyronnet, 2011, p. 92).

Los inhibidores de acetilcolinesterasa constituyen un amplio número de compuestos de estructuras variadas, en presencia de la misma dan lugar a la inhibición de la enzima alterando la sinapsis colinérgica. Estos compuestos interactúan de manera diferente con el sitio activo de la enzima (Castellanos, 2014, pp. 2-5).

Dichos inhibidores son indicados en fases iniciales o moderadamente avanzadas de la enfermedad, son fármacos bien tolerados por el organismo y su efecto se manifiestan en todas las áreas dañadas como en la cognición, funcionalidad, afectividad y comportamiento (Carrasco, 2012, pp.50-51).

Como efecto secundario de estos medicamentos se puede presentar náuseas, diarrea y vómito, por lo que el tratamiento debe ser controlado constantemente (Peyronnet, 2011b, p. 93).

- Tacrina

Primer inhibidor aprobado por la FDA en 1993, primer fármaco específico empleado en el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer. Es un bloqueador reversible e inespecífico de las colinas esterasas, presenta alta penetrabilidad al sistema nervioso y vida media corta (Gandía et al., 2006: p. 474).

- Donepezilo

Aprobado por la FDA como segundo fármaco para el tratamiento sintomático del Alzheimer leve o severo, es un inhibidor selectivo y reversible de la acetilcolinesterasa con menor afinidad por la butirilcolinesterasa, mejora las funciones cognitivas y la capacidad de realizar las actividades diarias (López, 2015, p. 5).

- Rivastigmina

Fue el tercer inhibidor de acetilcolinesterasa aprobado por la FDA, fármaco selectivo que inhibe al menos 10 horas la enzima acetilcolinesterasa, a su vez inhibe la butirilcolinesterasa con acción selectiva en hipocampo y córtex (López, 2015; Gandía et al., 2006).

Los beneficios de rivastigmina se centran en mejorar de forma significativa la función cognitiva y la realización de actividades diarias, puede presentar efectos adversos como náuseas, vómito, anorexia, diarrea o dolor abdominal (Gandía et al., 2006: p. 474).

1.5.8. Galantamina

Se trata de un alcaloide terciario que originalmente se aisló de bulbos de *Galanthus woronowi* en el año de 1952, también se ha encontrado en otras especies de la familia Amaryllidaceae como es *Galantus nivalis* y se encuentra en forma de sal de hidrocarburo de galantamina (Bastidas et al., 2011: pp. 75-76).

Este principio activo es inhibidor de acción prolongada, selectivo, reversible y competitivo de acetilcolinesterasa, responsable de la degradación de acetilcolina en la unión neuromuscular, periférica y central, sinapsis colinérgica y órganos diana parasimpáticos, además tiene la capacidad de atravesar el sistema nervioso central. De esta forma se constituye en un fármaco clave para disminuir el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer. (Salazar, 2009, pp. 268-269).

Si bien galantamina se ha obtenido por síntesis, su formulación farmacéutica se obtiene principalmente por extracción a partir de escasas poblaciones naturales como algunas especies de la familia Amaryllidaceae que son las únicas productoras de galantamina, fármaco que la FDA aprobó desde el 2001 para el tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer y es comercializada como Razadyne o Reminyl (Marcet, 2015, pp.3).

Salazar (2009, p. 269) nos indica que la acción de la galantamina sobre la neurotransmisión colinérgica se produce mediante un doble mecanismo:

Modulación del receptor nicotínico de la acetilcolina. Galantamina no activa directamente al receptor nicotínico, sino que potencia sus respuestas a la acetilcolina. Además, la regulación alostérica de este receptor presináptico no solo potencia la liberación de acetilcolina, sino que incrementa la liberación de otros neurotransmisores como el glutamato, monoaminas y el GABA, que también son afectados en la enfermedad de Alzheimer (Salazar, 2009, pp. 268-269).

Inhibición competitiva y reversible de la acetilcolinesterasa. La afinidad sobre esta enzima es 50 veces superior a la que tiene sobre la butirilcolinesterasa. Además, la reversibilidad es rápida y completa tras la suspensión del tratamiento, haciendo que la biodisponibilidad de acetilcolina se vea aumentada en la sinapsis (Salazar, 2009, pp. 268-269).

1.5.9. Colinesterasas

Las colinesterasas son enzimas que forman parte de las esterasas y se distribuyen ampliamente en el reino animal y vegetal. Estas enzimas hidrolizan los ésteres de colina de forma más activa que otros ésteres, presenta cuatro sustratos de mayor importancia y son acetilcolina, butirilcolina, succinilcolina y benzoilcolina (Repetto, 1995, p.120).

En vertebrados las colinesterasas se clasifican en dos grupos dependiendo de las características bioquímicas o fisiológicas: la primera son las colinesterasas verdaderas o acetilcolinesterasa (AChE) encargada de hidrolizar la acetilcolina y la segunda es la colinesterasa plasmática o butirilcolinesterasa (BuChE) que hidroliza la butirilcolina (Sánchez y Salceda, 2008: p. 45).

La inactivación de acetilcolina se da por acción de acetilcolinesterasa.

AChE y BuChE son familias de glicoproteínas que pueden estar unidas a la membrana o libres en el espacio extracelular, su estructura molecular se estableció para el órgano eléctrico de la anguila *Electrophorus electricus*, y es válida para todos los tejidos y especies estudiados (Sánchez y Salceda, 2008: p. 45).

1.5.9.1. Acetilcolinesterasa

La enzima fue descubierta en 1920, desde entonces ha sido una de las enzimas más estudiadas en cuanto a su efecto fisiológico, mecanismo de acción, naturaleza de su centro activo, así como su distribución y localización en diferentes tejidos (Sánchez y Salceda, 2008: p. 45).

AChE pertenece a las hidrolasas presentes tanto en el reino animal como vegetal, en los humanos se encuentra distribuida en músculos, sangre, plasma, linfocitos y eritrocitos. Su función principal es hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis colinérgica, produciendo colina y acetato (Mendoza, 2008, p. 226).

La acetilcolinesterasa puede desempeñar funciones como la de receptor fisiológico. Tradicionalmente se creía que era una enzima de membrana postsináptica, pero también se ha demostrado que se encuentra asociada a terminales presinápticas, regulando así la síntesis de acetilcolina en los terminales nerviosos (Alberdín, 2009, p. 57).

La sinapsis colinérgica (Figura 5), en la terminal presináptica la acetilcolin transferasa (CAT) sintetiza a la acetilcolina (ACh) a partir de colina y acetil coenzima A. La ACh se une con receptores muscarínicos (M1 y M2) en la terminal postsináptica, los que transducen la señal a través de vías que involucran al adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y al inositol trifosfato (IP3). La ACh se hidroliza por la acetilcolinesterasa (AChE) soluble o anclada a la membrana pre- y postsináptica (Sánchez y Salceda, 2008: p. 45).

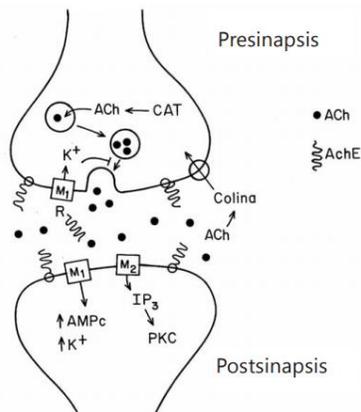


Figura 5-1: Sinapsis colinérgica

Fuente: Sánchez y Salceda, 2008: p. 45

1.5.9.2. Butirilcolinesterasa

La butirilcolinesterasa es considerada como una esterasa inespecífica al hidrolizar gran variedad de sustratos ésteres, por este motivo se la denomina también pseudocolinesterasa o succinilcolinesterasa (Alberdín, 2009, pp. 57-58).

Se sintetiza en el hígado y se encuentra en el plasma y otros tejidos como músculos, mucosa intestinal y sistema nervioso central. A pesar de su amplia distribución su actividad biológica no ha sido determinada con claridad (Albendín, 2009, pp. 57-58).

Por otra parte, se ha observado que la butirilcolinesterasa es muy parecida en función y estructura a la acetilcolinesterasa, la cual también hidroliza ésteres de colina. Tiene un papel importante en ralentizar el avance del Alzheimer (Albendín, 2009, pp. 57-58).

1.6. Extracción con disolventes

La extracción es un proceso de uso frecuente en química analítica con el fin de aislar, concentrar o separar un analito de una especie. Comúnmente se observa la extracción de una disolución acuosa con disolventes orgánicos como el éter dietílico, tolueno y hexano, que son inmiscible con el agua y menos denso que está, formando una fase separada por encima de la fase acuosa (Harrys, 2007, pp: 549-550).

El pH del soluto influye en la disolución dependiendo de si es ácido o básico, su carga cambia cuando lo hace el pH. Demostrándose que una especie neutra es más soluble en un medio orgánico y una especie ácida es más soluble en disolución acuosa (Harrys, 2007, pp: 549-550).

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

La técnica constituye una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas. La utilización de esta técnica requiere sistemas especiales de conexión, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesita una cantidad pequeña de muestra para su análisis (Gutiérrez y Droguet, 2002, p. 35).

1.7.1. Cromatografía de gases (CG)

La cromatografía de gases es la técnica analítica de separación que ha experimentado un mayor desarrollo desde los años cincuenta que fue cuando se inició. Al paso de los años se ha ido mejorando el sistema del instrumento convirtiéndolo en la técnica cromatográfica que ofrece mejor poder de resolución para compuestos orgánicos volátiles (Valcácel y Gómez, 1988: pp. 615-616).

En cromatografía de gases la fase móvil es un gas y la fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente, o un líquido retenido en un soporte sólido o impregnado en las paredes de una columna capilar (Valcácel y Gómez, 1988: pp. 615-616).

Para el uso CG la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatografía. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía donde la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es transportar el analito a través de la columna (Parrales et al., 2012: pp: 1-3).

Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía gas - sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC).

La cromatografía gas - sólido ha tenido una aplicación limitada, debido a la retención semipermanente de las moléculas activas o polares y a la obtención de picos de elución con colas (una consecuencia del carácter no lineal del proceso de adsorción), de modo que esta técnica no ha encontrado una gran aplicación excepto para la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular (Parrales et al., 2012: pp: 1-3).

En la cromatografía gas – líquido el analito se encuentra entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte. Este concepto fue enunciado por primera vez, en 1941, por Martin y Synge, quienes fueron también los responsables del desarrollo de la cromatografía de distribución líquido - líquido. Más de una década tuvo que pasar antes de que la importancia de la cromatografía gas - líquido se demostrara experimentalmente (Parrales et al., 2012: pp, 1-3).

1.7.2. Espectrometría de masas (MS)

Actualmente Espectrometría de masas es considerado el detector más potente en cromatografía ya que presenta la capacidad de leer concentraciones muy bajas de analito, proporciona información tanto cualitativa como cuantitativa y puede distinguir entre distintas sustancias que tienen el mismo tiempo de retención (Harrys, 2007, pp: 549-550).

La espectrometría de masas es una técnica analítica que proporciona información del análisis de átomos o fragmentos de moléculas que se convierten en iones, estos se aceleran en un campo eléctrico y a continuación se separan según su relación masa/carga. Las moléculas de interés, forman parte generalmente de una mezcla heterogénea que no requiere necesariamente una separación previa (Harrys, 2007, pp: 517-119).

1.8. Método de Ellman

Es un método fotométrico para determinar la actividad de acetilcolinesterasa de tejidos. La actividad enzimática es medida por el aumento de la coloración amarilla producida a partir de tiocolina. El análisis es aplicable a concentraciones muy bajas de la enzima y su análisis es rápido (Ellman et al., 1961: p. 89).

El método de Ellman (Ellman et al., 1961) es el método colorimétrico más utilizado para la determinación de colinesterasa en sangre entera. El método detecta la tiocolina tras la hidrólisis del sustrato acetilcolina por la colinesterasa produciendo tiocolina y acetato, la tiocolina reacciona con el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) generando la 5-tio-2-nitrobenzoato (color amarillo), el cual se detecta a través del espectrofotómetro a una $\lambda = 412 \text{ nm}$ (Ellman et al., 1961: p. 89).

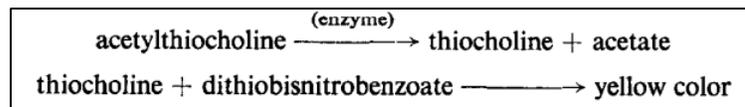


Figura 6-1: Principio del método Ellman

Fuente: Ellman et al., 1961, p: 89

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Población de estudio

Se analizó la fracción alcaloidal de 10 bulbos de *Crinum kunthianum*, recolectados en la provincia del Guayas.

2.2. Tamaño de la muestra

Se recolectaron aproximadamente 200 g de bulbo fresco de *Crinum kunthianum* y se sometieron a secado, obteniendo un peso final aproximado de 32 g.

2.3. Lugar de Investigación

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo donde se realizó la extracción de alcaloides y los ensayos de inhibición. Cabe mencionar que también se colaboró con la Universidad de Barcelona (España) para la realización de los análisis de Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas.

2.4. Equipos, Materiales y Reactivos

2.4.1. Equipos

Tabla 1-2: Equipos empleados en los diferentes procedimientos.

EQUIPOS	PROCEDIMIENTO DE USO
Estufa de secado	Preparación del material vegetal
Molino Arthur H. Thomas C.O	

Balanza analítica	Pesaje de reactivos Pesaje de la muestra vegetal
Sonicador	Extracción de alcaloides
Rotavapor	
pH-metro	Preparación de reactivos
Centrífuga	
Congelador	
Refrigerador	
Espectrofotómetro ELISA	Ensayos de inhibición enzimática Identificación de alcaloides
Agitador vórtex	
Cronómetro	
Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas	

Realizado por: Gabriela Cando

2.4.2. *Reactivos*

Tabla 2-2: Reactivos empleados en los diferentes procedimientos.

REACTIVO	PROCEDIMIENTO UTILIZADO
Metanol CH ₄ O	Preparación del material vegetal
Ácido sulfúrico H ₂ SO ₄ (2% V/V)	Obtención 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 arábica	
Fosfato di potásico K ₂ HPO ₄	

Bifosfato de sodio NaH_2PO_4	Determinación de actividad inhibitoria
Cloruro de sodio NaCl	
Fosfato di potásico Na_2HPO_4	
Ácido clorhídrico HCl (0.5 N)	
Hidróxido de sodio NaOH (0.5 N)	
Acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus electricus</i>	
Butirilcolinesterasa de suero equino	
Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)	
Yoduro de acetiltiocolina	
Yoduro de butiriltiocolina	
Galantamina	
Agua bidestilada	Preparación de reactivos y lavado de materiales
Agua destilada	

Realizado por: Gabriela Cando

2.4.3. Materiales

Tabla 3-2: Materiales empleados en los diferentes procedimientos.

MATERIALES	Cantidad	PROCEDIMIENTO DE USO
Balones aforados 1000 ml	2	Preparación de reactivos
Balones de aforo de 100 ml	2	
Balones de aforo 25 ml	2	
Pipeta 5 ml	1	
Pipeta 10 ml	1	
Probeta 100 ml	2	
Vaso de 1000ml	2	
Vaso de 100 ml	3	

Vaso 50 ml	2	
Pesa muestra	2	
Pera de succión	1	
Varilla de agitación	2	
Frasco ámbar de 1000 ml	3	
Frasco ámbar de 250 ml	2	
Embudo de separación	1	
Matraz 1000 ml	2	
Balón esmerilado 250 ml	1	
Vaso de precipitación 250 ml	3	Extracción de alcaloides
Vaso de precipitación 600 ml	2	
Pipeta Pasteur de vidrio	1	
Viales de vidrio	1	
Desecador	1	
Tubos Eppendorf de 0.5 ml	150	
Tubos Eppendorf de 1.5 ml	100	
Tubos con tapa rosca azul de 20 ml	6	
Tubos tapa rosca plomo de 14 ml	2	
Puntas amarillas de micropipeta	3000	Determinación de la actividad inhibitoria
Puntas azules de micropipeta	500	
Microplaca de 96 pocillos	1	
Paleta de plástico para pipeta multicanal	5	
Placa de hielo reutilizables	4	
Placa de poliestireno	1	
Toallas absorbentes de cocina	3	

Papel aluminio	3	Uso general
Toallas de papel sin pelusa	4	

Realizado por: Gabriela Cando

2.5. Recolección del material vegetal

La especie vegetal *Crinum kunthianum* se recolectó en el mes de septiembre del 2018 en estado de floración, en la provincia de Guayas-Ecuador, a una altitud de 4 metros sobre el nivel del mar.

Se recolectaron aproximadamente 200 g de bulbos frescos, bajo el contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos del proyecto de investigación científica denominado: “La Biodiversidad de Amaryllidaceae como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible” MAE-DNB-CM-2015-0054. (Anexo H)

También se tramitó el permiso de movilización desde la provincia de Guayas hacia Riobamba, en el Ministerio del Ambiente de la ciudad de Guayaquil, Guía de Movilización de Especímenes de Flora y Fauna Silvestre Nro. 009-DPAG-LA-2018. (Anexo I)

2.6. Identificación botánica

La identificación botánica de la especie vegetal estuvo a cargo de la Dra. Nora Oleas, Botánica responsable del Herbario de la Universidad Tecnológica Indoamérica (Quito-Ecuador) y del Dr. Alan Meerow (USA).

2.7. Preparación del material vegetal

Luego de la recolección de los bulbos de *Crinum kunthianum* se procedió a la selección de aquellos que presentasen características de buenas condiciones macroscópicas, sin lesiones por materiales mecánicos y ausencia de daño por microorganismos.

Los bulbos seleccionados se sometieron a limpieza con agua destilada y alcohol desinfectante, se cortaron en trozos de aproximadamente 1.5 cm de diámetro y se colocaron en la estufa a 60°C por 72 horas con el fin de secar la muestra vegetal.

Una vez seco el material se trituró en el molino de cuchillas giratorias Arthur H. Thomas C.O.

2.8. Extracción de alcaloides

Del material molido se pesaron 20 gramos y se maceró con 800 ml de metanol por un período de 72 horas en un frasco ámbar, la muestra se sometió a baños de ultrasonido en intervalos de 1 a 2 horas por día. A continuación, se filtró obteniendo así el extracto bruto. Este extracto se pasó a un balón esmerilado y se evaporó el solvente en el rotavapor con presión reducida y temperatura de 50 °C, obteniéndose el extracto crudo seco.

El extracto crudo se pasó a un balón de separación y se acidificó con ácido sulfúrico (2% V/V) con la finalidad de solubilizar los alcaloides en su forma de sal; dejando los pigmentos, esteroides y otras impurezas en la fase orgánica, posteriormente se colocó éter etílico para desengrasar la muestra, obteniéndose dos fases: una orgánica que es la desechable y una fase acuosa ácida.

Esta última fase se basificó con hidróxido de amonio (25% V/V) hasta alcanzar un pH aproximado de 10 logrando que los alcaloides se queden retenidos en la fase orgánica en su forma desionizada, se lavó con una cantidad suficiente de acetato de etilo, alcanzando nuevamente dos fases: una fase acuosa alcalina que se desecha y otra fase orgánica en la que se retienen los alcaloides, a esta se le añadió sulfato de sodio anhidro y goma arábiga con la finalidad de absorber el agua restante de la muestra.

Posteriormente se filtró el extracto alcaloidal, se evaporó el solvente a presión reducida y a una temperatura de 50 °C, consiguiendo el extracto de alcaloides totales.

2.9. Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)

El análisis de CG-EM se realizó en la Universidad de Barcelona (España) ya que este trabajo de titulación forma parte del proyecto “LA BIODIVERSIDAD IBEROAMERICANA COMO FUENTE DE RECURSOS NATURALES PARA SU EXPLOTACIÓN SOSTENIBLE (BIFRENES)”.

Para realizar este análisis se partió del extracto purificado de alcaloides. El equipo que se usó fue el Cromatógrafo de Gases Agilent, modelo 6890, acoplado al Espectrómetro de Masas modelo 5975, el mismo trabaja a 70 eV a 230 °C en la fuente iónica.

El Cromatógrafo de Gases en el que se realizaron los análisis fue SAPIENS-XS-MS (30 x 0.25mm x 0,25 µm), teniendo como fase estacionaria la fenilmetilsilicona al 5%.

La fluctuación de temperatura se realizó de la siguiente manera (Acosta et al, 2014: p. 2):

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

El inyector del equipo trabajó a una temperatura de 280 °C con un flujo de helio de 0.8 ml/min y se usó el método *splitless*. Como alcaloide de referencia se empleó galantamina y para el análisis de datos se empleó el software llamado AMDIS 2.71 (NIST), mismo que permite verificar la pureza de las señales y realizar el cálculo de los índices de retención (Acosta et al, 2014: p. 2).

2.10. Preparación de muestras para los ensayos de inhibición enzimática de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa

2.10.1. Preparación de soluciones

- Buffer fosfato salino (PBS)

Para la preparación de PBS se colocó bifosfato de sodio (NaH_2PO_4) 2.3Mm, fosfato dipotásico (K_2HPO_4) 8Mm, cloruro de sodio (NaCl) 0.15 M y se disolvió con agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.5 con NaOH (0.5 N).

- Solución salina

Para la preparación de Solución salina se pesó Na_2HPO_4 y se aforó con agua bidestilada, el pH a 7.5 se ajustó con HCl (0.5 N).

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

Se preparó DTNB a una concentración final de 2 mg/ml en cada tubo.

2.10.2. Preparación de sustratos

- Yoduro de Acetilcolina (ATC) y Yoduro de butirilcolina.

La concentración final de ATC fue de 1.7 mg/200 μ L y de BTC tuvo una concentración de 1.9 mg/200 μ L.

2.10.3. Enzimas

- Acetilcolinesterasa (AChE)

AChE se preparó a una concentración final de 0.195 U/ml.

- Butirilcolinesterasa (BuChE)

BuChE se realizó a una concentración final de 6.25 U/ml.

2.10.4. Galantamina (compuesto de referencia)

Se empleó galantamina 12 mg como compuesto de referencia. La concentración de la preparación de la muestra madre fue 3.48 x10⁻³M y a partir de ella se prepararon las siguientes diluciones:

Tabla 4-2: Concentraciones del compuesto de referencia (Galantamina) usadas en los ensayos de inhibición de AChE y BuChE respectivamente.

Acetilcolinesterasa		Butirilcolinesterasa	
12.5	1.25 x 10 ⁻⁴	100	1 x 10 ⁻⁴
10	1 x 10 ⁻⁵	30	0.3 x 10 ⁻³
7.5	0.75 x 10 ⁻⁵	10	1 x 10 ⁻⁵
5	0.5 x 10 ⁻⁵	5	0.5 x 10 ⁻⁵
2.5	0.25 x 10 ⁻⁵	1	1 x 10 ⁻⁶
0.5	0.5 x 10 ⁻⁶	0.5	0.5 x 10 ⁻⁶
0.1	1 x 10 ⁻⁷		

Realizado por: Gabriela Cando

2.10.5. Muestra de alcaloides de *Crinum kunthianum*

2.10.5.1. Dilución 1

A partir de la obtención de alcaloides de *Crinum kunthianum*, se preparó una solución madre del solventes para su dilución.

En la tabla 5-2 se muestra las concentraciones para los ensayos de inhibición de *Crinum kunthianum* en las tres diluciones usadas sobre las enzimas AChE y BuChE.

Tabla 5-2: Concentraciones de *Crinum kunthianum* empleadas en los ensayos de inhibición para AChE y BuChE.

Acetilcolinesterasa	Butirilcolinesterasa
150 µg/ml	125 µg/ml
100 µg/ml	100 µg/ml
75 µg/ml	75 µg/ml
50 µg/ml	50 µg/ml
25 µg/ml	25 µg/ml
10 µg/ml	10 µg/ml
	5 µg/ml

Realizado por: Gabriela Cando

2.10.5.2. Dilución 2

Concentración 1

A partir de los alcaloides obtenidos, se preparó una solución madre de concentración: cosolvente A y cosolvente B a concentración 1 para la muestra madre.

Se dejó reposar y se tomó el sobrenadante para realizar las diluciones. Las concentraciones usadas para el ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa fueron las que se muestran en la tabla 5-2.

Concentración 2

Para la realización de la segunda dilución se emplearon las siguientes concentraciones: cosolvente A y cosolvente B a concentración 2 para la muestra madre.

Las concentraciones usadas para el análisis de inhibición fueron las mismas de la tabla 5-2.

2.11. Ensayos de inhibición enzimática de AChE y BuChE

El método empleado fue de Ellman et al, con algunas modificaciones (Ortiz et al, 2016).

Para los ensayos de inhibición enzimática se usaron microplacas de 96 pocillos. Según corresponde se colocó en los pocillos:

- Control: se colocó 50 μL de PBS + 50 μL de enzima, ya sea de AChE o BuChE según sea la preparación.
- Blanco control: se colocó 100 μL de PBS.
- Muestra: se empleó 50 μL de las diluciones de alcaloides de *Crinum kunthianum* y de las diluciones de galantamina (para AChE o para BuChE según la preparación que se haya realizado) + 50 μL de enzima, ya sea AChE o BuChE.
- Blanco control: en estos pocillos se usó 50 μL de las diluciones del extracto o de las diluciones de galantamina + 150 μL de PBS.

Una vez que se llegó a este punto, la placa entró en un estado de reposo por 30 minutos.

Pasado este tiempo se colocó 100 μL del sustrato preparado con anterioridad, en los pocillos correspondientes al control, blanco control y muestra. Se esperó 5 minutos antes de leer la placa, en este tiempo se homogeniza con suavidad por dos minutos aproximadamente.

A los 35 minutos exactos se dio lectura a la placa en el espectrofotómetro Elisa a una longitud de onda de 405 nm.

2.12. Análisis de datos

Las absorbancias obtenidas de las lecturas realizadas se evaluaron en Microsoft Excel, donde se procesaron los resultados en porcentaje de inhibición enzimática de cada muestra, utilizando la siguiente fórmula:

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

Donde;

M: Lectura de la muestra

C: Lectura del control

BM: Lectura del blanco muestra

BC: Lectura del blanco control

2.13. Curva de inhibición enzimática para calcular el IC50

Se realizó la curva de inhibición enzimática representando los porcentajes de inhibición (eje y) en función de la concentración del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* (eje x). A la curva obtenida se añadió la línea de tendencia logarítmica y la ecuación (Ortiz et al., 2016).

Los datos y el gráfico obtenidos se usaron para calcular la concentración inhibitoria 50 (IC50), que indica la concentración del extracto alcaloidal a la cual se inhibe las enzimas en un 50 % (López et al., 2002: pp. 2521-2529).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el análisis del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* en base a la metodología planteada en el apartado anterior.

3.1. Extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum*

Para la obtención de los alcaloides de *Crinum kunthianum* se pesaron 20 g de muestra seca y triturada, luego del procedimiento de extracción se obtuvo el siguiente de rendimiento (Tabla 1-3):

Tabla 1-3: Rendimiento de alcaloides de *Crinum kunthianum* mediante extracción metanólica

Extracto	Muestra vegetal	Peso del bulbo seco (g)	Volumen de metanol (ml)	Alcaloides presentes (mg)	% de rendimiento
Metanólico	Bulbo de <i>Crinum kunthianum</i>	20	800	379.8	1.899 %

Realizado por: Gabriela Cando

El rendimiento obtenido de los alcaloides de *Crinum kunthianum* fue de 1.899 %, este resultado puede variar dependiendo del método de extracción y la parte de la planta de la cual se tome la muestra de análisis (Santacoloma y Granados, 2010: p. 31).

3.2. Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

El análisis de CG-EM facilitó la identificación de los tipos de alcaloides presentes en la muestra total de alcaloides del bulbo de *Crinum kunthianum*, los resultados se presentan a continuación en la Tabla 2-3.

Tabla 2-3: Alcaloides identificados mediante CG-EM del extracto puro de alcaloides del bulbo de *Crinum kunthianum*

Nº	Alcaloide	Rt	RI	µg gal/100 mg PS
1	Crinina	24.0738	2506.8	12.3532
2	Anhidrolicorina	24.5606	2538.6	9.9696
3	Acetilcaranina	24.7590	2551.5	11.32
4	Caranina	24.8409	2556.9	10.8342
5	2-oxomesembrenona	26.8750	2694.0	18.0543
6	Powelina	26.8750	2694.0	18.0543
7	1-O-Acetillicorina	27.5763	2743.4	9.9693
8	Licorina	28.2313	2789.7	35.3075
9	1-Epidemetoxibowdensina	28.3751	2799.9	11.5231
10	2-O-Acetillicorina	29.3826	2873.4	9.9571
11	Bowdensina	30.9306	2989.3	63.0587

Interpretación: Rt: tiempo de retención; RI: índice de retención; PS: peso seco

Realizado por: Laura Torras / Jaume Bastidas

Fuente: Universidad de Barcelona

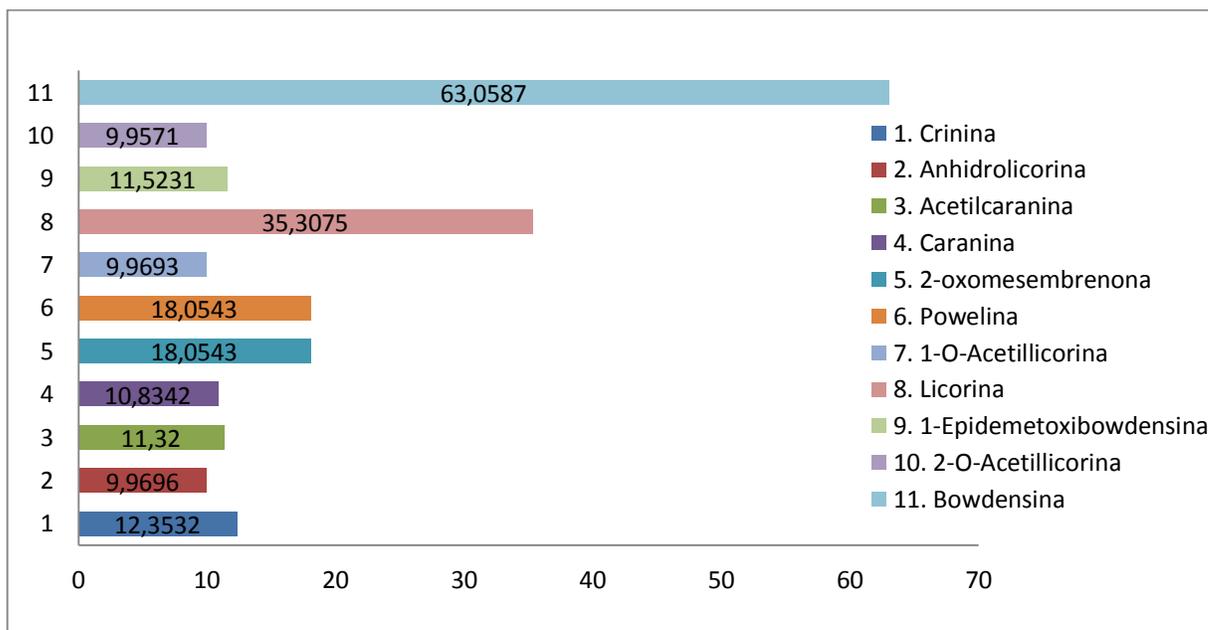
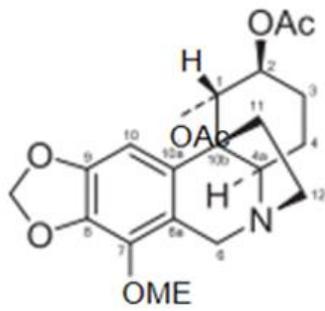
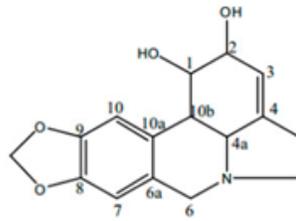


Gráfico 1-3: Abundancia de alcaloides del extracto purificado del bulbo de *Crinum kunthianum* (µg gal/100mg PS)

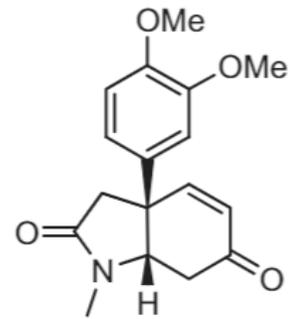
Realizado por: Gabriela Cando



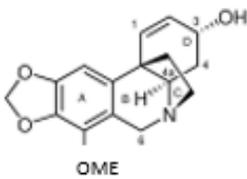
Bowdensina



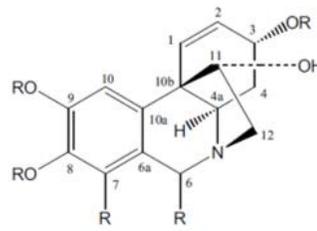
Licorina



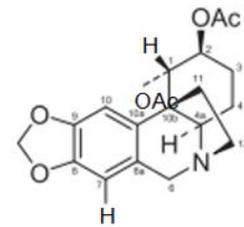
2-oxomesembrenona



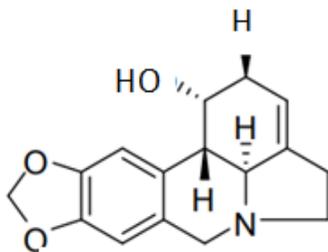
Powelina



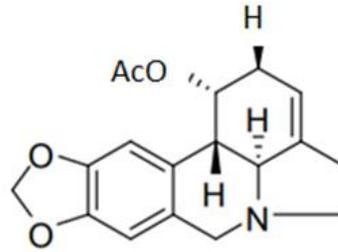
Crinina



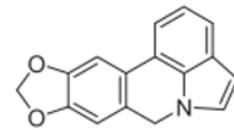
1-epidemethoxybowdensina



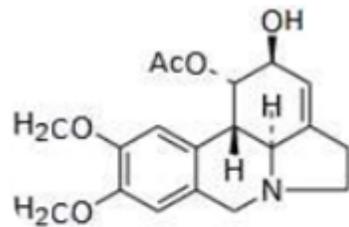
Caranina



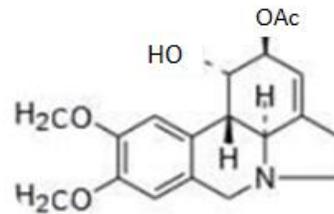
Acetilcaranina



Anhidrollicorina



1-O-acetillicorina



2-O-acetillicorina

Figura 1-3: Alcaloides identificados en el extracto alcaloidal de bulbos de *Crinum kunthianum*

Fuente: (Sousa, M. 2009: pp. 7-9; Pigni, N. 2013: p. 120; Gastaldi, C. 2015: pp. 4-3)

El extracto purificado de alcaloides de *Crinum kunthianum* presenta 11 alcaloides identificados mediante el análisis de CG-EM, siendo bowdensina el alcaloide más abundante en *Crinum kunthianum* ya que hay 63.0587 ($\mu\text{g gal}/100\text{mg PS}$) de este compuesto. Licorina es el segundo alcaloide de mayor abundancia, observando se encuentra en una concentración de 35.3075 ($\mu\text{g gal}/100\text{mg PS}$). Los alcaloides que se encuentran en menor abundancia respecto a los dos anteriores fueron crinina, anhidrolicorina, acetilcaranina, caranina, 2-oxomesembrenona, powelina, 1-o-acetillicorina, 1-epidemetoxibowdensina y 2-o-acetillicorina.

El alcaloide bowdensina, compuesto mayoritario del extracto de bulbo de *Crinum kunthianum* se ha identificado en especies del género *Nerine* como bowdenia y undulata y en la especie *Crinum erubescens*. En ambos casos este metabolito se encuentra en pequeñas porciones respecto a los demás alcaloides por lo cual no se han llevado a cabo estudios sobre éste a profundidad. (Králové, 2018, p.15 y 21-25).

En Colombia se ha realizado un estudio sobre alcaloides y la actividad biológica de varias especies de Amaryllidaceae, entre ellas se encuentra *Crinum kunthianum*, los alcaloides significativos presentes fueron pratorinina, crinamidina, 3-o-metilgalantamina, 1-epideacetilbowdensina, hamaina, 11-hidroxivitatina y 1,2-dihidroxivitatina (Cabezas et al., 2007: pp. 237- 239), en similitud con este trabajo realizado se encontraron los alcaloides powelina, licorina y 2-o-acetillicorina. La variabilidad de metabolitos encontrados en especies de *Crinum kunthianum* tanto colombiana como ecuatoriana se puede deber a factores climáticos, edafológicos y de la parte de la planta de la cual se tomó la muestra de análisis (Santacoloma y Granados, 2010: pp. 31-32).

Desde 1950 se han realizado múltiples investigaciones fitoquímicas en diferentes especies de *Crinum*, encontrándose alcaloides similares a los de este trabajo, siendo así el alcaloide acetilcaramina se encuentra en la especie *Crinum moorei*, el alcaloide 1-o-acetillicorina en las especies *Crinum kirkii*, *Crinum latifolium*, *Crinum macowanii*, *Crinum moorei*; 2-o-acetillicorina en *Crinum augustum* y *Crinum kirkii*; caramina en especies como *Crinum laurentii*, y *Crinum powellii*; y el alcaloide crinina se ha encontrado en las especies *Crinum amabile*, *Crinum americanum*, *Crinum asiaticum*, *Crinum erubescens*, *Crinum moorei*, *Crinum powellii* y *Crinum Zeylanicum* (Refaat et al., 2012c: pp. 3092-3095).

En el trabajo realizado por Carrasco (2017, pp. 34-35), se analizaron los bulbos de la especie *Crinum x amabile* en la cual se encontraron alcaloides semejantes a *Crinum kunthianum*, como son: crinina, anhidrolicorina, caranina y licorina siendo este último el alcaloide más abundante en el trabajo analizado (Carrasco, 2017, pp. 34-35).

Licorina fue el primer alcaloide aislado de la familia Amaryllidaceae, en el caso de *Crinum kunthianum* este fue el segundo alcaloide más abundante. Ha sido estudiado por su abundancia y por presentar una importante actividad citotóxica frente a varias líneas de células tumorales en humanos (Niño et al., 2005: p. 83), en medicina tradicional se usaba como analgésico, antiinflamatorio y expectorante (Cabezas et al., 2007: p. 239).

Licorina es uno de los alcaloides más destacados del género *Crinum* encontrándose en especies como: *Crinum augustum*, *Crinum bulbisperum*, *Crinum defixum*, *Crinum jagus*, *Crinum erubescens* Ait., *Crinum macowanii*, entre otros. La extracción de los metabolitos se realizó de distintas partes de la planta como los bulbos, planta entera, flores, tallos y raíces (Refaat et al., 2012a: p. 1886).

En las especies *Galanthus elwesii*, *Galanthus ikariae*, *Leucojum aestivum* y *Narcissus tazetta* ssp. *tazetta* también se ha encontrado el alcaloide licorina, este ha sido investigado en estudios de inhibición plaquetaria, inhibición de la aorta en ratas actuando como agente bloqueante, en actividad citotóxica contra células tumorales, etc. (Sener et al., 1997: pp. 3-4).

Otros de los alcaloides representativos de *Crinum kunthianum* son powelina y 2-oxomesembrenona, en ellos hay 18.0543 ($\mu\text{g gal}/100\text{mg PS}$) en cada caso. Dentro de los alcaloides de tipo crinina tenemos una estructura representativa, la powelina que ha sido reconocido como un potente inhibidor de acetilcolinesterasa, además de presentar efectos citotóxicos y antimaláricos; por estas propiedades se ha conseguido sintetizar este alcaloide en el laboratorio (Hany y Hansen, 2008).

El estudio realizado por Cabezas et al (2007: p. 239), corrobora que los alcaloides de tipo crinina, 1-epidemetoxibowdensina y powelina fueron encontrados en especies colombianas de *Crinum kunthianum*. Además, los mismos muestran efectos antiproliferativos para líneas de células tumorales, siendo crinina la más activa al ser bien tolerada a altas concentraciones (Andrade et al., 2012: p. 92).

El alcaloide anhidrolicorina se ha podido presenciar en especies como *Hippeastrum vittatum* e *Hippeastrum santacatarina*, este alcaloide presenta actividad como antineoplásico potente sobre la leucemia linfocítica (Andrade et al., 2012: pp: 88-89).

En especies del género *Nerine* se pudo observar la presencia de alcaloides que también se encuentran en *Crinum kunthianum*. Específicamente, *Nerine bowdenii* se encuentran crinina, caranina, acetilcaranina, powelina, 1-O-acetillicorina y bowdensina; en *Nerine filifolia* existe la presencia de crinina, caranina, acetilcaranina y licorina; y en la especie *Nerine undulata* el alcaloide bowdensina (Králové, 2018, pp. 21-25).

3.3. Determinación de la actividad inhibitoria de AChE y BuChE

Para la identificación de la actividad inhibitoria se cumplieron condiciones tanto ambientales como de tiempo, el proceso experimental se llevó a cabo bajo la metodología de Ellman et al. (1961), con algunas modificaciones de Ortiz et al. (2016).

Para el análisis de la actividad inhibitoria de *Crinum kunthianum* frente a las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa se realizaron 3 diluciones diferentes con el fin de comparar con cuál de ellas presenta a un mejor valor IC50. La primera dilución fue con cosolvente A, la segunda cosolvente A + cosolvente B concentración 1 y la tercera fue cosolvente A + cosolvente B a concentración 2.

3.3.1. Primera parte: Actividad inhibitoria enzimática del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* en dilución 1

En esta parte se establecieron diferentes concentraciones del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* a emplearse en los ensayos de AChE y BuChE, con el objetivo de añadir la curva de tendencia logarítmica y cuyas concentraciones establecidas coincidan con la misma, de esta forma se llegó a obtener el valor real de la ecuación de la curva que nos permite calcular correctamente el valor de IC50 del extracto alcaloidal.

3.3.1.1. Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* sobre acetilcolinesterasa

Primer análisis

Para el análisis de los extractos de Amaryllidaceae en un principio se emplearon las concentraciones de 100, 50, 10 y 1 µg/ml, de esta forma se tiene una idea de la tendencia de la recta y el valor de IC50 que nos proporciona, es decir la actividad inhibitoria (López et al., 2002: pp. 2521-2529).

Las primeras concentraciones empleadas son el resultado de tres repeticiones consecutivas y dieron los siguientes resultados:

Tabla 3-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* (Primer análisis)

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de inhibición sobre AChE
100	71.63 ± 1.77
50	57.82 ± 1.82
10	25.13 ± 7.56
1	4.25 ± 11.28

Realizado por: Gabriela Cando

Estos datos fueron analizados, dando como resultado que en la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ tuvo un porcentaje máximo de inhibición del 70%, las concentraciones de 50, 10 y 1 $\mu\text{g/ml}$ presentaron una inhibición de 57, 19 y -6 respectivamente. Con estos resultados obtenidos se logró incluir nuevas concentraciones con el fin de ajustar la curva de inhibición a la de línea de tendencia logarítmica y determinar el valor de IC50.

Segundo análisis

En base a los resultados anteriores se emplean las concentraciones de 150, 100, 75, 50, 25 y 10 $\mu\text{g/ml}$, dando como resultado los siguientes porcentajes de inhibición.

Tabla 4-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* (Segundo análisis)

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de inhibición de AChE
150	75.28 ± 0.27
100	66.81 ± 1.88
75	59.32 ± 1.28
50	50.87 ± 0.94

25	36.81 ± 1.92
10	14.94 ± 0.95

Realizado por: Gabriela Cando

Los resultados mostrados en la tabla 4-3 son el promedio de tres repeticiones consecutivas en la misma se puede observar que el extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* a una concentración de 150 µg/ml es capaz de inhibir la enzima acetilcolinesterasa un 75.28 %. También se logró obtener dos valores por encima del 50% de inhibición y dos valores inferiores a este, lo que posibilita validar el ensayo como apropiado según la bibliografía analizada (López et al., 2002: pp. 2521-2529).

El valor de IC50 para acetilcolinesterasa del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* con cosolvente A, se calculó a partir de la ecuación de la recta que se obtuvo del análisis de las concentraciones del extracto alcaloidal frente a su porcentaje de inhibición, con un valor de R² de 0.99.

Tabla 5-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* en dilución 1 sobre la enzima AChE y su respectivo R²

Resultados	IC 50 (µg/ml)	R²
Galantamina	0.41 ± 0.16	0.94
<i>Crinum kunthianum</i>	47.68 ± 1.79	0.99

Realizado por: Gabriela Cando

Los resultados presentes en la tabla 5-3, muestran que el extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* tiene en valor IC50 de 47.68 ± 1.79 µg/ml, esta es la concentración que requiere para inhibir un 50% la enzima acetilcolinesterasa, también se puede observar que este valor es superior frente a 0.41 ± 0.16 µg/ml del control galantamina, sin embargo, presenta una actividad media-alta frente a la enzima.

3.3.1.2. Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* sobre butirilcolinesterasa

Primer análisis

Para el análisis del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* sobre BuChE se emplearon las concentraciones: 100, 50, 10 y 1 µg/ml, las mismas presentan los siguientes resultados (tabla 6-3):

Tabla 6-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* (Primer análisis)

Concentración del extracto alcaloidal (µg/ml)	Porcentaje de inhibición sobre BuChE
100	73.93 ± 2.18
50	61.32 ± 4.21
10	25.87 ± 7.83
1	-2.34 ± 11.68

Realizado por: Gabriela Cando

Los datos analizados son el análisis de tres repeticiones consecutivas, muestran que en la concentración de 100 µg/ml se obtuvo un porcentaje máximo de inhibición del 71.56%, las concentraciones de 50, 10 y 1 µg/ml presentaron una inhibición de 60, 23 y -4 respectivamente. Con estos resultados obtenidos se logró incluir nuevas concentraciones con el fin de ajustar la curva de inhibición a la de línea de tendencia logarítmica y determinar el valor de IC50.

Segundo análisis

Con los resultados del análisis anterior, se emplean las concentraciones de: 125, 100, 75, 50, 25, 10 y 5 µg/ml, dando como resultado los siguientes porcentajes de inhibición que se muestran en la tabla 7-3:

Tabla 7-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* (Segundo análisis)

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de inhibición de AChE
125	73.56 ± 1.40
100	68.93 ± 0.36
75	62.67 ± 2.14
50	55.67 ± 1.00
25	37.97 ± 1.70
10	14.70 ± 5.58
5	$-3,91 \pm 5.68$

Realizado por: Gabriela Cando

Los resultados obtenidos son el promedio de tres repeticiones consecutivas, se puede observar que el extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* a una concentración del 125 $\mu\text{g/ml}$ es capaz de inhibir la enzima butirilcolinesterasa en un 73.56 % máximo. También se logró obtener cuatro valores por encima del 50% promedio de inhibición y tres valores inferiores, lo que permite validar el ensayo como apropiado según la bibliografía analizada, ya que en él nos indica que debe haber dos valores por encima y dos valores por debajo del 50 % de inhibición (López et al., 2002; pp. 2521-2529).

El valor de IC₅₀ para BuChE del extracto alcaloidal con cosolvente A, se calculó a partir de la ecuación de la recta que se obtuvo en función del análisis de las concentraciones del extracto alcaloidal frente a su porcentaje de inhibición con un valor R² de 0.99.

Tabla 8-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* en dilución 1 sobre la enzima BuChE y su respectivo R²

Resultados	IC 50 ($\mu\text{g/ml}$)	R ²
Galantamina	16.29 ± 1.71	0.99
<i>Crinum kunthianum</i>	46.14 ± 3.51	0.99

Realizado por: Gabriela Cando

Para butirilcolinesterasa el extracto de alcaloides de *Crinum kunthianum* presenta un valor IC50 de $46.14 \pm 3.51 \mu\text{g/ml}$, esta es la concentración que requiere para inhibir un 50% la enzima. Dicho valor frente al control es superior representando una actividad media-alta.

3.3.2. Segunda parte: Actividad inhibitoria enzimática del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* en dilución 2

En esta parte se empleó el cosolvente B a concentración 1 con el cual se aprecia visualmente que la muestra madre presenta una mejor dilución, respecto a la que se realizó solo con cosolvente A, se observa más translúcida. A partir de la madre se tomaron diluciones con las mismas concentraciones empleadas en la parte anterior para los ensayos de AChE y BuChE, con el objetivo de añadir la curva de tendencia logarítmica y así obtener la ecuación de la curva que nos permite calcular el valor de IC50 del extracto alcaloidal.

3.3.2.1. Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* sobre acetilcolinesterasa

Para el análisis de la actividad inhibitoria usando cosolvente B a concentración 1 se tomaron las mismas concentraciones que se usaron al realizar la dilución solo con cosolvente A, ya que a estas concentraciones se comparó la actividad que presentan en cada caso.

Las concentraciones empleadas fueron 150, 100, 75, 50, 25 y 10 $\mu\text{g/ml}$, dando como resultado los siguientes porcentajes de inhibición.

Tabla 9-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum*, dilución 2

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de inhibición de AChE
150	$77,4904602 \pm 4.91$
100	$70,7320115 \pm 1.01$
75	$63,2486594 \pm 1.61$
50	$54,7641851 \pm 2.48$

25	37,5796234 ± 2.29
10	12,9809203 ± 5.19

Realizado por: Gabriela Cando

Los datos expuestos en la tabla 9-3 son el resultado de tres repeticiones consecutivas, en las cuales se puede apreciar que en la concentración de 150 µg/ml se obtuvo un porcentaje de inhibición máximo del 77%, por otra parte, el valor de inhibición media se encuentra entre las concentraciones de 50 y 25 µg/ml.

Los datos presentados se validan como apropiado ya que se logró obtener dos valores por encima del 50 % de inhibición y dos valores por debajo del mismo (López et al., 2002: pp. 2521-2529).

El valor de IC50 para AChE del extracto alcaloidal se calculó a partir de la ecuación de la recta que se obtuvo del análisis de las concentraciones del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* frente a su porcentaje de inhibición, tras realizar tres repeticiones consecutivas de la actividad inhibitoria.

Tabla 10-3: Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *Crinum kunthianum* en dilución 2 sobre la enzima AChE y su respectivo R²

Resultados	IC 50 (µg/ml)	R ²
Galantamina	0.49 ± 0.20	0.93
<i>Crinum kunthianum</i>	44.26 ± 0.64	0.99

Realizado por: Gabriela Cando

Los resultados mostrados indican una actividad del extracto de alcaloides de *Crinum kunthianum* frente a AChE de 44.26 ± 0.64, siendo superior al compuesto de referencia galantamina que presenta un IC50 de 0.49 ± 0.20, pero aun así se obtuvo un IC50 representativo.

3.3.2.2. Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* sobre butirilcolinesterasa

Para el análisis de butirilcolinesterasa usando cosolvente B a concentración 1 se emplearon las concentraciones 125, 100, 75, 50, 25, 10 y 5 $\mu\text{g/ml}$, dando como resultado los porcentajes de inhibición mostrados en la tabla 11-3.

Tabla 11-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum*, dilución 2.

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de inhibición de BuChE
125	73,2824455 \pm 4.22
100	67,6250549 \pm 2.62
75	62,7631085 \pm 2.66
50	53,0509788 \pm 0.69
25	38,3515612 \pm 4.01
10	19,5506684 \pm 4.40
5	0,41431898 \pm 7.93

Realizado por: Gabriela Cando

En los resultados mostrados se puede observar que a una concentración de 125 $\mu\text{g/ml}$ es capaz de inhibir un 73% máximo la enzima butirilcolinesterasa, también se logró obtener dos valores por encima y dos valores por debajo del cincuenta % de inhibición siendo las concentraciones de 50, y 75 $\mu\text{g/ml}$ las que son superiores a este valor y las concentraciones de 25 y 10 $\mu\text{g/ml}$ son las inferiores.

Tras realizar tres repeticiones consecutivas de la actividad inhibitoria para BuChE se calculó la ecuación de la recta que se obtiene del análisis de las concentraciones del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* en la dilución 2 en función de su porcentaje de inhibición. Con el valor de la ecuación de la recta se calculó el IC50.

Tabla 12-3: Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *Crinum kunthianum* en dilución 2 sobre la enzima BuChE y su respectivo R²

Resultados	IC 50 (µg/ml)	R ²
Galantamina	17.12 ± 1.04	0.99
<i>Crinum kunthianum</i>	43.21 ± 0.63	0.99

Realizado por: Gabriela Cando

El extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* en su dilución 2 frente a butirilcolinesterasa muestra un valor de IC50 de 43.21 ± 0.63 %, concentración requerida para inhibir la enzima un 50%.

3.3.3. Tercera parte: Actividad inhibitoria enzimática del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* en dilución 3

A continuación, se muestran los resultados de la dilución del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* empleando una dilución con el cosolvente B a concentración 2. Visualmente se observa que la muestra madre presenta menos sedimento que en la dilución con cosolvente B concentración 1 y en la dilución que solo cosolvente A.

3.3.3.1. Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* sobre acetilcolinesterasa

En base a los análisis anteriores para acetilcolinesterasa las concentraciones del extracto usadas fueron: 150, 100, 75, 50, 25, y 10 µg/ml. Obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 13-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum*, dilución 3.

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de inhibición de AChE
150	$76,0085979 \pm 2.56$
100	$70,0660222 \pm 2.55$
75	$63,9705034 \pm 1.36$
50	$53,5115395 \pm 0.64$
25	$35,777251 \pm 2.01$
10	$12,9317207 \pm 4.13$

Realizado por: Gabriela Cando

Los datos obtenidos son el resultado de tres repeticiones consecutivas donde se puede concluir que a una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$ existe un porcentaje de inhibición máximo de 76%, por otra parte, se logró obtener los dos valores por encima y dos por debajo del 50% de inhibición, esto da paso a validar las concentraciones como adecuadas para obtener una buena ecuación de la recta y así obtener el valor de IC50.

El valor de IC50 para AChE se calculó a partir de la ecuación de la recta que se obtuvo del análisis de las concentraciones del extracto alcaloidal frente al porcentaje de inhibición, obtenidos de tres repeticiones consecutivas.

Tabla 14-3: Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *Crinum kunthianum* en dilución 3 sobre la enzima AChE y su respectivo R^2

Resultados	IC 50 ($\mu\text{g/ml}$)	R^2
Galantamina	0.56 ± 0.26	0.92
<i>Crinum kunthianum</i>	45.16 ± 2.01	0.99

Realizado por: Gabriela Cando

Los resultados presentes en la tabla 14-3 muestran que el extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* tiene un valor IC50 de 45.16 ± 2.01 siendo este valor mayor al compuesto de referencia galantamina que es de 0.56 ± 0.92 .

3.3.3.2. Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* sobre butirilcolinesterasa

Para el análisis de butirilcolinesterasa se usaron las concentraciones del extracto basadas en los ensayos anteriores, siendo estas las siguientes: 125, 100, 75, 50, 25, 10 y 5 $\mu\text{g/ml}$, dando los siguientes resultados:

Tabla 15-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum*, dilución 3.

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de inhibición de BuChE
125	$73,8050025 \pm 2.06$
100	$69,5594379 \pm 2.26$
75	$62,4742144 \pm 2.33$
50	$53,9096173 \pm 2.23$
25	$41,9031301 \pm 2.37$
10	$24,3434442 \pm 2.93$
5	$6,53198832 \pm 3.96$

Realizado por: Gabriela Cando

Los resultados mostrados en la tabla 15-3 son el promedio de tres repeticiones consecutivas en la cual se puede observar que el extracto alcaloidal en la dilución con cosolvente B a concentración 2 presenta una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$ inhibe la enzima un 73.80% máximo.

El valor de IC50 para BuChE del extracto con cosolvente A + cosolvente B a concentración 2 se obtuvo del resultado de la ecuación de la curva que se calculó a partir de las concentraciones del

extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* frente el porcentaje de inhibición y su valor de R^2 es 0.99.

Tabla 16-3: Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *Crinum kunthianum* en dilución 3 sobre la enzima BuChE y su respectivo R^2

Resultados	IC 50 ($\mu\text{g/ml}$)	R^2
Galantamina	15.36 ± 0.98	0.99
<i>Crinum kunthianum</i>	39.19 ± 2.03	0.99

Realizado por: Gabriela Cando

En la tabla 16-3 se observa que el extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* tienen un valor de IC50 de 39.19 ± 2.03 , esta es la concentración que el extracto requiere para inhibir el 50% de la enzima butirilcolinesterasa.

3.3.4. Cuarta parte: Análisis de las diferentes diluciones

El objetivo de usar el cosolvente B fue comparar los resultados de la actividad inhibitoria que presentan las diluciones de los alcaloides de *Crinum kunthianum* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en presencia de cosolvente A y cosolvente B.

3.3.4.1. Acetilcolinesterasa

Los datos expuestos en la tabla 17-3 nos muestran los resultados de las tres diluciones usadas para conocer la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa frente al extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum*, se realizó tres repeticiones consecutivas en cada caso.

Tabla 17-3: Resultados de las tres diferentes diluciones analizadas para acetilcolinesterasa

Resultados	Dilución 1		Dilución 2		Dilución 3	
	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	R ²	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	R ²	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	R ²
Galantamina	0.41 \pm 0.16	0.94	0.49 \pm 0.20	0.93	0.56 \pm 0.26	0.92
<i>Crinum kunthianum</i>	47.68 \pm 1.7	0.99	44.26 \pm 0.64	0.99	45.16 \pm 2.01	0.99

Realizado por: Gabriela Cando

En las tres diluciones realizadas se puede presenciar que los alcaloides de *Crinum kunthianum* en dilución 1 presenta un IC50 de 47.68 \pm 1.7 $\mu\text{g/ml}$; al usar la dilución 2 se observa un IC50 de 44.26 \pm 0.64 $\mu\text{g/ml}$ y al usar la dilución 3 se obtiene un valor IC50 de 45.16 \pm 2.01 $\mu\text{g/ml}$. No existe mucha variación entre los resultados mostrados para acetilcolinesterasa, pero al añadir el cosolvente mejora muy poco la actividad inhibitoria.

El extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* visiblemente presentó un aspecto muy seco y terroso, se considera que en este caso el cosolvente A y el cosolvente B cumplen la misma función ya que la muestra de alcaloides se encontraba muy seca, no era gomosa como para decir que contenía agua y pueda facilitar la dilución. Es por ello que los valores de IC50 no varían drásticamente.

Para el análisis de los resultados en el caso de acetilcolinesterasa se utiliza la dilución 2, que dio como resultado IC50 de 44.26 \pm 0.64 $\mu\text{g/ml}$ esta es la concentración que requiere se para inhibir el 50% la enzima acetilcolinesterasa, también se puede observar que este valor es superior frente a 0.49 \pm 0.20 $\mu\text{g/ml}$ del control galantamina.

Los resultados obtenidos de *Crinum kunthianum* no se puede validar con otros ensayos ya que no existe bibliografía sobre el análisis en dicha especie.

En cuanto a otros géneros se ha observado que en estudios realizados sobre la familia Amaryllidaceae, especies vegetales como *Crinum x powellii* presentan actividad débil, *Crinum erubescens* Aiton califica una actividad moderada y las especies que se han considerado con actividad alta son *Crinum x amabile* (Carrasco, 2017: p. 44), *Crinum moorei*, *Crinum jagus* (Cavallaro 2015: p. 404), *Crinum glaucum* y *Crinum zeylanicum* al presentar valores IC50 relativamente bajo frente a la enzima acetilcolinesterasa (Calderón et al., 2010: pp. 12-13). Todas las especies mencionadas

han sido estudiadas debido a su uso en medicina tradicional para la pérdida de la memoria y otras patologías mentales asociadas al envejecimiento (Houghton et al., 2004).

Al comparar *Crinum kunthianum* frente a otras especies de Amaryllidaceae como: *Narcissus cv. Breath of Spring*, *Narcissus pseudonarcissus*, *H. littoralis* que presentan un IC50 de 63.11, 78.22 y 90 µg/ml respectivamente, se puede apreciar una ligera mejoría en el caso de la especie analizada en este trabajo (Hammoda et al., 2011: pp. 1-2).

Así mismo se observó en otros estudios especies que presentan mejor actividades inhibitoria, por ejemplo: *Ammocharis coranica* IC50 14.3 ± 0.50 µg/ml y *Galanthus rizehensis* IC50 12.94 µg/ml (Saricaya et al, 2013; Elisha et al, 2013).

3.3.4.2. Butirilcolinesterasa

En el caso de butirilcolinesterasa también se usaron tres diluciones de las cuales los resultados se muestran en la tabla 18-3.

Tabla 18-3: Resultados de las tres diferentes diluciones analizadas para butirilcolinesterasa

Resultados	Dilución 1		Dilución 2		Dilución 3	
	IC50 (µg/ml)	R ²	IC50 (µg/ml)	R ²	IC50 (µg/ml)	R ²
Galantamina	16.29 ± 1.71	0.99	17.12 ± 1.04	0.99	15.36 ± 0.98	0.99
<i>Crinum kunthianum</i>	46.14 ± 3.51	0.99	43.21 ± 0.63	0.99	39.14 ± 2.03	0.99

Realizado por: Gabriela Cando

En las tres diluciones realizadas a los alcaloides de *Crinum kunthianum* se puede observar que la dilución 1 presenta un IC50 de 46.14 ± 3.51 µg/ml, en la dilución 2 se observa un IC50 de 43.21 ± 0.63 µg/ml y al usar la dilución 3 se tiene un valor IC50 de 39.14 ± 2.03 µg/ml.

Se puede apreciar un ligero cambio en la actividad, ya que los valores van disminuyendo en el grado que se aumenta el cosolvente es decir, al usar la dilución 1 se observa un valor IC 50 de 46.14 ± 3.51 µg/ml, al utilizar la dilución 2 el valor disminuye un poco y al trabajar con la dilución 3 el

IC50 disminuyó aún más, en otras palabras la actividad inhibitoria de los alcaloides de *Crinum kunthianum* sobre la enzima butirilcolinesterasa aumenta al usar un cosolvente.

Para el caso de butirilcolinesterasa se recomienda usar el cosolvente para los alcaloides del extracto de la planta, de esta forma se obtienen valores con un mejor IC50.

Para el caso de butirilcolinesterasa, el extracto de alcaloides de *Crinum kunthianum* presenta un mejor valor IC50 que fue 39.14 ± 2.03 $\mu\text{g/ml}$, esta es la concentración que requiere para inhibir un 50% la enzima butirilcolinesterasa. Dicho valor frente al control es superior, pero también presenta una actividad media-alta al igual que el caso de acetilcolinesterasa.

Se han desarrollado muy pocas investigaciones sobre inhibición de BuChE en otras especies de la familia Amaryllidaceae, uno de los estudios que se llevó a cabo en la especie *Zephyranthes grandiflora* presenta un IC50 de 356 ± 9.3 $\mu\text{g/ml}$ considerándose una actividad realmente baja en comparación a *Crinum kunthianum* (Cahlíková et al, 2011: p. 577).

En un estudio realizado por Králové, se observa que en la especie *Nerie filamentosa* la inhibición presenciada sobre butirilcolinesterasa es 13.0 ± 0.7 $\mu\text{g/ml}$, este resultado es mucho mejor al obtenido en *Crinum kunthianum* y la especie *Nerine undulata* presenta un IC50 33.9 ± 1.9 $\mu\text{g/ml}$, este IC50 es semejante al analizado en este trabajo, esto se puede dar por la presencia del alcaloide Bowdensina en ambas especies (Králové, 2018, p.31-33).

Sin duda se han realizado múltiples estudios sobre especies de la familia Amaryllidaceae al ser una fuente potente del alcaloide galantamina, encontrándose con especies que presentan diferente actividad inhibitoria desde nulas hasta muy activas, esto fortalece el estudio de nuevas especies para el hallazgo de nuevas fuentes de galantamina útiles para inhibir la enzima acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en el tratamiento paliativo del Alzheimer.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo el extracto alcaloidal a partir de bulbos de la especie vegetal *Crinum kunthianum* mediante un protocolo basado en uso de solventes orgánicos y cambios de pH, obteniendo un rendimiento de 1.899%.
- Mediante el análisis de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas se identificaron 11 alcaloides en el bulbo de *Crinum kunthianum*, siendo bowdensina el compuesto más abundante seguido de licorina. y en menor abundancia los alcaloides anhidrolicorina, 1-O-acetillicorina y 2-O-acetillicorina.
- Se evaluó la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* sobre acetilcolinesterasa, variando la concentración del cosolvente B, observando que no hubo una influencia considerable del porcentaje de la actividad inhibitoria, no obstante, la mejor actividad fue de la dilución del cosolvente B a concentración 1, dando un IC₅₀ de 44.26 ± 0.64 .
- En cuanto a la actividad inhibitoria de butirilcolinesterasa se observó una mejor actividad inhibitoria al usar el cosolvente a concentración 2 presentando un IC₅₀ de 39.14 ± 2.03 .

RECOMENDACIONES

- *Crinum kunthianum* al ser una especie vegetal abundante en el territorio ecuatoriano (costa y la amazonia), sería recomendable realizar estudios de las especies de distintas localidades ya que los factores ambientales pueden alterar la composición de la planta y la actividad inhibitoria.
- Se recomienda la investigación de nuevas fuentes de Amaryllidaceae que presenten galantamina en su estructura, ya que este es el compuesto que ha presentado una mayor actividad frente a las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.
- La familia Amaryllidaceae han sido objeto de estudio por presentar sinnúmero de alcaloides estructuralmente diversos, estos poseen un amplio espectro de actividad biológica como antitumorales, antivirales, inhibidores de colinesterasas, entre otros. Es por ello que es muy importante continuar con el estudio de las especies de Amaryllidaceae con el fin de encontrar nuevas fuentes de metabolitos útiles para el tratamiento de diversas enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, D; et al. *La enfermedad de Alzheimer, diagnóstico y tratamiento: una perspectiva latinoamericana* [en línea]. Distrito Federal-México: Editorial Médica Panamericana, 2012. [Consulta: 23 febrero 2019]. Disponible en: <http://www.renacen.com/pdf/medicos-novedades/LaEnfermedadDeAlzheimer.pdf>

ACOSTA, K; et al. "Identification of the alkaloids of *Stenomesson aurantiacum* (KUNT)., an Amaryllidaceae species from the ecuadorian andes" *PharmacologyOnLine* [en línea], 2014, pp. 178-183. [Consulta: 22 diciembre 2018]. ISSN 1827-8620. Disponible en: file:///C:/Users/User/Downloads/ALKALOIDS%20STENOMESSON%20AURANTIACUM_ACO STA.pdf

ALBERCA, R. Tratamiento de las alteraciones conductuales en la enfermedad de Alzheimer y en otros procesos neurológicos. Madrid-España: Editorial Médica Panamericana, 2001, p. 66

ALBENDÍN GARCÍA, María Gemma. Caracterización de la colinesterasa presente en cerebro de músculo de dorada y estudios de su inhibición por insecticidas organofosforados [en línea] (Memoria). (Doctorado) Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, España. 2009. Pp. 57-58. [Consulta: 22 diciembre 2018]. Disponible en: http://rodin.uca.es/xmlui/bitstream/handle/10498/15731/Tes_2009_22.pdf

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2015. Asociación de Alzheimer. Asociación de Alzheimer. [En línea], 2015. [Consulta: 22 febrero 2019]. Disponible: https://alz.org/alzheimers-dementia/what-is-alzheimers?lang=es-MX&utm_source=google&utm_medium=search&utm_campaign=google_grants&set.custom.wt=grants&utm_content=espanol&gclid=CjwKCAjw9-HZBRAwEiwAGw0QcdxjWuIGcMDdh_5Ji_GenAJNggJTVAQkIVMO5aCAMBx8_IUpBOQKLh

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2018. Asociación de Alzheimer. Asociación de Alzheimer. [En línea], 2018. [Consulta: 26 diciembre 2018]. Disponible: <https://www.alz.org/alzheimer-dementia/etapas?lang=es-MX>

ANDRADE J; et al. “Alcaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity” *Scielo* [en línea], 2012, (Naucalpan de Juárez) 40(2), p. 92. [Consulta: 01 mayo 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-59432012000200004

APEAD. Asociacion Peruana de Enfermedad de Alzheimer y otras Demencias. Asociacion Peruana de Enfermedad de Alzheimer y otras Demencias. [En línea] 2012. [Consulta: 12 enero 2019]. Disponible en: <https://www.alzheimerperu.org/tratamientos-enfermedad-alzheimer.html>

ASILI, N. *Vida plena en la vejez* [En línea]. México DF: PAX México, 2006. [Consulta: 27 diciembre 2018]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=v6HDqgUoE6gC&pg=PA69&dq=hipotesis+amiloide+alzheimer&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi_h6Ppr9TcAhXst1kKHSbyCFMQ6AEIJjAA#v=onepage&q=hipotesis%20amiloide%20alzheimer&f=false

ANWAR, H.; HANSEN T. “First total synthesis of powelline”. *Synlett* [en línea], 2008, (Oslo-Noruega) [Consulta: 01 mayo 2019]. Disponible en: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0028-1083526>

BALSLEV, H; et al. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Quito, 2008. pp. 16-18

Bonifacino, M. *Laboratorio de Sistemática de Plantas Vasculares*. [en línea], 2017. [Consulta: 16 febrero 2019]. Disponible en: http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/amaryllidacea_amaryllidoideae.html

BASTIDAS, Jaume; et al. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids [en línea]. Barcelona-España: Transworld Research Network, 2011. [Consulta: 19 enero 2019]. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.913.4190&rep=rep1&type=pdf>

BERGOÑON, S. Aislamiento y caracterización química de alcaloides de tipo Amaryllidaceae. Producción de Galantamina por cultivos de *IN VITRO* de *Narcissus confusus* [en línea] Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia, Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología. Barcelona-España. 1994. Pp 160-164 [Consulta: 16 febrero 2019]. Disponible en: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2629/02.SBF_2de2.pdf?sequence=2

CABEZAS, Fabio; et al. “Alcaloides y actividad biológica en Eucharis amazónica, *E. grandiflora*, *Caliphruria subedentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de Amaryllidaceae”

Redalyc.org [en línea], 2007, (Colombia), pp. 237-239. [Consulta: 22 febrero 2019]. ISSN 0122-1701. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84903363>

CABEZAS, Fabio; et al. Algunas especies colombianas de Amaryllidaceae como fuente. [en línea], 2013, (Barcelona), pp. 1-3. [Consulta: 22 febrero 2019]. Disponible en: http://www.actaf.co.cu/index.php?option=com_mtree&task=att_download&link_id=829&cf_id=24

CAHLÍKOVÁ L; et al. “Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC-MS and their cholinesterase activity” *Revista Brasileira de Farmacognosia* [en línea], 2011, (República Checa) 21(4), pp. 577. [Consulta: 30 abril 2019]. ISSN 0102-695X. disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v21n4/aop8711.pdf>

CALDERÓN, A; et al. “Screening of plants of Amaryllidaceae and related families from Panama as sources of acetylcholinesterase inhibitors”. *PubMed* [en línea], 2010, (Panamá) 48(9), pp: 12-13. [Consulta: 30 abril 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20731549>

CARRASCO ANGELO. Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile* [en línea] (trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. (Riobamba-Ecuador). 2017. pp. 34-35 y44. [Consulta: 29 de abril 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7925/1/56T00741.pdf>

CARRASCO, M. *Comprender la enfermedad del Alzheimer* [en línea]. España, 2012. [Consulta: 12 enero 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=9G0YLyA1eIMC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=true>

CARRETERO, M. “Los inhibidores de la acetilcolinesterasa en el tratamiento del Alzheimer”. *ELSEVIER* [en línea], 2003, (España) 22 (7), pp. 1-3. [Consulta: 5 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-inhibidores-acetilcolinesterasa-el-tratamiento-13050017>

CASTELLANOS CASTILLO, Fabio Andrés. Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura-actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del Caribe colombiano [en línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Colombia. 2014. pp. 2-5. [consulta: 22 febrero 2019]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/39404/1/FabioAndresCastellanosC.2014.pdf>

CAVALLARO VALERIA. Plantas de la región como fuente potencial de metabolitos secundarios inhibidores de colinesterasa [en línea] (Tesis de doctor en química). Universidad Nacional del Sur. (Bahía Blanca- Argentina). 2015. P. 181. [Consulta: 29 de abril 2019]. Disponible en: <http://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/123456789/2486/1/Tesis%20doctoral%20Cavallaro%20Valeria.pdf>

CYTED. La Biodiversidad Iberoamericana como Fuente de Recursos Naturales para su Explotación Sostenible (BIFRENES). 2016 [Consulta: 05 diciembre 2018]. Disponible en: http://www.cyted.org/?q=es/detalle_proyecto&un=909

DIMITRI, M. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería [en línea]. Buenos Aires-Argentina: ACME S.A.C.I, 1987.

DOMÍNGUEZ, Pilar; et al. *Arteterapia para enfermos con Alzheimer.* [en línea] Huelva-España: uhu.es publicaciones, 2018. [Consulta: 27 diciembre 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=1x5aDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=true>

ELISHA, I; et al. “Acetylcholinesterase inhibitory effects of the bolb of *Ammocharis coranica* (Amaryllidaceae) and its active constituent lycorine”. *ELSEVIER* [en línea], 2013, (Sur África) 85(2013), pp. 44-46. [Consulta: 30 abril 2019]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/81988828.pdf>

ELLMAN, George; et al. “Una nueva y rápida determinación colorimétrica de la actividad de acetilcolinesterasa”. *Biochemical pharmacology* [en línea], 1961, (Estados Unidos) 7(2), pp. 88-89. [Consulta: 03 febrero 2019]. ISSN 00062952. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.455.7880&rep=rep1&type=pdf>

EVIDENTE A; et al. “Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivates: discovery of novel leads for anticancer drug desing” *PubMed* [en línea], 2009, (Nuevo México) 75(5), p. 502. [Consulta: 01 mayo 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3125136/?report=classic>

FERIA, M. Alzheimer: una experiencia humana [en línea]. México DF: PAX México, 2005. [Consulta: 19 enero 2019]. Disponible en:

<https://books.google.com.ec/books?id=zXSsGUULOe4C&printsec=frontcover&dq=etiologia+de+a+enfermedad+alzheimer&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiNioa2idTcAhVDq1kKHc8kB1wQ6AEI-MTAC#v=onepage&q=etiologia%20de%20la%20enfermedad%20alzheimer&f=true>

FOROSECUADOR. 2018. Foros Ecuador.ec. Foros Ecuador.ec. [En línea] 01 de Febrero de 2018. <http://www.forosecuador.ec/forum/ecuador/educaci%C3%B3n-y-ciencia/143260-biodiversidad-del-ecuador-resumen-y-caracter%C3%ADsticas-de-su-flora-y-fauna>.

GANDÍA, Luis; et al. “Acetilcolinesterásicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer”. *Revista de neurología* [en línea], 2006, 48(8), p. 474. [Consulta: 19 enero 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/7154029_Anticholinesterases_in_the_treatment_of_Alzheimer's_disease

GARZÓN, S; et al. “Características cognitivas y oculares en enfermedad de Alzheimer”. *Scielo*, [en línea], 2018, (Colombia) 16(29). [Consulta: 23 febrero 2019]. ISSN 1794-2470. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702018000100101#B1

GASTALDI, C; et al. “Alcaloides de *Crinum erubescens* Aiton”. *Revista Árabe de química*, [en línea], 2015. [Consulta: 23 febrero 2019]. Disponible en: https://www.academia.edu/14777950/Alkaloids_from_Crinum_erubescens_Aiton

GAYLORD CHEMICAL COMPANY, L.L.C. *Dimetilsulfóxido datos de la solubilidad* [en línea]. Tuscaloosa: 2014. Primera página. [Consulta: 30 abril 2019]. Disponible en: <https://www.gaylordchemical.com/wp-content/uploads/2015/08/GC-Literature-102-B-ESP-Low.pdf>

GONZÁLEZ, R. *Enfermedad de Alzheimer* [en línea]. Barcelona- España: Masson, 2005. [Consulta: 05 enero 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=Mo5jNBBVGKEC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=true>

GUTIÉRREZ M; & DROGUET M. “La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín intexter* [en línea], 2002, [Consulta: 02 febrero 2019]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/41780740.pdf>

HARRYS, D. *Análisis químico cuantitativo* [en línea]. Tercera. Barcelona- España: Editorial Reveté, 2007. [Consulta: 03 febrero 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=H-8vZYdL70C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=true>

HAMMODA, H; et al. “Acetilcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae plant extracts and their alkaloidal isolates” [en línea], 2011, (Egipto) 25(1). [Consulta: 30 abril 2019]. Disponible:

en:https://www.researchgate.net/publication/291827480_Acetylcholinesterase_inhibitory_activity_of_some_Amaryllidaceae_plant_extract_and_their_alkaloidal_isolates

HERRERA, I; et al. “Malezas y Plantas Exóticas en las Cercanías de una Ciclo-vía en un Área Protegida y Sitio Ramsar (Isla Santay) en la Costa de Ecuador” [en línea], 2018, (Ecuador), pp. 19-22. [Consulta: 22 febrero 2019]. ISSN: 1390-6399. Disponible en: <http://revistas.uees.edu.ec/index.php/IRR/article/view/221/166>

HOUGHTON, P; et al. “Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species”. *PubMed* [en línea], 2004, (Londres) 65(21). [Consulta: 30 abril 2019]. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15501257?fbclid=IwAR1Y2XaLxF5sCIbehdLZtllqW0A6rGMWI6z0RPIrT5oikdAXgoaJrBUo-gg>

ISAACSON, R. *Tratamiento y prevención del Alzheimer* [en línea]. Miami-EE.UU., 2011. [Consulta: 12 enero 2019]. Disponible: <https://books.google.com.ec/books?id=4TCBTz2IzjEC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

ITZHAKI, R. “Corroboration of a Major Role for Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer’s Disease”. *Fortiners in Aging Neuroscience* [en línea], 2018, (Reino Unido), p.2. [Consulta: 05 enero 2019]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2018.00324/full>

KRÁLOVÉ, Hradec & HODULOVÁ, Adela. Alkaloids of the family Amaryllidaceae, genus *Nerine* (Diplomová Práce) [en línea] Universidad de Karlova, Facultad de Farmacia, Departamento de Botánica y Farmacia. (República Checa) 2018. Pp: 15-22 y 31-33 [Consulta: 01 mayo 2019]. Disponible en: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/102894/120316829.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

LA HORA. “El Alzheimer afecta a 59 mil personas en Ecuador” *La Hora*, 2017, (Ecuador).

LEÓN, Susana; et al. Libro Rojo, de las plantas endémicas del Ecuador. 1° ed. Quito-Ecuador: Mariscal, 2012. P. 87

LÓPEZ Ferrari, Ana; & ESPEJO Serna, Adolfo. Flora de Veracruz. Veracruz-México: Arturo Gómez Poma, 2002 pp.1-2

LÓPEZ, O. “Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias”. *Scielo* [en línea], 2015, (Montevideo) 37(2), pp 4-5. [Consulta: 13 enero 2019]. ISSN 1688-423. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S1688-423X2015000200003&script=sci_arttext&tlng=pt

LÓPEZ, S; et al. “Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts”. *Sci-hub*, [en línea], 2002, (Catalunya) 71(21), pp. 2521-2529. [Consulta: 20 marzo 2019]. Disponible en: [https://sci-hub.tw/10.1016/s0024-3205\(02\)02034-9](https://sci-hub.tw/10.1016/s0024-3205(02)02034-9)

MAGILL, B; et al. “*Crinum kunthianum* M.Roem” Tropicos Jardin Botánico de Missouri [en línea], 2016 (Missouri), [Consulta: 22 febrero 2019]. Disponible en: <https://www.gbif.org/occurrence/1260382643>

MARCET, S. “Fuentes de Galantamina para el Alzheimer”. *ConCienciaUniversitaria* [en línea], 2015, (Argentina), p. 3. [Consulta: 19 enero 2019] Disponible en: <http://docplayer.es/15905874-San-juan-subterraneo.html>

MARTÍNEZ, A. *El Alzheimer*. [En línea]. España: Catarata, 2009. [Consulta: 03 diciembre 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=A9S-DNxuX-wC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

MENDOZA, N. *Farmacología Médica*. México: Editorial Médica Panamericana, 2008, p.226.

NAIR, J; et al. “Alcaloides de Amaryllidaceae Sudáfrica: una revisión” *EuropePCM* [en línea], 2013, p. 1 [Consulta: 25 noviembre 2018]. Disponible en: <https://europepmc.org/abstract/med/24273880>

NIÑO J; et al. “Cuantificación de licorina en callos y raíces cultivados in-vitro de *Crinum x powelli* “album” (Amaryllidaceae) por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)” *Redalyc.org* [en línea], 2005, (Pereira-Colombia) 6(29), p. 83. [Consulta: 01 mayo 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/849/84911948010.pdf>

OMS y OPS. 2013. *Demencia una prioridad de salud pública*. Washington, D.C. : s.n., 2013.

ORHAN, I.; SENER, B. “Sustainable use of various Amaryllidaceae plants against Alzheimer’s disease” *Acta Horti* [en línea], 2005, (Thailand) p.3. [Consulta: 25 noviembre 2018]. Disponible en: https://www.actahort.org/books/678/678_7.htm

ORTIZ, Javier; et al. “Alcaloides de *Hippeastrum argentinum* y sus actividades inhibitoras de la colinesterasa: un estudio in vitro y en silico”. *Journal of Natural Products* [En línea], 2016, pp. 1-8. [Consulta: 07 agosto 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27096334>

PACIFIC BULB SOCIETY. *Crinum. PBS WIKI* [en línea], 2016, [Consulta: 04 noviembre 2018]. Disponible en: <https://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Crinum>

PLANTS OF THE WORLD online. *Crinum kunthianum* En la Secretaría de GBIF (2017). GBIF Backbone Taxonomy. Disponible en: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:63943-1>

PARRALES, Adriana, REYES, Miguel, PINE, William. Cromatografía del gas natural [en línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Ciencias de la Tierra. (Guayaquil-Ecuador). 2012. pp.1-3. [Consulta: 23 enero 2019]. Disponible en: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8247/4/T3gascromat.pdf>

PEYRONNET, M. *Prevenir el Alzheimer* [en línea]. Barcelona: Hispano Europea, 2011. [Consulta: 12 enero 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=YY_iJmqqVYQC&printsec=frontcover&dq=tratamiento+enfermedad+de+alzheimer&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiK453B09ffAhXtmuAKHTM_DpkQ6AEITAH#v=onepage&q=tratamiento%20enfermedad%20de%20alzheimer&f=true

PIGNI, Natalia. Biodiversidad y Conservación de Recursos Fitogenéticos. Las Amarillidáceas como Fuente de Productos Bioactivos [en línea] (Doctorado). Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia, Departamento de Productos Naturales. (Barcelona -España). 2013. p. 120. [Consulta: 23 enero 2019]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/handle/10803/120668>

REFAAT, J; et al. “*Crinum*; an endless source of bioactive principles: a review. Part 1- *Crinum* alkaloids: lycorinetype alkaloids”. *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research* [en línea], 2012. (Egypt) 3(7), pp. 1883-1888. [Consulta: 22 febrero 2019]. ISSN 0975-8232.

Disponible

en:

https://www.researchgate.net/profile/John_Refaat/publication/268277186_CRINUM_AN_ENDLESS_SOURCE_OF_BIOACTIVE_PRINCIPLES_A_REVIEW_part_I_Crinum_alkaloids_Lycorine-type_alkaloids/links/5476d74c0cf245eb4372805a.pdf

REFAAT, J; et al. “*Crinum*; una fuente sin fin de principios bioactivos: una revisión, parte ii. Alcaloides de crino: alcaloides de tipo de crinina”. *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research* [en línea], 2012. (Egypt) 3(9), p.3630. [Consulta: 22 febrero 2019]. ISSN 0975-8232. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/209401483/Crinum-An-Endless-Source-of-Bioactive-Principles-a-Review-Part-V>

REFAAT, J; et al. “*Crinum*; an endless source of bioactive principles: a review. Part III- *Crinum* alkaloids: Belladine, galanthamine, lycorinine, tazettine-type alkaloids and other minor types”. *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research* [en línea], 2012. (Egypt) 3(10), p. 3630. [Consulta: 22 febrero 2019]. ISSN 0975-8232. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.299.9804&rep=rep1&type=pdf>

REPETTO, M. *Toxicología avanzada* [en línea]. Madrid-España: Ediciones Díaz de Santos, 1995. [Consulta: 02 febrero 2019]. Disponible en: <https://books.google.es/books?id=opad2FFk9g0C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=true>

SALAZAR, M; et al. Tratado de Psicofarmacología Bases y aplicaciones clínicas. 2º ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2009, p.268

SÁNCHEZ Gustavo; & SALCEDA Rocio. “Enzimas Polifuncionales: El caso de la Acetilcolinesterasa. [en línea], 2008, (México) 27(2), p. 45. [Consulta: 02 febrero 2019]. Disponible en: <http://132.248.9.34/hevila/REBRevistadeeducacionbioquimica/2008/vol27/no2/1.pdf>

SÁNCHEZ, Inés; et al. ALZHEIMER. : Editorial Área de Innovación y Desarrollo, S.L, 2016, pp. 9-10.

SANTACOLOMA Varón, Luz & GRADOS, Jairo. “Evaluación del contenido de metabolitos secundarios en dos especies de plantas forrajeras encontradas en dos pisos térmicos de Colombia”. *Revista de investigación Agraria y Ambiental* [en línea], 2010, (Colombia) 1(1), pp. 31. [Consulta:

05 de febrero 2019]. Disponible en:
<http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/890/891>

SARIKAYA B; et al. “GC-MS investigation and acetilcholinesterase inhibitory activity of *Galanthus rizehensis*” [en línea], 2013, (Tubinga). [Consulta: 30 abril 2019]. Disponible en:
<http://www.znaturforsch.com/s68c/s68c0118.pdf>

SECRETARIA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO Toda una Vida. Quito : s.n., 2017, pp. 53-55.

SENER B; et al. “Production of bioactive alkaloids from turkish gephytes” *IUPAC* [en línea], 1997, (Turquia) 70(11), pp. 3-4. [Consulta: 01 mayo 2019]. Disponible en:
<https://iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/sener.html>

SOLER ABIZANDA, Pedro; & JORDÁN BUESO, Joaquín. Conocer para aceptar. Enfermedad de Alzheimer. 9º ed. Barcelona-España: Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha, 2011 pp. 5-8

SOUSA, María del Socorro. Alcaloides de plantas de la familia Amaryllidaceae: aislamiento, caracterización y ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa. [En línea] (Tesis de doctorado). Universidad Estatal de Campinas, Instituto de química. (Campinas). 2009. pp. 7-10. [Consulta: 25 de febrero 2019]. Disponible en:
http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/249138/1/Silva_MariadoSocorroSousada_D.pdf

STEVENS, P. Angiosperm Phylogeny Website, 2001 [Consulta: 25 de noviembre 2018] Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html>

TARDIOLI, Myriam. 2017. Lifer.com. Lifer.com. [En línea] 2017. [Citado el: 23 febrero de 2019] <https://www.lifer.com/flora-fauna-ecuador/>.

UNNE. *Monocotiledóneas Diversidad Vegetal Biotaxonomía de Spermatofitas* [en línea]. Corrientes-Argentina: FACENA, 2010. [Consulta: 16 febrero 2019]. Disponible en:
<http://exa.unne.edu.ar/carreras/docs/5-%20Monocotiledoneas.pdf>

TRÓPICOS. “Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador” [En línea] [Citado el: 20 de noviembre de 2018] Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/1200722>

TRÓPICOS. “Jardín Botánico de Missouri” [En línea] [Citado el: 20 de octubre de 2018] Disponible en: <http://www.tropicos.org/Specimen/3010188>

VALCÁCEL M; & GÓMEZ A. *Técnicas analíticas de separación* [en línea]. Sant Joan Despí-Barcelona: Editorial Reverté, 1988 [Consulta: 03 febrero 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=WPYYF75dejsC&pg=PA615&dq=cromatografia+de+gases&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjsn5OenJ7gAhWLjFkKHXniCH0Q6AEILTAB#v=onepage&q=cromatografia%20de%20gases&f=true>

ANEXOS

ANEXO A: Recolección del material vegetal, *Crinum kunthianum*



Especie vegetal *Crinum kunthianum* recolectada en la orilla del río Guayas-Guayas

ANEXO B: Preparación del material vegetal



Selección y limpieza de bulbos en buen estado



Cortes de 1.5 cm aproximadamente, listos para someterse a secado



Molienda de los cortes secos del bulbo de *Crinum kunthianum*



Peso de la muestra molida

ANEXO C: Extracción de alcaloides



Extracción de alcaloides del extracto bruto con éter etílico



Filtración de luego de haber colocado sulfato de sodio anhidro y goma arábiga



Concentración de los alcaloides aplicando presión y temperatura



Alcaloides de *Crinum kunthianum*



Extracto puro de alcaloides de *Crinum kunthianum*

ANEXO D: Preparación de reactivos, enzimas, sustratos y muestras



Reactivos usados para la preparación de soluciones



Pesaje de los distintos reactivos



Almacenamiento de PBS y Solución Salina

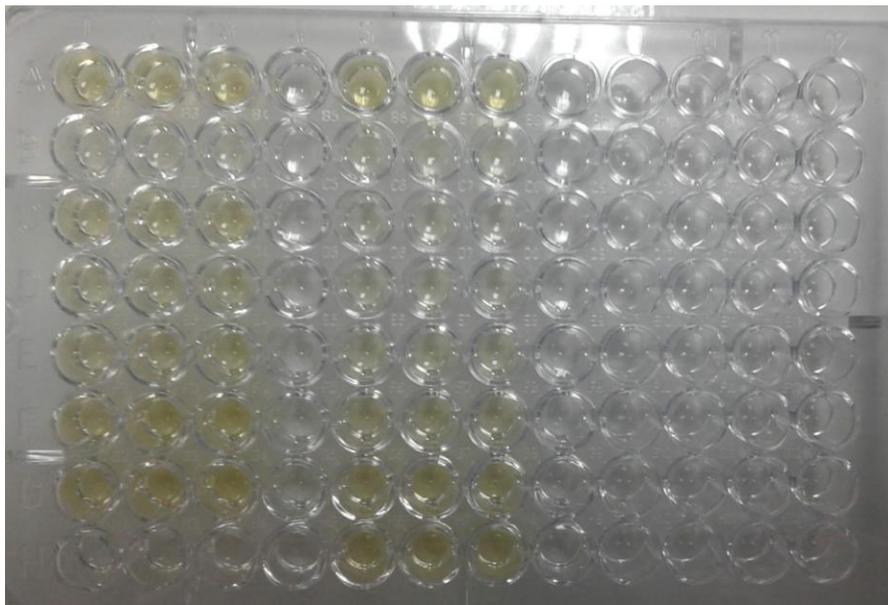


Diluciones de Galantamina, y del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* (BuChE y AChE)



Diluciones del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* usando cosolvente (BuChE y AChE)

ANEXO E: Microplaca de 96 pocillos luego de la lectura



ANEXO F: Curva de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* (tres repeticiones)

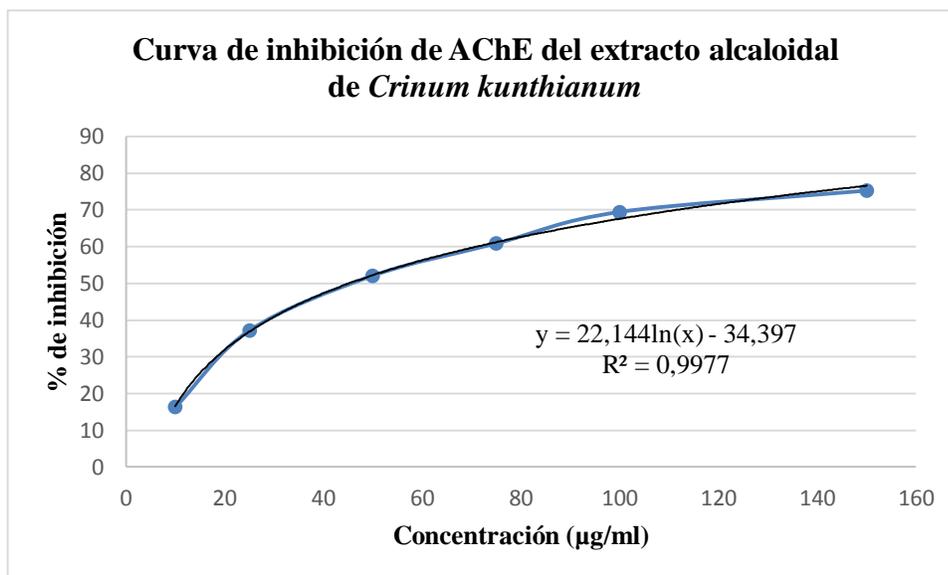


Gráfico 1F. Ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal. Primera repetición

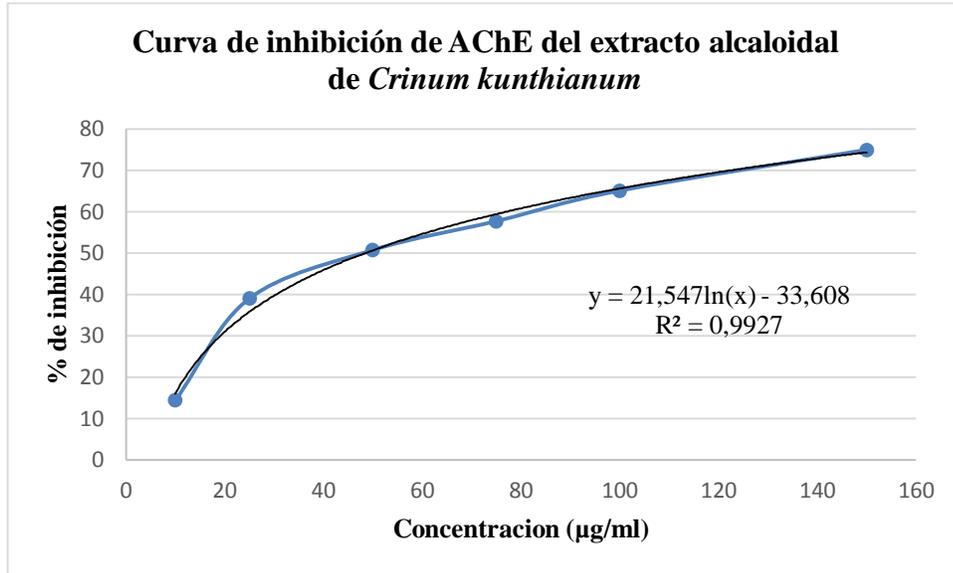


Gráfico 2F. Ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal. Segunda repetición

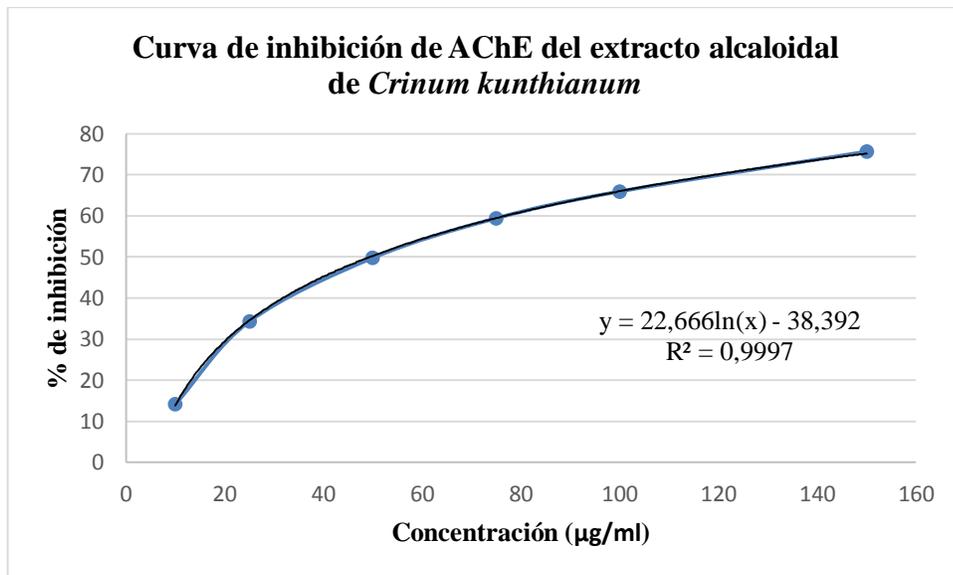


Gráfico 3F. Ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal. Tercera repetición

ANEXO G: Curva de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *Crinum kunthianum* (tres repeticiones)

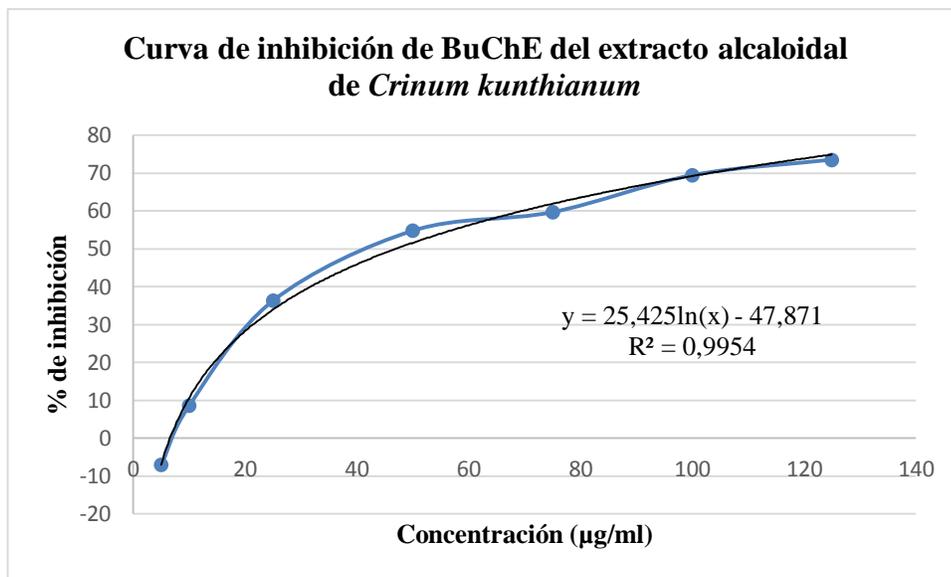


Gráfico 1G. Ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal. Primera repetición

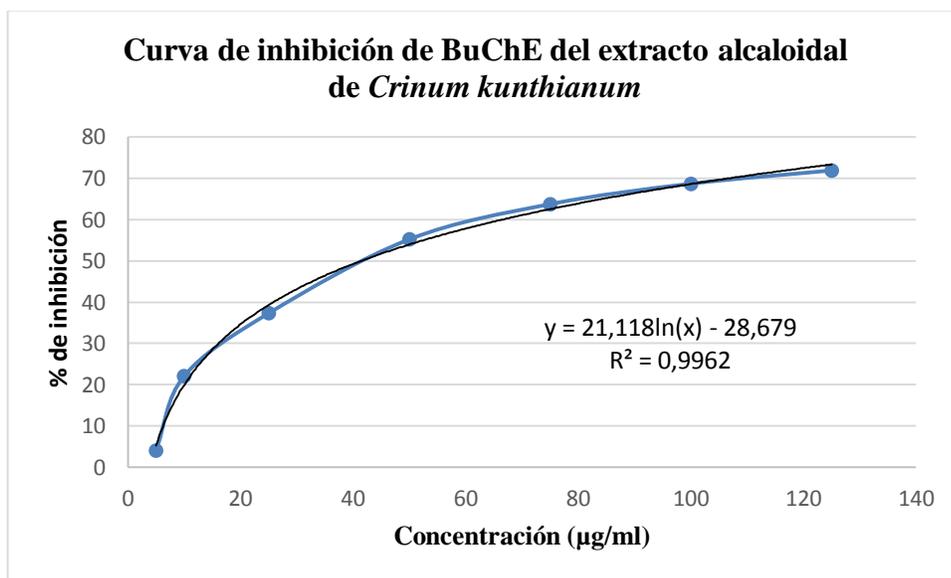


Gráfico 2G. Ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal. Segunda repetición

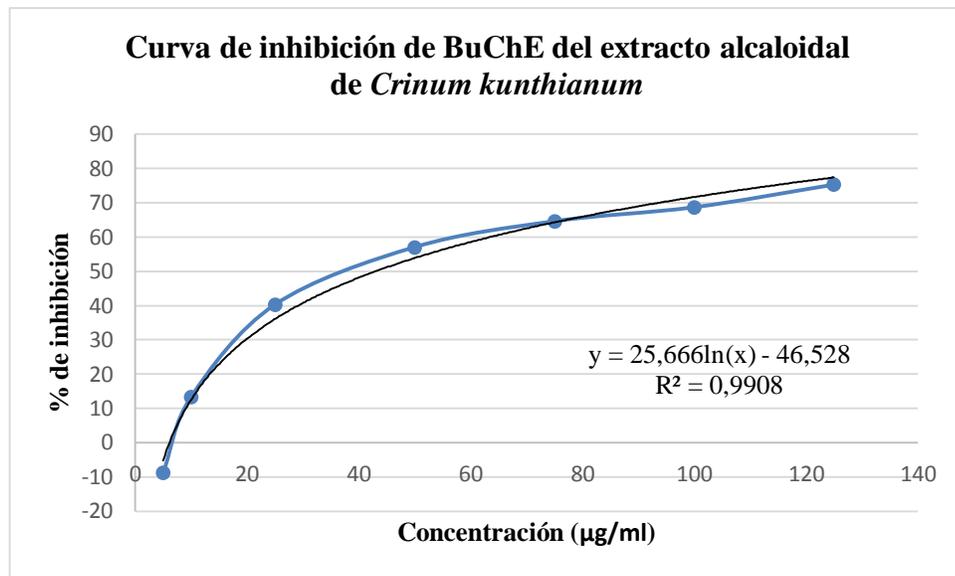


Gráfico 3G. Ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal. Tercera repetición

ANEXO H: Contrato marco de acceso a los recursos genéticos



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 Albuja, 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 / JP / ER / EN

ANEXO I: Guía de movilización de la especie *Crinum kunthianum*

GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y
FAUNA SILVESTRES
Nro. 009-DPAG-LA-2018



Fecha de emisión: viernes 05 de octubre del 2018

Fecha de movilización: 05 de octubre del 2018 (11:H00) Valido hasta: 06 de octubre del 2018 (20:H00)

La Dirección Provincial de Ambiente del Guayas, en base al oficio MAE-UAF-DPAG-2018-4135-E de fecha 05 de octubre del 2018, donde la Srta. Karen Acosta León con cedula de ciudadanía 1003089016, en calidad de Investigadora de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo dentro del Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genético del Proyecto de Investigación Científica denominado "La Biodiversidad de Amaryllidaceae como fuente de Recursos Naturales para su explotación sostenible", autoriza la movilización de muestras de tres plantas enteras de la especie vegetal *Crinum Kunthianum*, de las cuales dos serán llevadas a la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (ESPOCH) y una al herbario de la Universidad Tecnológica Indoamerica en la ciudad de Quito.

La Dirección Provincial de Ambiente del Guayas, **autoriza a:** Lic. Karen Acosta León MSc. la movilización que será **desde:** La Ciudad de Guayaquil **hacia:** La ciudad de Riobamba y hacia la ciudad de Quito respectivamente según el siguiente detalle:

Nombre científico	Nombre común	Descripción del espécimen o parte constitutiva	Cantidad
<i>Crinum Kunthianum</i>	lirios	(Plantas enteras con hojas y flores)	3
XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXX

El espécimen será trasladado bajo la responsabilidad de los centros de manejo involucrados

Observaciones:

Vehículo (Via terrestre, particular) : Camioneta Toyota color blanca, placa PBA-8299

Conductor: Luis Alfredo Cando Ramírez con C.I. 0602107500

Los especímenes van en calidad de:

- Traslado a unidad de manejo ()
- Investigación (X)
- Exhibición itinerante ()
- Comercio ()
- Liberación ()

.....
Leonardo Alava C

BLGO. LEONARDO ALAVA CONTRERAS
ADMINISTRADOR DE ÁREAS PROTEGIDAS Y VIDA SILVESTRE
TECNICO DE PATRIMONIO NATURAL
DIRECCION PROVINCIAL DEL AMBIENTE DEL GUAYAS
MINISTERIO DEL AMBIENTE

.....
Jorge Pesaranda Cando

BLGO. JORGE PESARANDA CANDO
ADMINISTRADOR DE ÁREAS PROTEGIDAS Y VIDA SILVESTRE
COORDINADOR DE ATRIMONIO NATURAL
DIRECCION PROVINCIAL DEL AMBIENTE DEL GUAYAS
MINISTERIO DEL AMBIENTE

Firma:
Jorge Pesaranda Cando