



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA
DE LA FRACCIÓN ALCALOIDAL *Eucharis formosa*
SOBRE ACETILCOLINESTERASA Y
BUTIRILCOLINESTERASA.**

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

AUTOR: RAÚL VICENTE CHAMORRO DOMÍNGUEZ

DIRECTORA: LIC. KAREN LISSETH ACOSTA LEÓN, M. Sc.

Riobamba – Ecuador

2019

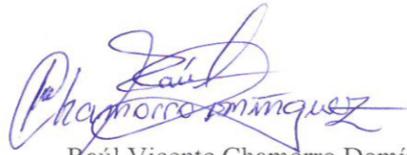
2019, Chamorro Domínguez Raúl Vicente

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.

Yo, Raúl Vicente Chamorro Domínguez, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Riobamba, 20 de noviembre de 2019



Raúl Vicente Chamorro Domínguez

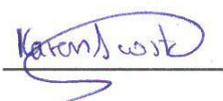
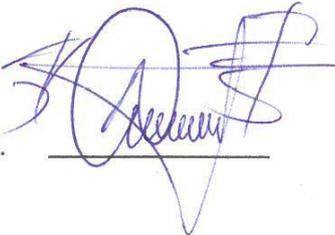
180428334-7

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo experimental “**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA FRACCIÓN ALCALOIDAL *Eucharis formosa* SOBRE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA**” de responsabilidad del Señor Raúl Vicente Chamorro Domínguez, ha sido minuciosamente revisado por los miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizado su presentación.

	FIRMA	FECHA
Lcda. Karen Lisseth Acosta León .,M.Sc.		2019-11-20
DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		
Bqf. Diego Renato Vinuesa Tapia .,M.Sc.		2019-11-20
MIEMBRO DEL TRIBUNAL		
Dr Irvin Ricardo Tubón Usca		2019-11-20
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		

DEDICATORIA

A Dios creador, ya que toda la tierra está llena de su perfección de todo bien material e inmaterial, artífice de nuevas genialidades, respuesta para una vida llena de penalidades, que nos llamó a ser luz en medio de la oscuridad.

A mis padres, promotores de ilusiones que con su amor, esfuerzo y dedicación lograron que este sueño se vuelva realidad. Para mí, ha sido impresionante ver su amor con el que he sido tratado, siempre han estado conmigo sobre todo cuando las cosas han salido mal y ahora que las cosas van bien mucho más, siempre sintiendo su apoyo incondicional, notando la fuerza, pasión con la que encarar el día a día, muestra de abrigo y protección desde el inicio hasta el final.

A mi esposa, Irene Segovia por ser la mujer virtuosa, corona y castillo mío; por ser mi orgullo, llena de sabiduría, dedico este trabajo a ti mi amor.

Finalmente, a quienes con su apoyo estuvieron conmigo, ustedes son grandes no por los logros alcanzados ni por el título obtenido ni por las adversidades que se puedan atravesar; ustedes son grandes por confiar en quien su paso no ha dado a retroceder y eso nadie los puede negar, ustedes me enseñaron que alce la mirada y no cierre los ojos, mira de frente las adversidades nadie esta excepto a las derrotas, es mejor perder algunas batallas en la lucha por nuestros sueños que ser derrotado sin saber siquiera porque se está luchando, cuando hay tormentas los pájaros se esconden pero las águilas vuelan más alto y quien decide volar alto seguro y tiene su casa en la cumbre gracias por todo.

Raúl.

AGRADECIMIENTO

Agradezco profundamente a quienes creyeron y pusieron su fe para que todo esto se vea reflejado en lo que hoy se abarca; por cada palabra, gesto con los que me han motivado para ser punta de lanza ante las dificultades.

Agradeceré eternamente a mis padres Raúl Chamorro y Magdalena Domínguez a quienes debo toda exaltación, merecedores de este título por su ardua tarea de iluminar mi ardiente deseo de triunfar.

A mi tutora Lic. Karen Acosta M.Sc, quien con sus conocimientos guio el desarrollo de este proyecto de investigación, dedicando su tiempo para alcanzar el objetivo que nos planteamos al inicio de esta aventura.

Finalmente, un agradecimiento especial para el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, quienes comprometidos con el fortalecimiento de la investigación científica en un trabajo conjunto con la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo han dado la oportunidad a estudiantes de desarrollar habilidades nuevos conocimientos y el descubrimiento de nuevos aportes científicos

Expreso mi gratitud.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I.....	5
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1 Enfermedad del Alzheimer	5
<i>1.1.1 Historia.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.2 Definición.....</i>	<i>7</i>
<i>1.1.3 Síntomas.....</i>	<i>7</i>
<i>1.1.4 Diagnóstico</i>	<i>8</i>
<i>1.1.5 Factores de Riesgo.....</i>	<i>8</i>
<i>1.1.5.1 Edad.....</i>	<i>8</i>
<i>1.1.5.2 Historia Familiar.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.5.3 Gen APOE-e4.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.6 Rasgos e impacto de la enfermedad de Alzheimer.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.7 Acetilcolina y la Enfermedad de Alzheimer.....</i>	<i>10</i>
<i>1.1.8 Hipótesis más influyentes sobre el origen de la Enfermedad de Alzheimer.....</i>	<i>10</i>
<i>1.1.8.1 Cascada amiloide</i>	<i>10</i>
<i>1.1.8.2 Péptido β-amiloide (Aβ) (39-43 residuos de aminoácidos).....</i>	<i>10</i>
<i>1.1.8.3 Proteínas TAU.....</i>	<i>11</i>
<i>1.1.8.4 Proteínas Anudadas.....</i>	<i>11</i>
<i>1.1.8.5 Hipótesis por Porphyromonas gingivalis.....</i>	<i>11</i>
1.1.9 Cambios cerebrales asociados al Alzheimer.....	12
1.1.10 Tratamiento.....	12
<i>1.1.10.1 Tratamiento Farmacológico.....</i>	<i>12</i>
<i>1.1.10.2 Clasificación de medicamentos</i>	<i>13</i>
<i>1.1.10.3 Terapia no farmacológica.....</i>	<i>14</i>
1.1.11 Viviendo con Alzheimer	15
1.2 Colinesterasas.....	15
<i>1.2.1 Inhibidores de Colinesterasa.....</i>	<i>16</i>
<i>1.2.1.1 AChE.....</i>	<i>16</i>

1.2.1.2	<i>BuChE</i>	16
1.2.2.	<i>Neurotransmisión colinérgica</i>	17
1.3	Familia Amaryllidaceae	18
1.3.1	<i>Características</i>	18
1.3.2	<i>Tipos de estructuras conocidas de la familia Amaryllidaceae</i>	19
1.4	Galantamina	19
1.5	Eucharis	20
1.5.1	<i>Variación de especies de Eucharis</i>	20
1.5.2	<i>Ecología</i>	21
1.5.3	<i>Etimología</i>	21
1.5.4	<i>Especies</i>	21
1.6	Eucharis formosa	23
1.7	°Método de Ellman y colaboradores	24
1.8	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM) en el estudio de alcaloides de Amaryllidaceae	26
1.9	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM)	26
CAPÍTULO II		28
2.	MARCO METODOLÓGICO	27
2.1	Tipo y diseño de investigación	27
2.1.1	<i>Muestra de análisis</i>	27
2.1.2	<i>Población de la muestra de Estudio</i>	27
2.2	Lugar de investigación	27
2.3	Lugar de recolección de la especie vegetal	27
2.4	Identificación Botánica	28
2.5	Materiales, equipos y reactivos	28
2.5.1	<i>Materiales</i>	28
2.5.2	<i>Equipos</i>	29
2.5.3	<i>Reactivos</i>	30
2.6	Selección de la muestra vegetal	31
2.6.1	Criterio de inclusión	31
2.6.2	Criterio de exclusión	31
2.7	Acondicionamiento de la muestra vegetal	31
2.8	Preparación del extracto alcaloidal	31
2.9	Identificación de alcaloides Eucharis formosa por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas	33

2.10	Preparación de soluciones.....	34
<i>2.10.1</i>	<i>Reactivos</i>	<i>34</i>
<i>2.10.2</i>	<i>Preparación de Sustratos.....</i>	<i>34</i>
<i>2.10.3</i>	<i>Preparación de enzimas.....</i>	<i>34</i>
<i>2.10.4</i>	<i>Compuesto de referencia (Galantamina).....</i>	<i>35</i>
2.11	Preparación de soluciones para determinar la actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE.	35
<i>2.11.1</i>	<i>Muestra Alcaloidal de Eucharis formosa.</i>	<i>35</i>
2.12	Determinación de la actividad inhibitoria de Acetilcolinesterasa (AChE) y Butirilcolinesterasa (BuChE).....	36
2.13	Análisis de Datos	37
<i>2.13.1</i>	<i>Determinación de la concentración inhibitoria media (IC50) mediante la curva de tendencia.</i>	<i>37</i>
 CAPÍTULO III.....		38
3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
3.1	Obtención del extracto alcaloidal de Eucharis formosa.....	38
3.2	Identificación de alcaloides presentes en bulbo de Eucharis formosa obtenidos mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM)	38
3.3	Determinación de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de Eucharis formosa sobre acetilcolinesterasa.....	42
3.4	Determinación de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de Eucharis formosa sobre Butirilcolinesterasa.....	44
CONCLUSIONES.....		48
RECOMENDACIONES.....		49
 GLOSARIO		
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Estructuras de la familia Amaryllidaceae	19
Tabla 2-1:	Especies de <i>Eucharis</i>	23
Tabla 1-2:	Materiales necesarios para la preparación de reactivos.....	30
Tabla 2-2:	Materiales necesarios para la extracción de alcaloides.....	30
Tabla 3-2:	Materiales necesarios para cada procedimiento	31
Tabla 4-2:	Equipos utilizados para la investigación según sus procesos	31
Tabla 5-2:	Reactivos utilizados para la investigación según sus procesos	32
Tabla 6-2:	Buffer Fosfato Salino (PBS).....	36
Tabla 7-2:	Solución Salina (Na_2HPO_4)	36
Tabla 8-2:	Diluciones de galantamina	37
Tabla 9-2	Concentración del extracto de alcaloidal utilizado en el ensayo de inhibición AChE y BuChE para <i>Eucharis formosa</i>	37
Tabla 1-3:	Porcentaje de rendimiento de alcaloides de <i>Eucharis formosa</i>	40
Tabla 2-3:	Resultados de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas de los alcaloides presentes en <i>Eucharis formosa</i>	40
Tabla 3-3:	Primer screening del porcentaje de inhibición de AChE por el extracto alcaloidal de <i>Eucharis formosa</i>	45
Tabla 4-3:	Segundo screening del porcentaje de inhibición de AChE por el extracto alcaloidal de <i>Eucharis formosa</i>	46

Tabla 5-3: Inhibición del extracto alcaloidal de <i>Eucharis formosa</i> sobre AChE.....	46
Tabla 6-3: Primer screening del porcentaje de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal de <i>Eucharis formosa</i>	47
Tabla 7-3: Segundo screening del porcentaje de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal de <i>Eucharis formosa</i>	47
Tabla 8-3: Inhibición del extracto alcaloidal de <i>Eucharis formosa</i> sobre BuChE.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Artículo original del primer caso de Alzheimer.....	6
Figura 2-1:	Ovillos neurofibrilares en Auguste D, dibujados por Alzheimer.....	7
Figura 3-1:	Medicamentos según su clasificación	14
Figura 4-1:	Neurotransmisión Colinérgica	17
Figura 5-1:	Estructura de los 9 tipos de alcaloides de Amaryllidaceae, con la numeración propuesta.....	19
Figura 6-1:	<i>Eucharis</i> copas estaminales: <i>E.candida</i> (A), <i>E.formosa</i> (B), <i>E.bouchei</i> (C), <i>E.ulei</i> (D)	22
Figura 7-1:	Distribuciones de <i>Eucharis</i> , <i>Caliphuria</i> , y <i>Urceolina</i> en Sudamérica	24
Figura 8-1:	<i>Eucharis formosa</i> recolectada en la Provincia de Sucumbíos-Cantón Shushufindi	25
Figura 9-1:	<i>Eucharis candida</i> (cuadrado) y <i>Eucharis formosa</i> en (círculo) en el Ecuador	26
Figura 10-1:	Reacción enzimática del método de Ellman para la actividad inhibitoria ..	27
Figura 1-2:	Esquema de la extracción de alcaloides del bulbo de <i>Eucharis formosa</i>	34
Figura 1-3:	Alcaloides identificados en el extracto alcaloidal del bulbo de <i>Eucharis formosa</i>	41
Figura 2-3:	Estructuras de los alcaloides identificados en el extracto de <i>Eucharis formosa</i>	42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Especie vegetal *Eucharis formosa* recolectada en la provincia de Sucumbíos, cantón Shushufindi en el año 2018

Anexo B: Acondicionamiento del material vegetal

Anexo C: Preparación del extracto crudo

Anexo D: Extracción de alcaloides de *Eucharis formosa*

Anexo E: Ensayo de inhibición de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Eucharis formosa*.

Anexo F: Curva de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*, para el cálculo de IC₅₀, ejecutadas en tres días respectivamente

Anexo G: Curva de inhibición de butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*, para el cálculo de IC₅₀, ejecutadas en tres días respectivamente.

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo principal determinar la actividad inhibitoria sobre las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) por parte del extracto alcaloidal de la especie *Eucharis formosa*, usando galantamina como compuesto de referencia, compuesto usado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Además que se identificaron los alcaloides presentes en esta planta a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Eucharis formosa* pertenece a la familia de Amaryllidaceae, ubicada desde Panamá hasta Bolivia y en gran parte de la cuenca amazónica occidental del Ecuador. El material vegetal se recolectó en la provincia de Sucumbíos, cantón Shushufindi en febrero de 2018. A partir del extracto bruto obtenido por maceración del bulbo seco y triturado en metanol, se realizó la extracción de alcaloides mediante un protocolo basado en el cambio de pH y uso de solventes orgánicos. A través, de este proceso empleado se identificaron los alcaloides: licorina, 11- hidroxivitatina/hamayna, codeína, galantamina, hemantamina en orden de abundancia. En los resultados de inhibición enzimática correspondientes al extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*, se observó un $IC_{50} = 4,223 \pm 0,435$, resultado muy cercano al valor de referencia de galantamina ($IC_{50} = 0,71 \pm 0,02$), mostrando una elevada actividad inhibitoria. Para el caso de BuChE, el IC_{50} del extracto de *E. formosa* tuvo un valor de $129,903 \pm 12,636$, y en el caso de galantamina éste fue de $16,055 \pm 1,335$. Debido a la destacable actividad inhibitoria del extracto estudiado sobre AChE, resulta de gran interés continuar investigando a *E. formosa* para la búsqueda de nuevos tratamientos de la enfermedad de Alzheimer, siendo así recomendable la realización de posteriores estudios fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FITOQUÍMICA>, <GALANTAMINA>, <EXTRACTO ALCALOIDAL>, <BULBO>, <*Eucharis formosa*>, <AMARYLLIDACEAE>, <COLINESTERASA>, <ALZHEIMER (ENFERMEDAD)>

ABSTRACT

The main objective of this research was to determine the inhibitory activity on the acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) enzymes by the alkaloidal extract of the species *Eucharis Formosa*, using galantamine as a reference compound, a compound, the one which is used in the treatment of Alzheimer's disease. In addition, the alkaloids present in this plant were identified through gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Eucharis formosa* belongs to the Amaryllidaceae family; it can be located from Panama to Bolivia and in much of the western Amazon basin of Ecuador. The plant material was collected in the Shushufindi canton located in the province of Sucumbíos, in February 2018. From the crude extract obtained by maceration of the dried bulb and crushed in methanol, alkaloid extraction was performed using a protocol based on the change of pH and the use of organic solvents. Through this process, the following alkaloids were identified, 11-hydroxyvittatin / hamayna, codeine, galantamine, hemantamine, incartine, O-methylmaritidine in order of abundance; and finally a compound not identified m/z 288^a;[M=289]^b. In the results of enzymatic inhibition corresponding to the alkaloidal extract of *Eucharis formosa*, an $IC_{50} = 4,223 \pm 0.435$ was observed, a result very close to the reference value of galantamine ($IC_{50} = 0.71 \pm 0.02$), showing high inhibitory activity. In the case of BuChE, the IC_{50} of the extract of *E. Formosa* had a value of $129,903 \pm 12,636$, and in the case of galantamine, it was $16,055 \pm 1,335$. Due to the remarkable inhibitory activity of the extract studied on AChE, it is of great interest to continue investigating *E. formosa* for the search for new treatments of Alzheimer's disease, thus it is recommended to carry out subsequent phytochemical, pharmacological, toxicological studies.

Key words: <BIOCHEMISTRY>, <PHYTOCHEMISTRY>, < GALANTAMINE>, <EXTRACT OF ALKALOIDS>, <BULB>, <*Eucharis formosa*>, <AMARYLLIDACEAE>, <CHOLINESTERASES>, <ALZHEIMER'S DISEASE>.



INTRODUCCIÓN

Una de las causas más reconocidas a nivel mundial para la demencia es la enfermedad de Alzheimer ya que se ha demostrado que alrededor del 80% de todos los pacientes con demencia son víctimas de esta enfermedad siendo su característica principal la pérdida de memoria, conocimiento y acciones cotidianas (Jha et al. 2018, p.1).

El Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más común, los factores de riesgos más influyentes para desarrollar esta enfermedad son la edad que afecta a los adultos mayores desde los 65 años en adelante y los antecedentes familiares. Sin embargo, estudios recientes apuntan que la mitad de estos casos están relacionados a factores prevenibles como la hipertensión arterial, diabetes, obesidad, tabaquismo, alcoholismo, sedentarismo y la baja estimulación cognitiva entre las más destacadas (Jha et al. 2018, p.7).

En la actualidad, un caso de enfermedad de Alzheimer se diagnostica a nivel mundial cada 4 segundos y las previsiones son muy alarmantes ya que de acuerdo a varias investigaciones de la Organización Mundial de Salud se prevé que en el año 2050 existan más de 100 millones de personas con Alzheimer, con un gasto a nivel mundial de \$605 mil millones de dólares (Organización Mundial de la Salud, 2019).

Entre los países con mayor índice de Alzheimer se encuentra Estados Unidos, donde esta enfermedad ocupa el sexto lugar entre las causas más destacadas de muerte y en base a una encuesta realizada durante el año 2018, aproximadamente se invierten \$ 220 mil millones en el diagnóstico del Alzheimer. Por otro lado, en España existen más de 1,2 millones de personas con esta patología neurológica, siendo así un problema de salud pública para la sociedad en general (Jha et al. 2018, p.1).

Por ello, la Organización Mundial de Salud ha elaborado un plan de acción mundial sobre la respuesta de salud pública a la demencia que inició en el año 2017 y se pretende terminarlo en el año 2025 con el objetivo de mejorar la calidad de vida de las personas que sufren esta enfermedad, facilitando el seguimiento y el intercambio de información sobre las políticas relacionadas con la demencia, la prestación de servicios, la epidemiología y la investigación. (Organización Mundial de la Salud, 2019).

Así también, es importante mejorar la calidad de vida de sus cuidadores y de las personas de su entorno, y que se creen políticas que tengan en cuenta la igualdad, dignidad y derechos humanos de las personas con demencia para que la comunidad en general sea integradora, comprensible y

amable y de esta manera evitar la discriminación y estigmatización (Asamblea Nacional de la República del Ecuador 2016, pp. 36-50).

A nivel de Ecuador, entre el 70% y 80% de los casos de demencia son atribuidos a la enfermedad de Alzheimer que afecta a la población ecuatoriana mayor de 65 años de edad, cifra que va en aumento cada cuatro años hasta alcanzar los 80 y 90 años. Hoy por hoy, se calcula que hay de 80 mil a 100 mil personas con esta enfermedad; y gracias a la intervención realizada por la fundación TASE (Trascender con amor, servicio y excelencia) actualmente el Alzheimer es considerada de interés prioritario (Asamblea Nacional de la República del Ecuador 2016, pp. 36-50).

En el Código Orgánico de Salud se ha incluido un capítulo sobre enfermedades mentales y los derechos que intervienen para las personas que sufren de este tipo de enfermedades, los centros de rehabilitación y ayuda en general (Asamblea Nacional de la República del Ecuador 2016, pp. 64-65).

Muchos pacientes tienen síntomas neuropsiquiátricos en el curso de su disminución cognitiva, y no existen tratamientos aprobados aún que puedan ser recomendados para el uso a largo plazo para estas condiciones comórbidas importantes, generando así una necesidad urgente para mejores alternativas de tratamiento enfocadas al deterioro cognitivo en pacientes con esta enfermedad (Rinne et al. 2017, pp. 1-9).

Los procesos fisiopatológicos descritos para la progresión del Alzheimer, implican las neuronas y degeneración de la sinapsis, principalmente caracterizada por deterioro colinérgico, haciendo que en esta característica los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEI) sea la principal clase de medicamentos (Coelho et al. 2018, pp. 1-8); que son donepezil, rivastigmina, galantamina y memantina antagonista del receptor N-metil-D-aspartato. (Rinne et al. 2017, pp. 1-9).

Dentro de los medicamentos utilizados para el tratamiento de la EA, se utiliza varias especies de plantas que producen diversas clases de alcaloides, cumarinas, terpenos y polifenoles, estos han sido evaluados por su actividad anti -AChE, convirtiéndose en posibles candidatos para nuevos medicamentos anti-EA (Coelho et al. 2018, pp. 1-8).

Por lo antes expuesto, surge el cuestionamiento de determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de la planta endémica *Eucharis formosa*, perteneciente a la familia de Amaryllidaceae, esta especie fue escogida para su estudio principalmente porque se encuentra en gran parte de la cuenca occidental del Ecuador y al no ser estudiada científicamente se prevé encontrar posibles medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

De igual forma este proyecto está enfocado en contribuir al desarrollo de investigaciones que permitan mejorar la salud tanto de manera inclusiva e intercultural impulsando el acceso a medicamentos y otros sistemas que mejoren la calidad de vida; y de esta forma aportar positivamente al tratamiento de esta patología que es una problemática creciente en nuestro país cumpliendo así el objetivo 1: Garantizar una vida digna con igualdad de oportunidades para todas las personas establecido en el Plan Nacional de Desarrollo del Buen a Vivir (Planificación 2017; pp. 53-59).

Finalmente, esta investigación surge de la colaboración de varias universidades entre ellas la ESPOCH que forman parte del proyecto CYTED “La Biodiversidad Iberoamericana como Fuente de Recursos Naturales para su Exploración Sostenible (BIFRENES)”, siendo su objetivo el aprovechamiento de recursos naturales en búsqueda de principios activos para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas fortaleciendo la capacidad de desarrollo tecnológico mediante la promoción de la investigación científica conjunta.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

- Determinar la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de *Eucharis formosa* sobre acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

Objetivos Específicos

- Obtener el extracto de alcaloides en bulbos de la especie *Eucharis formosa* mediante un protocolo basado en cambios de pH.
- Identificar los alcaloides presentes en el extracto obtenido del bulbo, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Determinar la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides del bulbo *Eucharis formosa* sobre acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, a través del método colorimétrico del Ellman con modificaciones realizadas por Ortiz.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Enfermedad del Alzheimer

1.1.1 Historia

Esta enfermedad existía mucho antes de que el reconocido psiquiatra y neurólogo alemán Alois Alzheimer la describiera en el año 1906 a través de un paciente, pero fue gracias a sus estudios realizados que la ciencia médica tuvo una mejor percepción de la misma (J.M. i Trullén 2013; pp. 125-136).

El caso estudiado por el Doctor Alois Alzheimer mostraba un cuadro clínico muy peculiar que no podía ser catalogado en ninguna de las enfermedades conocidas en aquella época y que fue observado en el Psiquiátrico de Frankfurt donde se estudió el cerebro de una mujer de 51 años (J.M. i Trullén 2013; pp. 125-136).

La paciente presentaba síntomas como olvido, alucinaciones, repetición o supresión de frases, creciente deterioro de la memoria, perplejidad, desorientación espacial y temporal, alaridos, capacidad de atención alterada, habla confusa, incomprensión de tareas, reflejos rotulianos normales, arterias radiales rígidas, demencia general progresiva; esta enfermedad la sufrió durante cuatro años ya que luego falleció (J.M. i Trullén 2013; pp. 125-136).

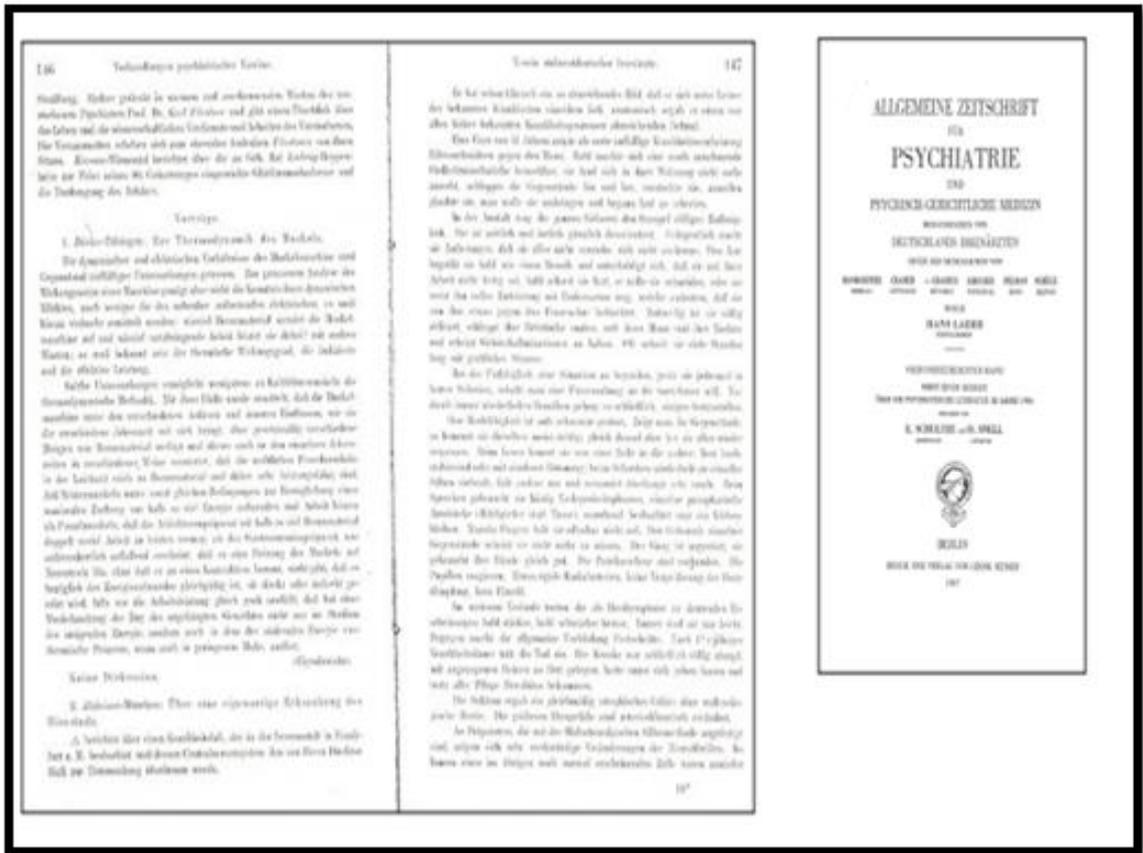


Figura 1-1: Artículo original del primer caso de Alzheimer
Fuente: (J.M. i Trullén 2013; p.133).

En la autopsia se encontró atrofia general y uniforme del cerebro sin focos macroscópicos, los vasos cerebrales presentaban cambios arterioescleróticos, de igual forma los reactivos elaborados según el método de plata de Bielschowsky, mostraron importantes cambios en las neurofibrillas, en el interior de algunas células resaltaron varias fibrillas por su especial espesor y capacidad de impregnarse, luego se juntan en densos haces que progresivamente alcanzaron la superficie de la célula (Contreras i Hans 2014; pp. 1-5).

Finalmente, desintegraron el núcleo y la célula, y solamente un ovillo de fibrillas indicó el lugar donde previamente existía una neurona. Un gran número de neuronas en las capas superiores habían desaparecido totalmente, agregados en toda la corteza de gran abundancia en las capas superiores donde se encuentran pequeños focos miliares producidos por una sustancia peculiar en la corteza cerebral (Contreras i Hans 2014; pp. 1-5).

Dado a que la comunidad científica no tomó como relevante la discusión de Alois Alzheimer sobre dicha enfermedad luego de varios años Piazza menciona en el año 1911: *No se podrá negar que el mérito de Alzheimer ha estado sobre todo, no en dar vida a una nueva entidad morbosa, sino en separar un grupo de casos que antes eran confundidos con la demencia senil o con una mezcla de demencia senil y arteriosclerótica* (Contreras i Hans 2014; pp. 1-5).

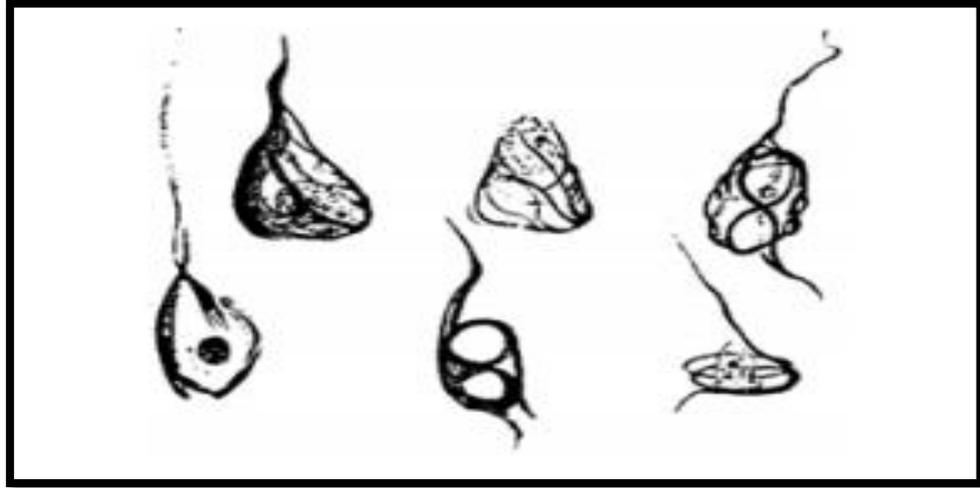


Figura 2-1: Ovillos neurofibrilares en Auguste D, dibujados por Alzheimer
Fuente: (Contreras i Hans 2014; p.3).

1.1.2 Definición

El Alzheimer es una enfermedad neurológica degenerativa con un desarrollo progresivo que suele ocultarse en la etapa temprana, cuya fisiopatología es muy compleja y en gran parte desconocida (Wang et al. 2018; p. 2061).

1.1.3 Síntomas

Las personas con Alzheimer experimentan diferentes síntomas que varían durante un período de años y que reflejan el grado de daño a las neuronas en diferentes partes del cerebro.

Etapa leve.- La mayoría de las personas actúan independientemente en muchas áreas, pero es posible que necesiten asistencia, todavía son capaces de trabajar, participar en sus actividades favoritas, conducir, etc. (Association 2018; p. 370).

Etapa moderada.- Para algunas personas es la etapa más larga, ya que estos individuos tienen dificultad para realizar tareas rutinarias, confundirse sobre dónde están y vagar, cambios de personalidad y comportamiento que incluye desconfianza y agitación (Association 2018; p. 370).

Etapa severa.- Los pacientes necesitan ayuda con las actividades básicas de la vida diaria tales como vivir, vestirse, comer, usar el baño (Association 2018; p. 370).

Es en esta fase de la enfermedad que los efectos en la salud física del individuo se evidencian ya que se presentan daños en áreas del cerebro implicadas en el movimiento, es por eso que se quedan postrados en cama causando inflamaciones en todo el cuerpo y sepsis; así mismo, en áreas del cerebro que controlan la deglución y se vuelve difícil comer y beber, considerándose a éste como un síntoma que contribuye a la muerte de muchas personas con Alzheimer (Association 2018; p. 370).

1.1.4 Diagnóstico

No existe una única prueba para el Alzheimer; sin embargo, los médicos en ayuda de especialistas como neurólogos y geriatras usan una variedad de enfoques y herramientas para hacer un diagnóstico que incluyen los siguientes: (Association 2018; p. 404).

- Obtener un historial médico y familiar del paciente con el historial psiquiátrico y de cambios cognitivos y de comportamiento.
- Solicitar a un familiar cercano información de los cambios en las habilidades de pensamiento y comportamiento.
- Serie de pruebas cognitivas y exámenes físicos y neurológicos.
- Someter a la persona a exámenes de sangre y neurológicos.
- Toma de imágenes para descartar otras posibles causas de demencia y observar si tiene niveles altos de beta-amiloide.

1.1.5 Factores de Riesgo

1.1.5.1 Edad

La edad de las personas es uno de los factores de riesgo para alcanzar esta enfermedad. Existe una prevalencia dramática en el porcentaje gradual en las personas con Alzheimer al aumento de su edad: (Association 2018; p. 373).

- a) De 65 a 74 años un 3% de las personas
- b) De 75 a 84 años un 17% de las personas
- c) De 85 años a más un 32% de las personas

Es importante tener en cuenta que el Alzheimer no es una parte normal del envejecimiento, y en las personas mayores la edad no es suficiente para causar Alzheimer (Association 2018; p. 373).

1.1.5.2 Historia Familiar

Los antecedentes familiares no son causas suficientes para desarrollar la enfermedad; sin embargo, juega un papel fundamental cuando esta enfermedad se desarrolla en familias, herencia (genética) ambiental compartida, y factores de estilo de vida como hábitos relacionados a la actividad física, alimentación saludable (Frieden, Wang i Ho 2017; p. 5).

1.1.5.3 Gen APOE-e4

El gen APOE proporciona el modelo para una proteína que transporta el colesterol en el torrente sanguíneo. Por lo general, los seres humanos heredan una de las tres formas del gen APOE, e2, e3 o e4, de sus progenitores. La estructura e3 es la más común, respecto a la forma e4 es la siguiente más común y por último la forma e2 es la menos común, al tener la forma e4 aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (Association 2018; p. 373).

Un reciente análisis incluye 20 artículos publicados que describen la frecuencia de la forma e4 entre las personas; en los Estados Unidos quienes habían sido diagnosticados con Alzheimer se encontró que el 56% tenía una copia del gen APOEe4; y el 11% tenía dos copias de la APOE-e4 (Association 2018; p. 373).

Otro estudio encontró que se diagnosticaron a 1770 individuos que son tratados en 26 centros de atención para Alzheimer en Estados Unidos, el 65% tenía al menos una copia del gen APOEe-4 (Association 2018; p. 373).

1.1.6 Rasgos e impacto de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad tiene como característica principal deterioro de la memoria, afasia, discapacidad visual, disfunción, personalidad ejecutiva y cambios de comportamiento; quienes padecen de EA no tienen capacidad de autosuficiencia y su enfermedad se convierte en una carga pesada tanto para la familia, cuidadores e incluso la sociedad (Association 2018; p. 394).

El envejecimiento a nivel mundial se encuentra cerca de 900 millones de personas, de los cuales 47 millones de personas padecen de EA, estimando una cifra para el año 2050 de 131.5 millones, es por esta razón que las organizaciones de EA deben unir esfuerzos para frenar las disfunciones cognitivas progresivas y mejorar la calidad de vida (Association 2018; p. 381).

1.1.7 Acetilcolina y la Enfermedad de Alzheimer

El deterioro de las neuronas resulta en la disminución de los niveles del neurotransmisor acetilcolina que altera la transmisión colinérgica y lleva a cabo la disminución de la función cognitiva en los pacientes, la inhibición de acetilcolinesterasa incide en la acetilcolina lo que permite elevar su velocidad en el cerebro y mejorar la neurotransmisión (Gali i Bedjou 2018; pp. 1-7).

1.1.8 Hipótesis más influyentes sobre el origen de la Enfermedad de Alzheimer

1.1.8.1 Cascada amiloide

Todavía existe controversias significativas en cuanto a si la hipótesis de la cascada amiloide explica la patología de la enfermedad de Alzheimer caracterizada por la acumulación de A β en el cerebro, conduciendo a cambios en el metabolismo tau, lo que conlleva a la deposición de enredos neurofibrilares que son una pérdida neuronal observada en esta enfermedad (Julien et al. 2018; p.1).

1.1.8.2 Péptido β -amiloide (A β) (39-43 residuos de aminoácidos)

Según esta hipótesis, la EA empieza con una modificación en el metabolismo de la proteína precursora del amiloide (APP), aumentando la producción de β - Amiloide, seguido del depósito de este metabolito en el espacio extracelular cerebral; teniendo como resultado que la proteína tau se hiperfosforila y forme ovillos neurofibrilares acumulándose en el interior de las neuronas para así destruirlas (Merino, Sendin i Osorio 2015; pp. 4306-4315).

Es importante mencionar que esta hipótesis es bastante sustentable por la presencia de mutaciones genéticas asociadas al origen de A β y su desmedida acumulación en el espacio extracelular cerebral (Merino, Sendin i Osorio 2015; pp. 4306-4315).

Es comúnmente aceptada como un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, los depósitos de A β , predominantemente A β 1-40 y A β 1-42 forman insolubles placas seniles en el cerebro y desmarcan las áreas de daño neural, tras esta agregación el A β se vuelve tóxico para las células (Lobbens et al. 2017; p.4).

La naturaleza precisa de la forma A β no ha sido establecida plenamente, pero recientemente la toxicidad se ha relacionado con formas tempranas de agregados peptídicos llamados ADDLs (Ligandos difusibles a derivados de A β), protofibrillas u oligomeros solubles (Lobbens et al. 2017; p.4).

Nuevos estudios indican que las concentraciones muy bajas de oligómeros A β solubles producen cambios neurofisiológicos como una potencial causa de disfunción sináptica que conduce al deterioro cognitivo y pérdida la memoria asociada a la EA (Lobbens et al. 2017; pp. 1-38).

1.1.8.3 *Proteínas TAU*

La hipótesis de las proteínas tau se enfocan en la aparición de ovillos neurofibrilares formados por la proteína tau fibrilada, que serían responsables de la neurodegeneración en individuos con enfermedad de Alzheimer (Lobbens et al. 2017; p.4).

Los inhibidores de las tau quinasas potenciadores de las difosfatasa específicamente de la fosfoproteína fosfatasa 2^a (PP2a), son los principales mecanismos para la disminución de la proteína tau observada en la EA (Gong et al. 2006; p. 4).

1.1.8.4 *Proteínas Anudadas*

Como hipótesis se han descubierto una creciente variedad de nudos en las proteínas, alrededor del uno por ciento de las entradas del Banco de Datos de proteínas tienen nudos. Algunas de estas proteínas anudadas propician un papel importante en la bioquímica humana (Jackson, Suma i Micheletti 2017; pp. 6-14).

Por ejemplo, la isoforma 1 de la hidrolasa del terminal C de la ubiquitina humana (UCH-L1) designada como 52, representa hasta el cinco por ciento de las proteínas solubles en las neuronas, existiendo varios estudios centrados en la UCH-L1, como molécula no anudada asociada a enfermedades neurodegenerativas (Jackson, Suma i Micheletti 2017; pp. 6-14).

Siendo importante mencionar que la ubiquitina UBC13 como componente de una nueva red de señalización de ubiquitina citoplásmica suprime la formación de sinapsis en el cerebro del mamífero como hipótesis para la enfermedad de Alzheimer (Valnegri et al. 2017; pp. 1-15).

1.1.8.5 *Hipótesis por Porphyromonas gingivalis*

Así también, se ha detectado lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* en cerebros con la Enfermedad de Alzheimer, promoviendo la hipótesis de que la infección por *P. gingivalis* en el cerebro desempeña un papel en la patogénesis de la EA (Dominy et al. 2019; pp. 1-22).

Las proteasas tóxicas de la bacteria llamada gingipainas también se identificaron en el cerebro de los pacientes con Alzheimer, y los niveles se correlacionan con la patología tau y ubiquitina (Dominy et al. 2019; pp. 1-22). La infección oral por *P. gingivalis* en ratones produjo colonización cerebral y aumento de la producción de A β 1-42, un componente de las placas amiloides. Además,

las gingipainas fueron neurotóxicas produciendo efectos perjudiciales sobre la tau, (proteína necesaria sobre la función neuronal normal). (Dominy et al. 2019; pp. 1-22).

La inhibición reduce la carga de infección cerebral por *P. gingivalis* bloqueando la producción de A β 1-42, reduciendo la neuroinflamación y rescatando neuronas del hipocampo (Dominy et al. 2019; pp. 1-22).

1.1.9 Cambios cerebrales asociados al Alzheimer

En el cerebro sano de una persona adulta podemos encontrar alrededor de 100 mil millones de neuronas, cada una de ellas con extensiones de largas ramificaciones, estas extensiones permiten que las neuronas formen conexiones con otras (sinapsis) (Association 2018; p. 370).

La información fluye en ráfagas de sustancias químicas liberadas por una neurona y detectadas por una neurona receptora, el cerebro contiene alrededor de 100 trillones de sinapsis permitiendo que las señales viajen rápidamente a través de los circuitos neuronales del cerebro, creando la base celular de los recuerdos, pensamientos, emociones, movimientos y habilidades (Association 2018; p. 370).

La acumulación del fragmento de proteína beta-amiloide (llamadas placas beta-amiloides) fuera de las neuronas y la acumulación de una forma anormal de la proteína tau (llamada tau enredos) dentro de las neuronas son dos de varios cambios cerebrales asociados con la enfermedad de Alzheimer. (Association 2018; p. 373).

Las placas beta-amiloides son contribuyentes a la muerte celular al interferir con la comunicación de neurona a neurona en la sinapsis, mientras que tau enredos bloquean el transporte de nutrientes y otras moléculas esenciales dentro de las neuronas (Association 2018; p. 370).

Como la cantidad de beta-amiloide aumenta, se alcanza un punto de inflexión en el que tau anormal se propaga por todo el cerebro, otros cambios que se presentan en el cerebro son la inflamación y la atrofia, la presencia de proteínas beta-amiloides y tau tóxicas activan las células del sistema inmunitario en el cerebro llamadas microglía, ésta intenta eliminar las proteínas tóxicas, así como residuos de células muertas (Association 2018; p. 371).

1.1.10 Tratamiento

1.1.10.1 Tratamiento Farmacológico

Al abordar este tema, es necesario destacar que el diseño de los medicamentos es una herramienta vital en el campo de la química médica ya que los nuevos compuestos se sintetizan a través de la

manipulación molecular o química, todo esto con el fin de producir compuestos altamente activos con un mínimo efecto estérico, de igual forma las moléculas en el sitio de unión del receptor y estimación son parte vital en el diseño de fármacos basados en la estructura. (Kuppusamy, George i Arumugam 2016; pp. 1-16).

El Alzheimer se caracteriza por el bajo nivel de neurotransmisores acetilcolina, neuroinflamación y estrés oxidativo en la corriente cerebral, es por eso que las metodologías de tratamiento eficaces están fundamentadas principalmente en el aumento de la función colinérgica del cerebro a través de la estimulación de los receptores colinérgicos y de esta forma mejorar el nivel de acetilcolina (AChE), evitando así la descomposición por colinesterasa, enzimas y agentes antiinflamatorios (Kuppusamy, George i Arumugam 2016; pp. 1-16).

Ninguno de los tratamientos farmacológicos (medicamentos) que se encuentran hoy disponibles para la enfermedad de Alzheimer, retrasan o detienen el daño y destrucción de las neuronas causadas por esta enfermedad haciendo que sus síntomas sean letales. LA FDA ha aprobado seis medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer: rivastigmina, galantamina, donepezilo, memantina, memantina combinada con donepezilo y tacrina (Kuppusamy, George i Arumugam 2016; pp. 1-16).

Estos medicamentos mejoran temporalmente los síntomas al aumentar la cantidad de neurotransmisores en el cerebro. La efectividad de estos medicamentos varía de persona en persona y tiene una duración limitada (Kuppusamy, George i Arumugam 2016; pp. 1-16).

1.1.10.2 Clasificación de medicamentos

Entre los principales fármacos que se han investigado y utilizado para el tratamiento de la EA, son fármacos de denominación Aprobados, según estándares de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, ésta se caracteriza por el uso en casos leves a moderados de los Inhibidores de la Colinesterasa y de igual forma el uso de antagonista del receptor ácido- N- metil- D- aspartato (NMDA) de glutamato en casos de moderado a severo, según se describe en la figura (Sabbagh 2009; pp. 167-185).

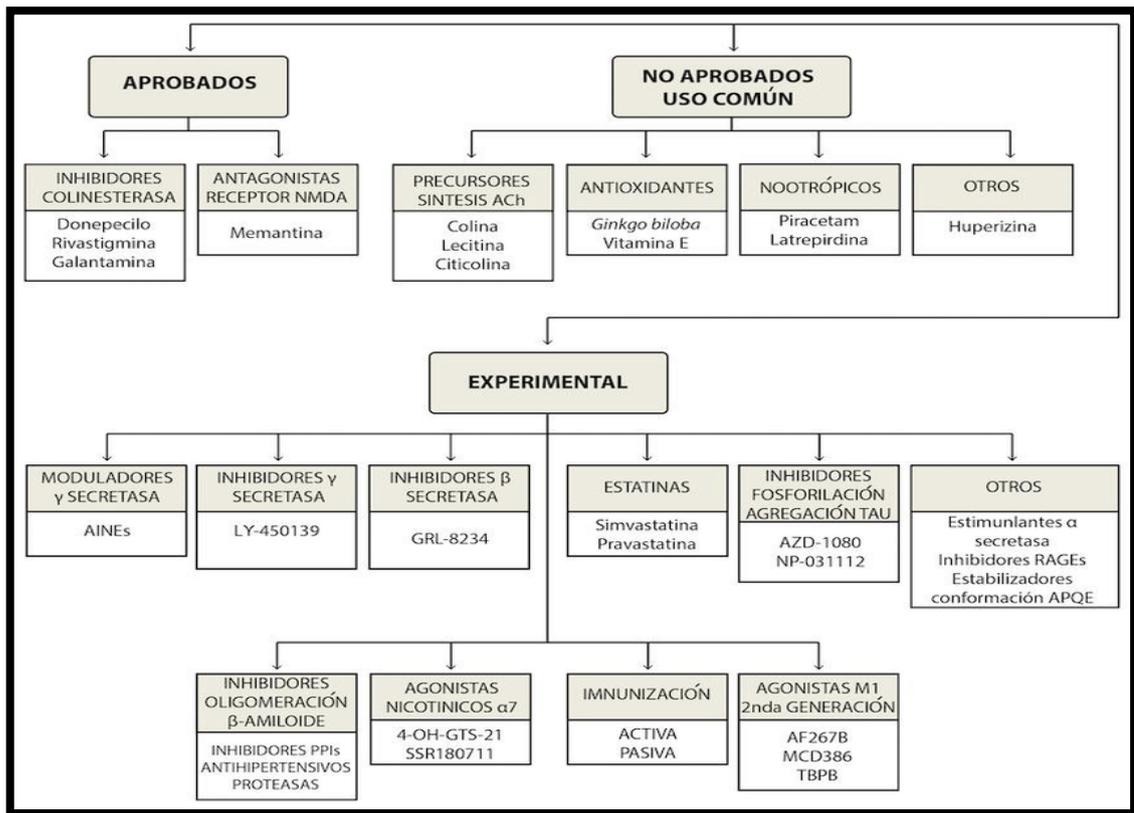


Figura 3-1: Medicamentos según su clasificación

Fuente: (Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverría i Monge-Bonilla 2016; p.4)

La terapéutica de estos días para la enfermedad de Alzheimer es catalogada por muchos expertos como una medida atenuante porque su función principal es disminuir síntomas como la pérdida de memoria y agitación; siendo un avance que favorece en corta medida al mejoramiento de la calidad de vida del individuo, pero no existe fármaco alguno que aumente la síntesis (Sabbagh 2009; pp. 167-185).

1.1.10.3 Terapia no farmacológica

Las terapias no farmacológicas son aquellas en las que no existe la implicación de medicación, siendo a menudo usadas con el objetivo de mantener o mejorar la función de la capacidad cognitiva, capacidades para realizar actividades de la vida diaria o calidad de vida en general (Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverría i Monge-Bonilla 2016; pp. 1-17).

También, se pueden utilizar con el objetivo de reducir los síntomas de comportamiento, como la depresión, apatía, trastorno del sueño, agitación, agresión, etc. Los ejemplos de este tipo de terapia incluyen entrenamiento de memoria computarizada, escuchar su música favorita como una forma de remover el recuerdo e incorporar una iluminación especial para disminuir los trastornos del sueño (Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverría i Monge-Bonilla 2016; pp. 1-17).

1.1.11 Viviendo con Alzheimer

Respecto a las decisiones específicas que se presentan en la trayectoria de la enfermedad de Alzheimer existe una investigación limitada a pesar de la prevalencia de esta enfermedad (Trugliolondrigan i Slyer 2018; p. 1).

Se debe ser estricto en el cumplimiento de los consejos médicos especialmente cuando se indica que hay que cuidar los niveles de glucemia, colesterol, presión arterial, entre otros, por esto es importante el desarrollo de hábitos saludables como el ejercicio (Association 2018; p. 375).

Varios estudios demuestran que hay un importante impacto en la prevención del Alzheimer, también es fundamental garantizar actividades que estimulen la memoria aprendizaje lenguaje, esto ayudará y mejorará las prevenciones y será un buen soporte para quienes padecen Alzheimer; además, se debe recordar que aún no hay una cura para esta enfermedad, pero si es posible reducir su incidencia con los chequeos médicos oportunos y la guía profesional (Association 2018; p. 375).

A pesar de la falta de terapias que retrasen o detengan la enfermedad de Alzheimer, diferentes estudios han demostrado que el manejo activo de esta enfermedad puede mejorar la calidad de vida de las personas afectadas y sus cuidadores, la gestión activa incluye: (Association 2018; p. 375).

- Uso adecuado de las opciones de tratamiento disponible
- Gestión eficaz de las condiciones de coexistencia
- Coordinación de cuidados entre médicos, y otros sanitarios
- Cuidados profesionales y familiares
- Participación en actividades que sean significativas y que traigan propósito para la vida de uno
- Tener oportunidades para conectarse con otras personas que viven con esta enfermedad grupos de apoyo y servicios de apoyo
- Educarse sobre la enfermedad
- Planificación para el futuro

1.2 Colinesterasas

Las neuronas colinérgicas se encuentran mayormente en regiones relacionadas con la memoria y aprendizaje, extendiéndose desde el cerebro anterior basal y el hipocampo. Al inhibir la

acetilcolinesterasa (AChE) que es la enzima que cataliza la descomposición de acetilcolina (ACh), los niveles de este neurotransmisor pueden aumentar y mejorar así las funciones de memoria y aprendizaje (Kuppusamy, George i Arumugam 2016; p. 4).

Los flavonoides, alcaloides y compuestos relacionados son un grupo de productos naturales que promueven diversas actividades biológicas y farmacológicas como antibacteriano, antiviral, antioxidante, antiinflamatorio, antialérgico, hepatoprotector, antitrombótico, antiviral y efectos antimutagénicos e inhibiendo varias enzimas (Kuppusamy, George i Arumugam 2016; p. 4).

1.2.1 Inhibidores de Colinesterasa

Hay dos formas principales de colinesterasas en los tejidos animales, la acetilcolinesterasa (AChE) y Butirilcolinesterasa (BuChE) (Kuppusamy, George i Arumugam 2016; p. 4).

1.2.1.1 AChE

Se la conoce como colinesterasa específica ya que presenta una especificidad a la acetilcolina, es el principal neurotransmisor que se ubica en todos los ganglios autónomos, órganos inervados, uniones neuromuscular y en varias sinapsis del sistema nervioso central. En este último la AChE es predominante en las interneuronas y en algunas vías vitales colinérgicas de axón largo. La enzima AChE hidroliza el enlace éster de la acetilcolina descomponiéndola en colina y éster (Cheng et al. 2019; pp. 277-288).

Es 10 veces más activa y representa casi el 80% de la hidrólisis de acetilcolina en el cerebro, es importante indicar que la actividad de AChE es mayor en las neuronas motoras que en las sensoriales (Cheng et al. 2019; pp. 277-288).

1.2.1.2 BuChE

Conocida como colinesterasa plasmática o butirilcolinesterasa rica en células gliales, se encuentra principalmente en el hígado; BuChE actúa principalmente hidrolizando la butirilcolina más rápido que AChE. (Cheng et al. 2019; pp. 277-288).

Durante muchos años su papel fue subestimada y recientemente considerada como un objetivo terapéutico importante para la EA; estudios indican que el nivel de actividad de BuChE se ve aumentado con la progresión de la enfermedad de Alzheimer, mientras que la actividad de AChE disminuye (Cheng et al. 2019; pp. 277-288).

Pruebas realizadas apoyan la idea de que BuChE compensa la función de AChE por lo que contribuye a mejorar un déficit colinérgico, y la inhibición dual de AChE/BuChE representa una estrategia de tratamiento esperanzador para esta enfermedad (Cheng et al. 2019; pp. 277-288).

1.2.2. Neurotransmisión colinérgica

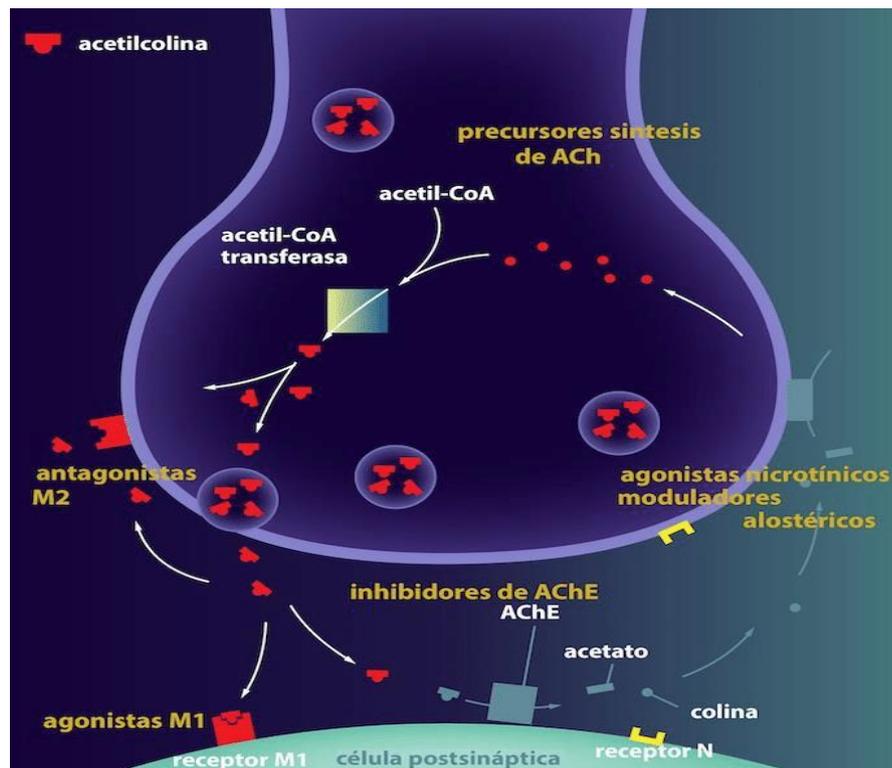


Figura 4-1: Neurotransmisión Colinérgica

Fuente: Adaptado del banco de imágenes de LundbeckInstitute, 2016.

La acetilcolina (ACh) se libera del nervio a la hendidura sináptica y se une a los receptores de acetilcolina, tales como los muscarínicos y nicotínicos en la membrana postsináptica, para de esta forma transmitir la señal del nervio (Kuppusamy, George i Arumugam 2016; p. 4).

Acetilcolinesterasa (AChE), también ubicada en la membrana postsináptica, termina la transmisión de la señal hidrolizando ACh (Kuppusamy, George i Arumugam 2016; p. 4).

Los posibles blancos moleculares para mejorar la neurotransmisión colinérgica utilizados para el tratamiento del Alzheimer son:

- ACh: acetilcolina.
- CoA: Coenzima A.
- Receptor M1: receptor muscarínico de acetilcolina subtipo M1.
- Receptor M2: receptor muscarínico de acetilcolina subtipo M2.

- AChE: Enzima acetilcolinesterasa.
- Receptor N: receptor nicotínico de acetilcolina.

La protección de los receptores M1 a nivel cortical en individuos con Alzheimer, sigue siendo un aspecto fundamental que contribuye significativamente a la mejora del tratamiento de la EA (Fisher 2008; pp. 433-442).

Sin embargo, la eficacia de los receptores M1 llamados de primera generación han sido de baja biodisponibilidad oral así como también de una corta duración de acción, un estrecho margen terapéutico y alto índice de efectos secundarios (Fisher 2008; pp. 433-442).

1.3 Familia Amaryllidaceae

1.3.1 Características

La familia Amaryllidaceae se disemina en todo el mundo principalmente en Sudamérica, la cuenca mediterránea y Sudáfrica. Se componen de 75 géneros y 1100 especies, comúnmente referidas como Amarilis. (Vergura et al. 2018; pp. 78- 84).

Las plantas de la familia Amaryllidaceae han sido utilizadas durante miles de años en la medicina herbal tradicional. La evidencia más temprana de su aplicación terapéutica fue descubierta en el siglo IV A. C., cuando Hipócrates de Cos usó el aceite del *Narcissus Poeticus*l (Amaryllidaceae), para el tratamiento de los tumores uterinos (Vergura et al. 2018; pp. 78- 84).

Los alcaloides de Amaryllidaceae que han sido aislados de todos los géneros que conforman esta familia, son de tipo isoquinolina y en la mayoría de los casos no se han identificado en ninguna otra familia vegetal (Cedr, Arco-aguilar and Est, 2010; Acosta, 2014).

Desde el aislamiento del primer alcaloide de Amaryllidaceae, licorina (*Lycoris*) en 1887, más de 500 alcaloides de Amaryllidaceae se caracterizan por tener alcaloides, dotados de una amplia gama de bioactividades, tales como: anticancerígena, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antipalúdica, analgésica, citotóxica e inhibitoria de colinesterasa (Vergura et al. 2018; pp. 78- 84).

1.3.2 Tipos de estructuras conocidas de la familia Amaryllidaceae

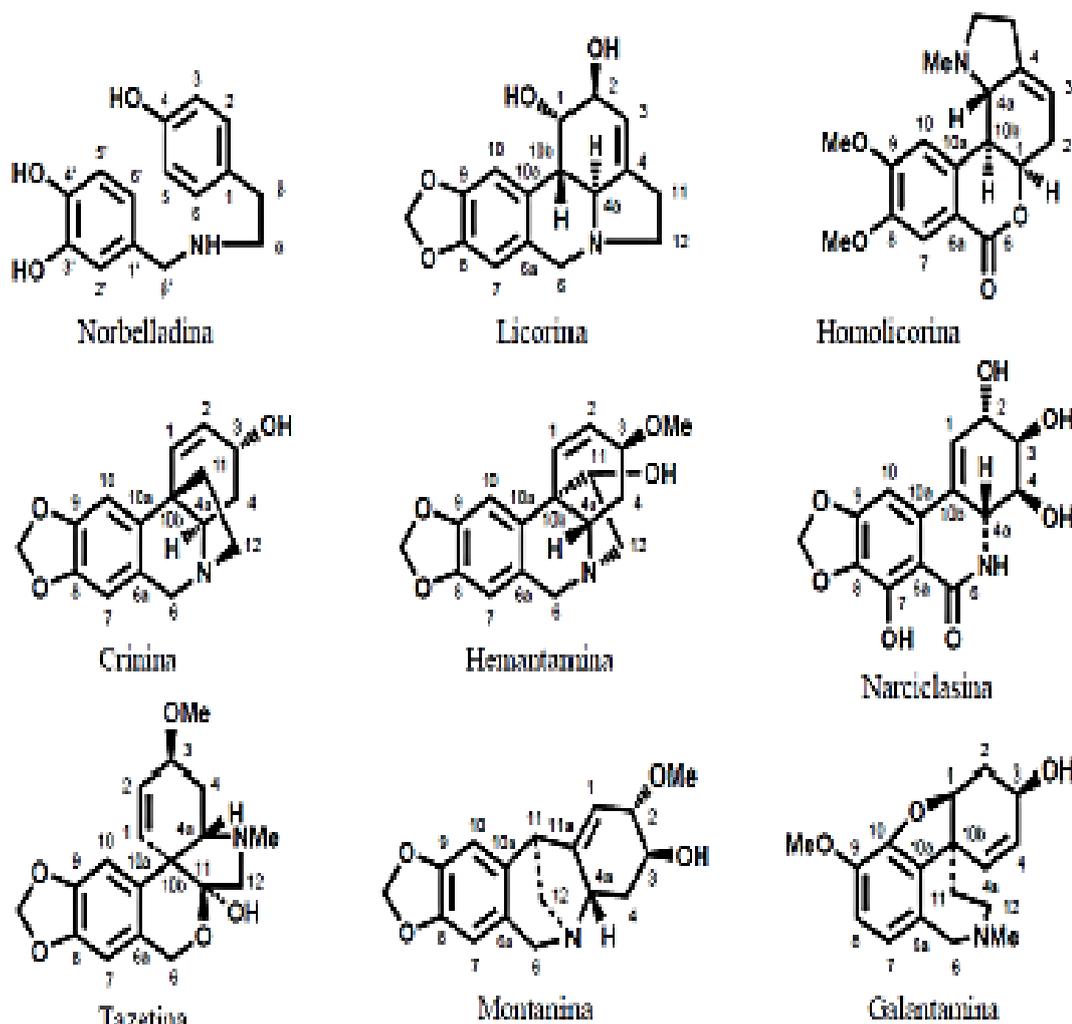


Figura 5-1: Estructura de los 9 tipos de alcaloides de Amaryllidaceae, con la numeración propuesta por Ghosal et al (1985)

Fuente: (Acosta et al. 2014;p. 179).

1.4 Galantamina

El alcaloide más importante de Amaryllidaceae es la galantamina, por primera vez su estructura fue aislada a partir de la planta *Galanthus woronowii* en 1950, y fue autorizada por la FDA para el tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer en el año 2001 (Tallini 2018; p. 5).

Es importante mencionar que se sigue utilizando el producto natural para sus formas farmacéuticas siendo así que la demanda ha surgido provocando interés en buscar nuevas especies productoras de galantamina (Tallini 2018; p. 5).

En plantas de diversos géneros de la familia Amaryllidaceae se han descrito la presencia de galantamina, incluyendo *Lycoris*, *Haemanthus*, *Hippeastrum*, *Hymenocallis*, *Narcissus*, y *Leocojum* (Tallini 2018; p. 6)

Los procesos fisiopatológicos descritos para la progresión de la enfermedad de Alzheimer implican degeneración de la sinapsis neuronal, principalmente caracterizado por el deterioro colinérgico. Por tal característica, los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) son de las principales clases de medicamentos prescritos (Coelho et al. 2018; pp. 1-14).

En la actualidad se utiliza como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer la galantamina como única sustancia natural, sin embargo existen varias especies de plantas que producen diversas clases de alcaloides, cumarinas, terpenos, polifenoles, que han sido evaluados por su actividad anti-AChE, convirtiéndose en posibles candidatos de medicamentos para EA (Coelho et al. 2018; pp. 1-14).

1.5 *Eucharis*

Es un género de plantas bulbosas que se caracteriza por tener hojas amplias de 20 a 55 cm de largo por 10 a 20 cm de ancho, pecioladas; los bulbos son de 2 a 6cm de diámetro además presentan flores actinomorfas, hermafroditas blancas y muy vistosas, similares a las flores del *Narcissus* (Meerow i Dehgan 1988; pp. 1857- 1870)

1.5.1 *Variación de especies de Eucharis*

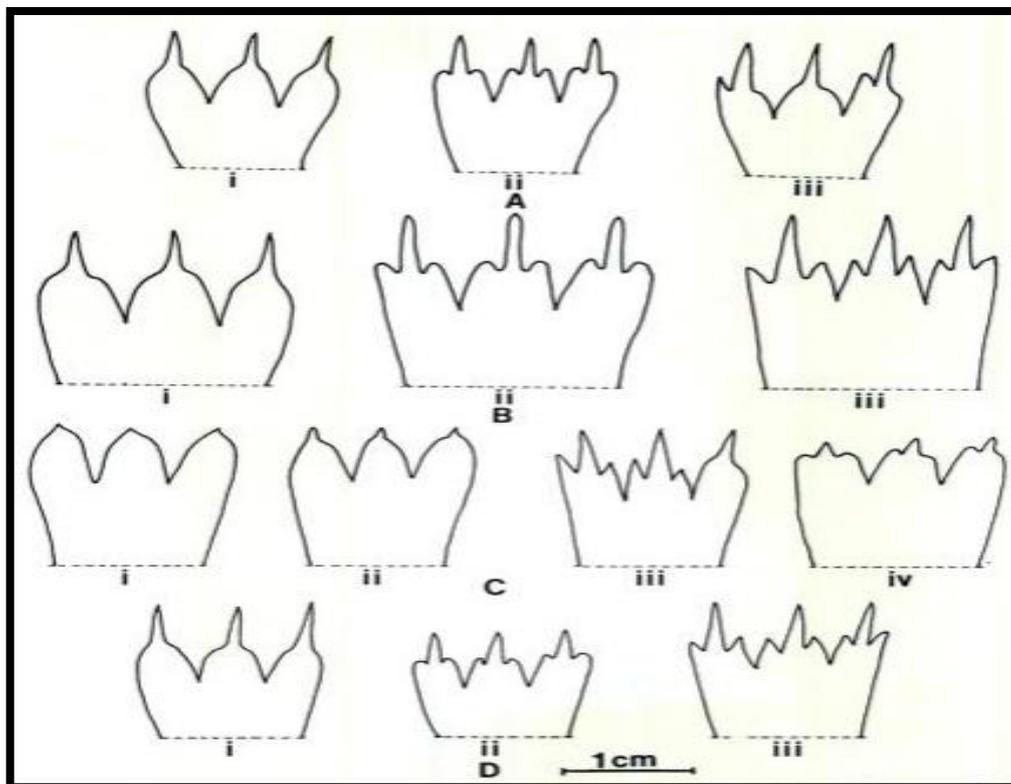


Figura 6-1: Eucharis copas estaminales: E.candida (A), E.formosa(B), E.bouchei(C), E.ulei(D).
Fuente: (Meerow i Missouri Botanical 1989; pp. 136-220).

1.5.2 Ecología

La mayoría de las especies de *Eucharis* se caracterizan por una distribución neotropical, distribuida desde Panamá hasta Bolivia ubicada en los bosques de las selvas lluviosas, además en la cuenca amazónica occidental del Ecuador incluyendo los ríos Napo, Pastaza y Huallaga, de igual forma en las laderas adyacentes más bajas de la cordillera oriental de los Andes (Meerow i Missouri Botanical 1989; pp. 136-220).

1.5.3 Etimología

Los británicos Jules Emile Planchon y Jean Jules Linden en el año 1853 difunden a esta especie plantar con el nombre de *Eucharis*, mismo que proviene del griego "eu" que significa verdadero y "kharis" que significa gracia, en alusión a la hermosura de sus flores (Meerow i Missouri Botanical 1989; pp. 136-220).

1.5.4 Especies

Eucharis está conforma por 19 especies que se detallan a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 2-1: Especies de *Eucharis*

N°	ESPECIE	INVESTIGADOR	UBICACIÓN GEOGRÁFICA
1	<i>Eucharis amazónica linden</i>	J. Gén. Hort	Norte del Perú y Ecuador y en otros muchos lugares del mundo
2	<i>Eucharis astrophiala</i> (<i>Ravenna</i>)	Ravenna	Centro y Norte de Ecuador
3	<i>Eucharis bakeriana</i>	N.E.Brown	Perú
4	<i>Eucharis bonplandii</i>	Traub, Pl. Life	Oeste de Colombia
5	<i>Eucharis bounchei</i>	Woodson y P. Allen	América Central
6	<i>Eucharis candida</i>	Planch y Linden	Sudeste de Colombia y Norte de Perú
7	<i>Eucharis castelnaeana</i>	J.F. Macbr	Oeste de América del Sur y norte de Brasil
8	<i>Eucharis caucana</i>	Meerow, Ann	Oeste de Colombia
9	<i>Eucharis corynandra</i>	Ravenna	Perú
10	<i>Eucharis cyaneosperma</i>	Meerow, Sida	Perú, Bolivia y norte de Brasil
11	<i>Eucharis formosa</i>	Meerow, Sida	Oeste de América del Sur
12	<i>Eucharis grandiflora</i>	Planch y Linden	Oeste de Colombia, oeste de Ecuador, y muchos otros lugares del mundo
13	<i>Eucharis lehmanni</i>	Regel, Gartenflora	Colombia (Cauca)
14	<i>Eucharis moorei</i>	Meerow, Sida	Ecuador y norte del Perú
15	<i>Eucharis oxyandra</i>	Ravenna	Perú

16	<i>Eucharis plicata</i>	Meerow, Brittonia	Del Perú a Bolivia
17	<i>Eucharis plicata</i>	Meerow, Ann	Del Perú a Bolivia
18	<i>Eucharis sanderi</i>	Baker, BotMag	Oeste de Colombia
19	<i>Eucharis ulei</i>	Kraenzl, Bot	Oeste de América del Sur y norte de Brasil

Fuente: (Missouri Botanical Garden, 1989)

Elaborado por: Raúl Chamorro, 2019



Figura 7-1: Distribuciones de *Eucharis*, *Caliphuria*, y *Urceolina* en Sudamérica

Fuente: (Meerow i Missouri Botanical 1989; pp. 136-220).

1.6 *Eucharis formosa*

Eucharis formosa Meerow es una especie de la familia Amaryllidaceae, comúnmente conocida como cebolla de la selva, *sacha* cebolla. Se usa tradicionalmente como cataplasma de los bulbos para el tratamiento de los tumores. (Meerow i Missouri Botanical 1989; pp. 136-220).

Se encuentra distribuida en lugares que poseen tierra rica, en suelo húmedo y seco bosque premontano y montañoso de la selva principalmente en las provincias de Napo, Pastaza, Sucumbíos y región amazónica ecuatoriana (Fig 9-1); menos frecuente en la amazonia de Perú área norcentral (ceja de la selva) y en Colombia cerca de Popayan a 100- 1800 m (Fig 6-1). Comúnmente su floración transcurre desde Enero a Marzo, emitiendo un templado y desagradable olor agrio (Meerow i Missouri Botanical 1989; pp. 136-220).



Figura 8-1: *Eucharis formosa* recolectada en la provincia de Sucumbíos-Cantón Shushufindi

Fuente: Lic. Karen Acosta, M. Sc, 2019.

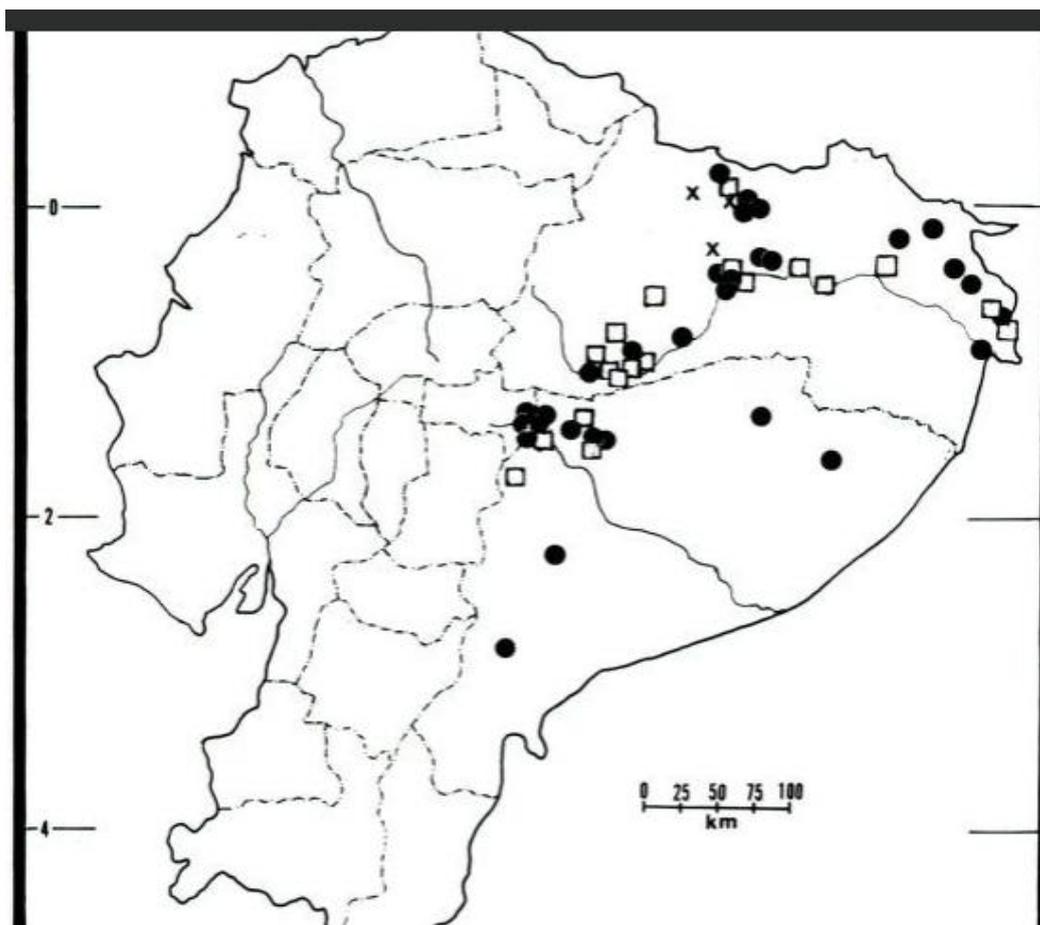


Figura 9-1: *Eucharis candida* (cuadrado) y *Eucharis formosa* en el Ecuador
Fuente: (Meerow i Missouri Botanical 1989; pp. 136-220).

1.7 Método de Ellman y colaboradores

La determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas se realizó bajo la metodología establecida por Ellman et al. (1961), modificado por Ortiz et al (2016).

El ensayo se llevó a cabo en microplaca de acuerdo al método de Ellman y col., 1961 modificado (Ortiz y col., 2016). Se adicionó 50 μL de AChE o BuChE disueltas en buffer (8 mM K_2HPO_4 , 2.3 mM NaH_2PO_4 , 0.15 M NaCl, pH 7.6) y 50 μL de la muestra disuelta en el mismo buffer. Se incubó la placa a 24 $^\circ\text{C}$ durante 30 min y se agregó 100 μL de solución sustrato (acetiltiocolina o butiriltiocolina, 0.1 M Na_2HPO_4 , 0.5 M DTNB, y 0.6 mM ATCI en Millipore water, pH 7.5). Luego de 5 min, la absorbancia fue leída en un lector de micro placas Thermo Scientific Multiskan FC a 405 nm. La actividad inhibitoria enzimática fue expresada como la concentración a la cual se inhibe el 50% de la actividad enzimática (IC_{50}), se compararon los datos de lectura de las muestras con la lectura de la enzima en buffer sin inhibidor. Los datos de inhibición enzimática fueron analizados con el software Microsoft Excel. Las concentraciones de las muestras evaluadas se expresaron como $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los extractos y como μM en el caso de compuestos puros. Los valores calculados de IC_{50} cuyo valor se encontró por encima de 200

µg/mL para extractos y por encima de 200 µM para compuestos puros, se consideraron inactivos. Las muestras se evaluaron por triplicado, en tres ensayos independientes y se calculó la desviación estándar

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

Es un método fotométrico cuya función principal es determinar la actividad de acetilcolinesterasa con un proceso sencillo y rápido que se mide siguiendo el aumento del color amarillo producido por la aparición de tiocolina (Ellman et al. 1961; pp. 88-95).

La tiocolina reacciona con el ácido 5,5- ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) que funciona como cromóforo desarrollando el compuesto amarillo mencionado anteriormente y que se puede medir espectrofotométricamente, basándose en el acoplamiento de estas reacciones (Ellman et al. 1961; pp. 88-95).

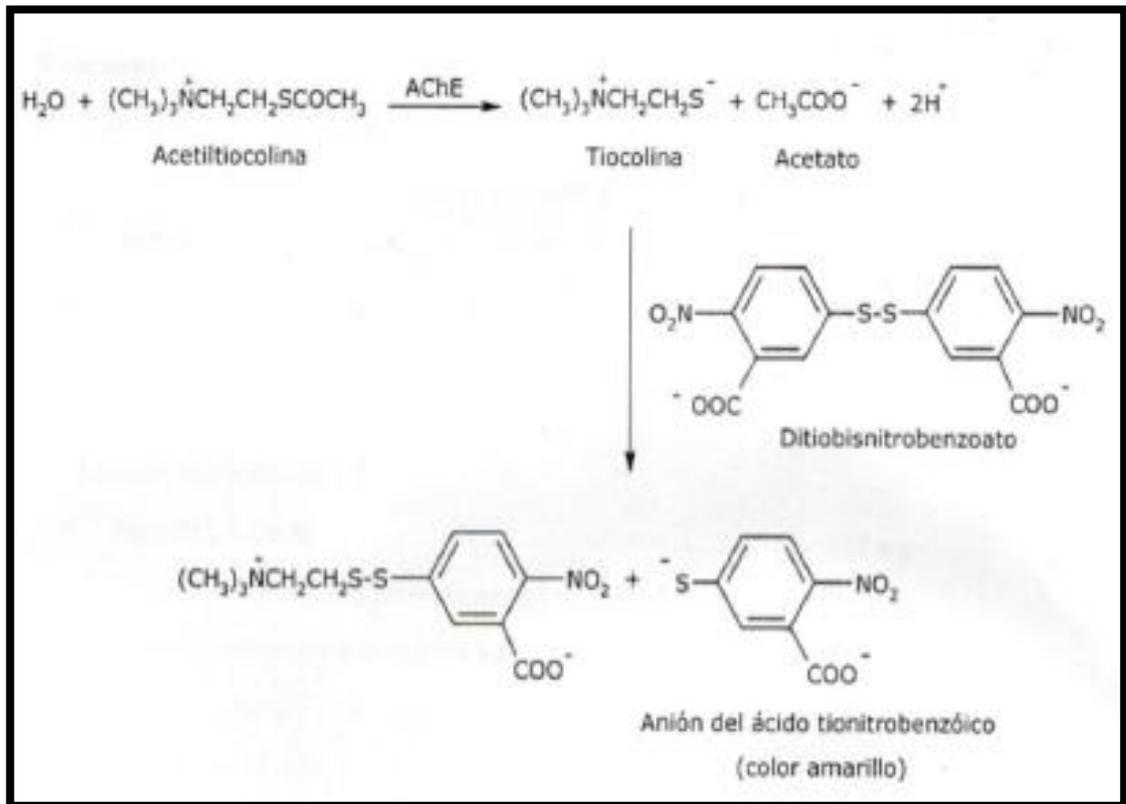


Figura 10-1: Reacción enzimática del método de Ellman para la actividad inhibitoria
Fuente: (Ellman et al. 1961; pp. 88-95)

1.8 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM) en el estudio de alcaloides de Amaryllidaceae.

La técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es de gran importancia para el estudio químico de los alcaloides de Amaryllidaceae, ya que esta herramienta genera una identificación inmediata de compuestos conocidos y la elucidación estructural descrita en los productos aislados por primera vez (Bastida, Lavilla i Viladomat 2006).

Estudios de CG-EM de extractos de especies de la familia Amaryllidaceae manifiestan que éstas poseen alcaloides en cantidades variadas. Las plantas procesan una mezcla de alcaloides entre una pequeña cantidad de alcaloides mayoritarios y una gran cantidad de alcaloides minoritarios, resultado de la diferencia del nivel de expresión genética de las enzimas implicadas en los procesos de biosíntesis y la especificidad del sustrato (Bastida, Lavilla i Viladomat 2006).

1.9 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM)

La cromatografía de gases es conocida como una herramienta analítica empleada para aislar mezclas de compuestos volátiles a través de una columna como fase estacionaria y, como fase móvil un gas inerte, tomando en cuenta que la temperatura es una variable importante en el proceso; las moléculas capaces de ser vaporizadas sin experimentar alteración son aptas para este análisis (Bastida et al. 2011;pp. 115-130).

El espectrómetro de masas es un instrumento que mide la relación existente entre la masa y carga de iones en la fase gaseosa, otorgando información sobre la riqueza de cada especie iónica, acoplada como detector de compuestos obtenidos (Bastida et al. 2011;pp. 115-130).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Tipo y diseño de investigación

La propuesta de esta investigación es de tipo y diseño experimental basada en el análisis de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto alcaloidal de la especie vegetal *Eucharis formosa*.

2.1.1 Muestra de análisis

Extracto alcaloidal de *Eucharis Formosa*

2.1.2 Población de la muestra de Estudio

Bulbos de *Eucharis formosa*, especie perteneciente a la familia Amaryllidaceae

2.2 Lugar de investigación

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (Riobamba-Ecuador). Además, los análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se realizaron en la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona (España).

2.3 Lugar de recolección de la especie vegetal.

La recolección de la especie vegetal *Eucharis formosa*, tuvo lugar en el cantón Shushufindi, Recinto el Mirador, kilómetro 5 vía a Nueva Loja, Provincia de Sucumbíos, Ecuador.

2.4 Identificación Botánica

Eucharis formosa fue identificada por la Dra. Nora Oleas, botánica responsable del Herbario de la Universidad Tecnológica Indoamérica (Quito-Ecuador).

Los bulbos de la especie *Eucharis formosa* fueron recolectados bajo el Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos No. MAE-DNB-CM-2015-0054 dentro del Proyecto “La Biodiversidad de Amaryllidaceae como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible”. Además, se gestionó el permiso de movilización otorgado por la correspondiente Dirección Provincial de Sucumbíos bajo Nro.MAE-DPAS-FAU-2018-041, para la movilización de especímenes de flora desde el lugar de recolección hasta las instalaciones de la Universidad Tecnológica Indoamérica en Quito y hacia la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en Riobamba.

2.5 Materiales, equipos y reactivos.

2.5.1 Materiales

Tabla 1-2: Materiales necesarios para la preparación de reactivos

Procedimiento	Cantidad	Material
Preparación de reactivos	2	Pipeta graduada de 1 mL
	1	Pipeta graduada de 5 mL
	1	Pipeta volumétrica de 10 mL
	1	Probeta de 100 mL
	6	Frascos ámbar de vidrio 500 mL
	1	Frascos ámbar de vidrio 1000 mL
	3	Frascos plásticos tipo viales 5 mL
	2	Balón de aforo de 100 mL
	2	Balón de aforo de 1 L
	1	Espátula
	1	Microespátula
1	Matraz 1000 mL	

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019.

Tabla 2-2: Materiales necesarios para la extracción de alcaloides

Procedimiento	Cantidad	Material
Extracción de alcaloides	1	Balón para rotavapor 250 mL
	1	Balón para rotavapor 1000 mL
	1	Desecador
	1	Embudo de separación de 500 mL
	1	Frascos ámbar de vidrio 1000 mL
	1	Probeta de 100 mL

	1	Probeta de 1000MI
	1	Vaso de precipitación de 250 ml
	1	Vaso de precipitación de 500 mL
	1	Papel Filtro
	1	Frasco plástico tipo vial

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019.

Tabla 3-2: Materiales necesarios para cada procedimiento

Procedimiento	Cantidad	Material
Evaluación de actividad inhibitoria presente en las enzimas AChE y BuChE	8	Bloques de hielo reutilizable
	1	Caja térmica de poliestireno expandida 4 L
	1	Caja térmica de poliestireno expandida 19 L
	1	Dispensador de líquido para pipeta multicanal
	5	Caja porta tubos
	1	Tubos eppendorff para microcentrífuga de 0.5 mL.
	1	Tubos eppendorf para microcentrífuga de 1.5 mL
	2	Tubos plásticos graduados con tapón rosca de 35 mL.
	1	Microplaca de 96 pocillos
	2	Rollo de toalla de papel
	1	Piseta
	2	Rollo de papel aluminio
	1000	Puntas azules para micropipeta
2000	Puntas amarillas para micropipeta	

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019.

2.5.2 Equipos.

Tabla 4-2: Equipos utilizados para la investigación según sus procesos.

Equipo	Procedimiento
Estufa de secado RedLineByBinder	Secado de especie vegetal
Balanza Analítica HDM, OHAUS	Pesaje en varios procesos
Molino H.Thomas C.O.	Reducción de tamaño de especie vegetal seca
Agitador magnético	Mezcla de reactivos
Sorbona	Obtención del extracto alcaloidal
Refrigerador	Conservación y mantenimiento de reactivos, enzimas, extracto alcaloidal de especie vegetal.

Congelador -14 °C	
Congelador -20 °C	
pHmetro Fisher Scientific	Regulación de pH en la preparación de reactivos
Rotavapor Heating Bath B-300 Base	Concentración de extracto alcaloidal
Sonicador	Obtención de extracto crudo
Baño de ultrasonido Branson 3510	Desplazamiento de reacciones en homogeneidad
Cromatógrafo de gases acoplado a Espectrómetro de masas	Identificación de alcaloides
Lector de Microplacas thermoScientific	
Microcentrífuga para tubos eppendorff	
Computador	Determinación de la actividad inhibitoria
Cronómetro	

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019.

2.5.3 *Reactivos*

Tabla 5-2: Reactivos utilizados para la investigación según sus procesos.

Reactivo	Ensayo
Agua Desionizada	
Agua Bidestilada	Preparación de reactivos y Lavado de materiales utilizados
Agua grado farmacéutico	
Metanol CH ₃ OH	Obtención del extracto crudo.
Ácido Sulfúrico H ₂ SO ₄	Obtención del extracto alcaloidal.
Éter etílico (C ₂ H ₅) ₂ °	
Acetato de etilo C ₄ H ₈ O ₂	
Hidroxilo de amonio NH ₄ OH	
Sulfato de Sodio anhidro Na ₂ SO ₄	
Goma arábica	Obtención del extracto alcaloidal
Fosfato dipotásico K ₂ HPO ₄	Determinación de la actividad inhibitoria de las enzimas colinesterasas.
Bifosfato de sodio NaH ₂ PO ₄	
Cloruro de sodio NaCl	
Fosfato de di sodio Na ₂ HPO ₄	
Ácido Clorhídrico 0.5 N HCl	
Acetilcolinesterasa AChE	
Butirilcolinesterasa BuChE	
Ácido 5,5 – ditio-bis- (2-nitrobenzoico) DTNB	
Galantamina	
Acetilcolina Yodada ATC	
Butirilcolina Yodada BTC	

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019.

2.6 Selección de la muestra vegetal

2.6.1 Criterio de inclusión

Las mejores especies vegetales, que presenten vigorosidad y buen estado deben poseer tallos, hojas, flores y /o frutos tiernos y frescos con superficies íntegras.

2.6.2 Criterio de exclusión

Son aquellas plantas que muestran daños por acción de animales y otros factores, además presentan deterioro por viento, agua; ejemplares que se encuentren en peligro de descomposición (Giberti i Domínguezia 1998; pp. 19-39).

2.7 Acondicionamiento de la muestra vegetal

Una vez que se seleccionó la muestra vegetal de *Eucharis formosa* limpia; se procede a fragmentarla capa por capa en porciones representativas de 2 cm con mucho cuidado para evitar daños y acelerar su secado. A continuación, se colocaron estos trozos en la estufa redLineBy BINDER durante 48 horas a 50 °C y una vez seco el material se procedió a triturarlo en un molino de cuchillas de marca H. Thomas, reduciendo así el tamaño de la muestra de 2 a 3 mm de diámetro.

2.8 Preparación del extracto alcaloidal

Se pesaron 20 gramos de material vegetal seco y se maceraron con 800 mL de metanol por un período de 72 horas, haciendo baños de ultrasonido entre 1 a 2 horas. Seguido a esto, se filtró el extracto metanólico y el solvente se evaporó a presión reducida con la ayuda de un rotavapor a temperatura de 50°C; el extracto bruto obtenido fue sometido a acidificación con H₂SO₄ (2% v/v) y en su limpieza se empleó éter etílico; de esta manera, se separó la fase orgánica que se caracteriza por retener los alcaloides (Acosta et al. 2014;p. 179).

Por otro lado, en la fase acuosa ácida se basificó con NH₄OH (25% v/v) hasta obtener aproximadamente un pH de 10; luego, se extrajo los alcaloides utilizando acetato de etilo logrando que estos queden retenidos en la fase organica (Acosta et al. 2014;p. 179), en la que fue necesario usar goma arábica y sulfato de sodio anhidro para eliminar todos los restos de agua y de esta forma se filtró los componentes evaporando el solvente con el rotavapor a 45°C de temperatura, en el que finalmente, se obtuvo el extracto de alcaloides totales, detallado en la siguiente figura:

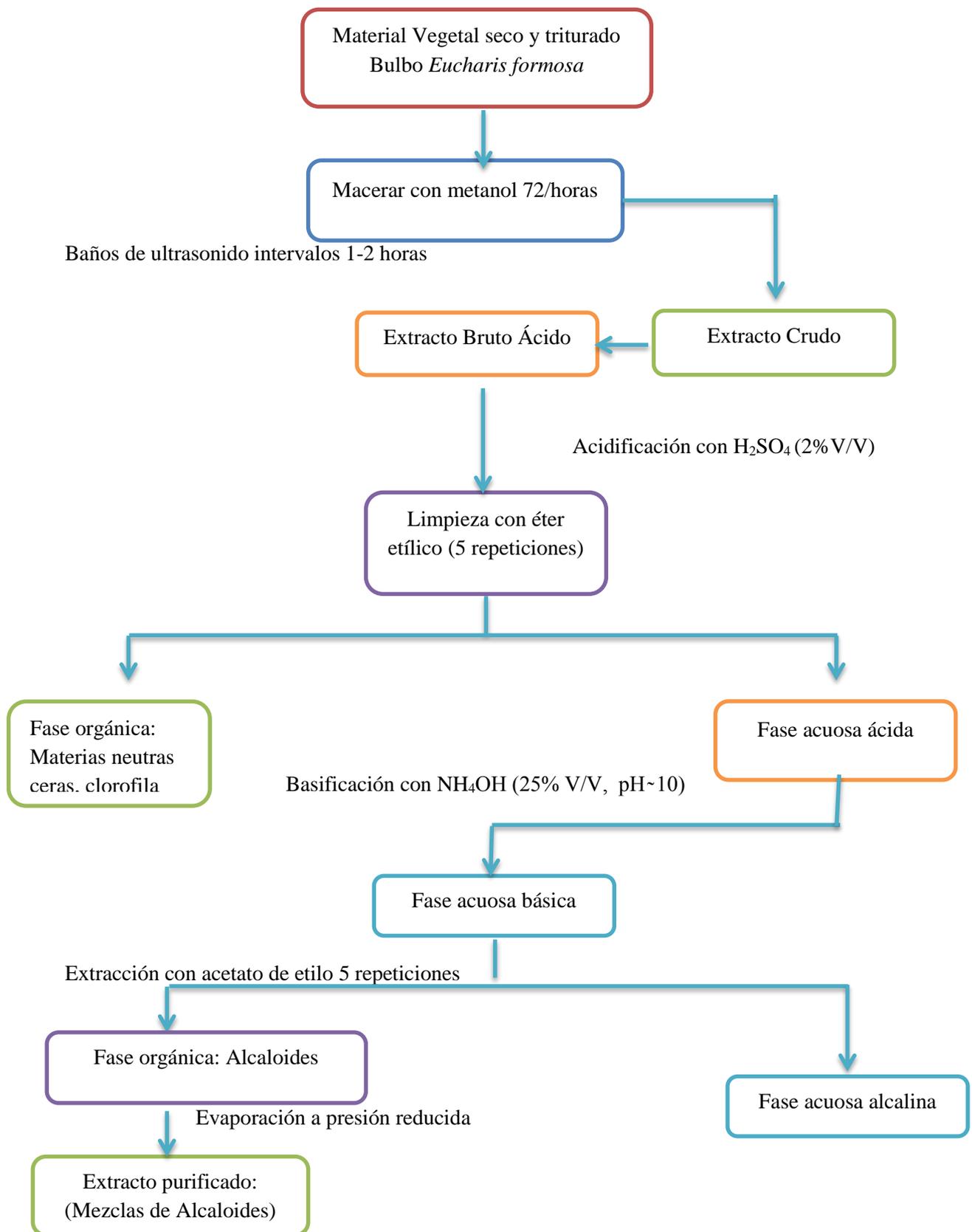


Figura 1-2: Esquema de la extracción de alcaloides del bulbo de *Eucharis formosa*.
 Realizado por: Raúl Chamorro, 2019.

2.9 Identificación de alcaloides *Eucharis formosa* por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas.

Una vez que se obtuvo el extracto de alcaloides de *Eucharis formosa* se efectuó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para lo cual se empleó un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 6890 y un espectrómetro de masas modelo 5975 de impacto electrónico que trabaja a 70 eV en una temperatura de 230°C.

El cromatógrafo de gases posee una columna SAPIENS-X5-MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) y tiene como fase estacionaria fenilmetilsilicona al 5%.

El programa de temperatura utilizado fue el siguiente:

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

En el desarrollo de este proceso la temperatura del inyector que se empleó fue de 280°C, además el flujo del Helio (He) era de 0,8mL/min, utilizando el método Splitless. El alcaloide estándar utilizado fue la codeína.

Para poder verificar la pureza de los análisis y el cálculo de índice de retención en los datos espectrales, se utilizó el software AMDIS 2.71 (NIST).

2.10 Preparación de soluciones

2.10.1 Reactivos

Tabla 6-2: Buffer Fosfato Salino (PBS)

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Fosfato di potásico (K_2HPO_4)	8 mM
Bifosfato de sodio (NaH_2PO_4)	2,3 mM
Cloruro de sodio NaCl	0,15 M
Agua Desionizada	1 L
Con NaOH ajustar a pH 7,5	0,5 N

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019.

Tabla 7-2: Solución Salina (Na_2HPO_4)

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Solución Salina (Na_2HPO_4)	0,04 M
Agua Desionizada	1000 mL
Con HCl ajustar a pH 7,5	0,5 N

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019.

DTNB (ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico)

Como reactivo empleado se utilizó D-8130 a una concentración de 2 mg/mL, misma que se conservó en una temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$, es importantes mencionar que esta solución es estable durante 3 meses.

2.10.2 Preparación de Sustratos

Se preparó yoduro de acetilcolina a una concentración de 1,7 mg /200 μ L

Se preparó yoduro de butiriltiocolina a una concentración de 1,9 mg/200 μ L

2.10.3 Preparación de enzimas

En AChE se utilizó la concentración 0,195U/mL y en BuChE una concentración de 0,260U/mL, los mismos que fueron colocados en tubos eppendorf de 0,5 mL a -20°C de temperatura para su conservación.

2.10.4 Compuesto de referencia (Galantamina)

El compuesto de referencia empleado (tableta de galantamina de 12 mg) se disolvió en un tubo plástico de rosca enraizado con PBS, obteniendo de esta manera la solución madre de galantamina y las posteriores diluciones necesarias.

Tabla 8-2: Diluciones de Galantamina.

Solución N°.	Concentración
1	1×10^{-3} M
2	1×10^{-4} M
3	1×10^{-5} M
4	$0,5 \times 10^{-5}$ M
5	1×10^{-6} M
6	$0,5 \times 10^{-6}$ M
7	1×10^{-7} M

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019.

2.11 Preparación de soluciones para determinar la actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE.

2.11.1 Muestra Alcaloidal de *Eucharis formosa*.

Se elaboró una solución madre del extracto alcaloidal de concentración 10 mg/mL con PBS, se homogenizó con un baño ultrasonido y con la ayuda de una agitador vórtex, permitiendo de esta manera que las partículas insolubles precipiten, tomando para nuestro ensayo el sobrenadante.

De esta manera se trabajó con 6 concentraciones del extracto alcaloidal del bulbo de *Eucharis formosa*.

Tabla 9-2: Concentración del extracto de alcaloides utilizado en el ensayo de inhibición AChE y BuChE para *Eucharis formosa*

No. Dilución	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	
	AChE	BuChE
1	50	300
2	25	200
3	10	150
4	5	100
5	1	50
6	0,5	25

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019.

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

2.12 Determinación de la actividad inhibitoria de Acetilcolinesterasa (AChE) y Butirilcolinesterasa (BuChE).

El protocolo empleado fue de Ellman et al. (1961) con modificaciones realizadas por Ortiz et al. (2015), cuyo objetivo radica en la determinación de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de la *Eucharis formosa* frente a las colinesterasas Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa (Ortiz et al. 2015; pp.1241-1248). Para ello se siguió el procedimiento que se encuentra a continuación:

1.- En una microplaca de 96 pocillos se colocó 50 μ L de galantamina (compuesto de referencia) o extracto alcaloidal, en la muestra (M) y el blanco muestra (BM).

2.- Seguidamente se añadió PBS en un volumen de 50 μ L en Control (C), 100 μ L en el Blanco Control (BC) y 150 μ L en el Blanco Muestra (BM).

3.- Luego, se prepararon las enzimas de AChE para se retiró del congelador un eppendorff totalmente recubierto de papel aluminio, se descongeló y posteriormente se lo disolvió en 32mL de PBS. Con respecto a BuChE, se siguió el mismo procedimiento anteriormente descrito únicamente que este se disolvió en 12mL de PBS; en caso de realizar una prueba de BuChE o AChE se añade estas enzimas en un volumen de 50 μ L en Control (C) y Muestra (M), placa es recubierta con papel aluminio; es importe indicar que los sobrantes se desechan una vez que se termina el ensayo.

4.- Una vez realizado el proceso anterior la microplaca fue incubada por el lapso de 30 minutos a 21°C.

5.-Mientras se espera de los 30 minutos se prepara el sustrato en un balón de aforo de 25 mL el mismo que debe estar cubierto con papel aluminio, se adicionó 1 eppendorff de DTNB más 1 eppendorff de ATC o BTC según sea el estudio realizado aforándolo con solución salina.

6.- Concluidos los 30 minutos de incubación se añade 100 μ L de sustrato en los pocillos Control (C), Blanco Control (BC) y Muestra (M).

7.- Al momento exacto de añadir el sustrato en los pocillos correspondientes se debe esperar 5 minutos para ingresar la placa en el espectrofotómetro de microplacas MULTISKAN GO ThermoScientific a una longitud de onda de 405 nm.

2.13 Análisis de Datos

Al obtener las muestras por triplicado de las absorbancias se determina el porcentaje de inhibición enzimática aplicando la siguiente fórmula:

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

M: Lectura de absorbancia de Muestra

C: Lectura de absorbancia de Control

BM: Lectura de absorbancia de Blanco Muestra

BC: Lectura de absorbancia de Blanco Control

2.13.1 *Determinación de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) mediante la curva de tendencia.*

Para la determinación de la concentración inhibitoria media se utilizó la ecuación lineal:

$$y = mx + c$$

Dónde:

Y= Porcentaje de inhibición (50)

X = Concentración

Se graficó la curva de inhibición, de manera que el eje X correspondió a la concentración del extracto de alcaloides y el eje Y el porcentaje de inhibición, obteniendo de esta manera la línea de tendencia. Con la ecuación obtenida se realizó el cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), que corresponde a la concentración del extracto alcaloidal a la cual se inhibe el 50% de las enzimas. El IC₅₀ se expresó como el resultado promedio ± la desviación estándar de tres pruebas individualizadas realizadas por triplicado.

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo trata sobre los resultados obtenidos en la identificación y la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *Eucharis formosa*, a partir de los métodos empleados y descritos en el capítulo anterior.

3.1 Obtención del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*

Tabla 1-3: Porcentaje de rendimiento de extracción en *Eucharis formosa*.

Material Vegetal	Bulbo de <i>Eucharis formosa</i>
Peso muestra seca	20 g
Volumen solvente (maceración)	800 mL
Extracto rico alcaloidal	15,8 mg
Porcentaje de rendimiento alcaloidal	0,079%

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019.

En la actualidad no existe información bibliográfica acerca de la especie *Eucharis formosa* con los que se pueda realizar una comparación de los resultados obtenidos; sin embargo, se ha encontrado que la especie *Eucharis bonplandii* presenta un porcentaje de rendimiento de 0,60 % y *Eucharis caucana* 0,17 % esta última con un porcentaje de rendimiento similar al de *E. formosa* (Cortes et al. 2017) pertenecientes al género *Eucharis*.

Se puede mencionar que el porcentaje de rendimiento de la especie *Eucharis formosa* frente a otras especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae endémicas del Ecuador es inferior tales como: *Phaedranassa cinérea* 0,11%, *Phaedranassa cuencana* 0,137%, *Phaedranassa tunguraguae* 0,15%, *Phaedranassa dubia* 0,2%, *Eucrosia mirabilis* 0,25%, *Phaedranassa glauciflora* 0,3%. (Salazar, 2017; Jaramillo, 2019; Montero, 2018; Inca, 2017; Carrillo, 2018; Baldeón, 2018)

3.2 Identificación de alcaloides presentes en bulbo de *Eucharis formosa* obtenidos mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM)

Tabla 2-3: Resultados de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas de los alcaloides presentes en *Eucharis formosa*.

Alcaloide	Rt	RI	% Total
Galantamina	22,250	2385,7	6,36
Codeína*	22,949	2431,2	10,64
O-metilmaritidina	23,296	2454,5	< 0,1

Hemantamina	25,885	2628,0	7,63
m/z 288 ^{*a} ;[M=289] ^{*b}	26,496	2669,0	< 0,1
11- hidroxivitatina/hamaina	27,009	2703,4	13,16
Incartina	27,517	2737,4	< 0,1
Licorina	27,621	2744,3	62,21

Fuente: Universidad de Barcelona
Realizado por: Raúl Chamorro, 2019.

INTERPRETACIÓN:

Rt..... Tiempo de retención

RI..... Índice de retención

%Total.....Porcentaje de abundancia del alcaloide respecto al total de la muestra.

m/z..... Relación masa/ carga

*a..... Pico base

*b..... Posible pico de ion molecular

* compuesto estándar

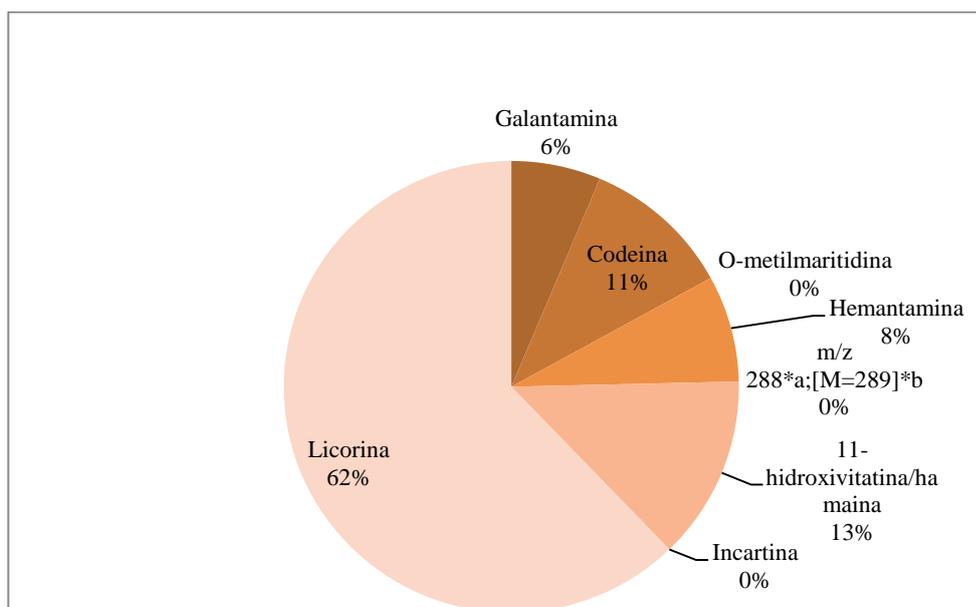
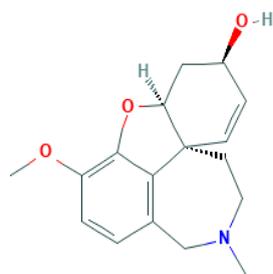
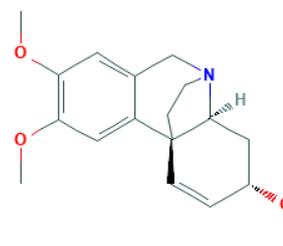


Gráfico 1-3: Alcaloides identificados en el extracto alcaloidal del bulbo de *Eucharis formosa*

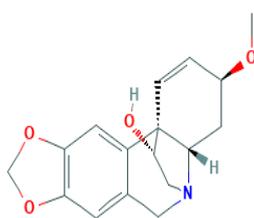
Realizado por: Raúl Chamorro, 2019.



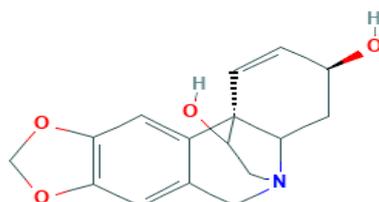
Galantamina



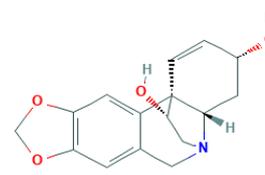
O-metilmaritidina



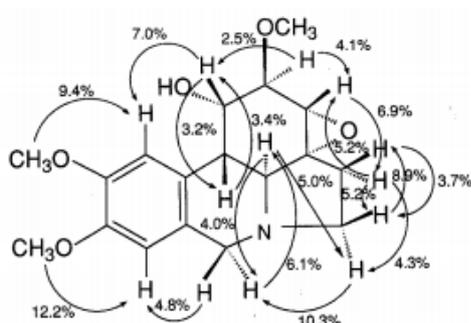
Hemantamina



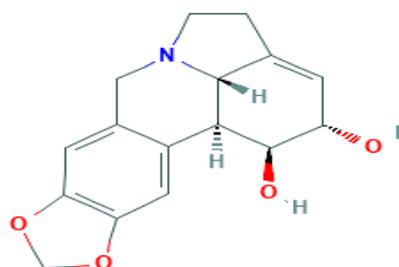
11- Hidroxivatina



Hamaina



Incartina



Licorina

Figura 2-3: Estructuras de los alcaloides identificados en el extracto de *Eucharis formosa*

Fuente: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

El extracto alcaloidal de *Eucharis formosa* está conformado por 6 alcaloides identificados y uno no identificado como resultado de la CG-EM. De los compuestos identificados, el de mayor porcentaje fue licorina con un total de 62,21 %, seguido de 11- hidroxivatina/hamaina presente en un 13,16 %; la galantamina con 6,36 %, hemantamina con 7,63 %, incartina al igual que O-metilmaritidina con 0 % y; finalmente, un compuesto no identificado siendo este m/z 288^a; [M=289]^{ab}, la codeína con 10,64 % como compuesto estándar,

En el caso de 11- hidroxivitatina/hamaina presenta dos alcaloides dentro del mismo porcentaje por lo que se necesitaría aplicar estudios complementarios como el dicroísmo circular que permita determinar cuál de los dos alcaloides está presente en el extracto de *Eucharis formosa*.

La familia Amarillydaceae está conformada por plantas conocidas por ser una vasta fuente de alcaloides farmacológicamente activos, siendo la licorina la primera entre los alcaloides en ser aislada de la planta *Narcissus pseudonarcissus*, permitiendo así que conjuntamente con sus derivados generen interés en el campo medicinal por sus estructuras divergentes y sus efectos biológicos (Roy et al. 2018; p.615).

La licorina es un alcaloide natural con un gran impacto terapéutico, siendo activa en una concentración baja con alta especificidad contra diversos tipos de cáncer tanto in vivo como in vitro, de igual forma contra varias células cancerosas resistentes a medicamentos (Roy et al. 2018; p.615)

De igual forma posee actividad inhibitoria para acetilcolinesterasa utilizada para el tratamiento de Alzheimer, destacándose los constituyentes de licorina por su potente actividad antiviral, antibacteriana, antiparasitaria, antitumoral, antimalárica, antiinflamatoria, antiplaquetaria, antifertil, emética, como también actividad antifúngica contra *Candida albicans*. (Acosta et al. 2014;p. 179).

La 11 – Hidroxivitatina se encuentra representada por alcaloides crinanos con el propósito de identificar nuevos constituyentes antiplasmoidales (Nair i Staden 2019; pp. 305-313).

Se describe el aislamiento del alcaloide hamaina conocido también como O-dimetilcrinamina de las semillas de la *Crinum asiaticum varjaponicum*. Además, este compuesto ha sido aislado de los bulbos de algunas especies de *Crinum* y *Brusvigia* (Petit, Banwell i Willis 2011; pp. 2009-2012).

Han sido utilizadas en medicina para el tratamiento de diversas dolencias tales como: pérdida de memoria, infertilidad, afecciones hepáticas, problemas renales, resfriados, dolor de espalda. En sí, hamaina muestra cumple actividades antiplasmoidales y citotóxicas; también inhibe la acetilcolinesterasa (AChE) (Petit, Banwell i Willis 2011; pp. 2009-2'012).

Hemantamina posee particular importancia ya que su actividad radica contra varias cepas de *Plasmodium falciparum* así su interés reside en su potencial actividad antipalúdica (Cedron et al. 2012; pp. 5464-5472).

Algunos de los alcaloides de Amaryllidaceae también son de particular importancia. interés por su potencial actividad antipalúdica: licorina, hemantamina, hemantidina y crinamina poseen importantes Actividad contra varias cepas de *Plasmodium falciparum* (Cedron et al. 2012; pp. 5464-5472).

También, demostrando que es un potente inhibidor de la KB oral humana, en el crecimiento de las células epidermoides (Nair i Staden 2019; pp. 305-313).

Los alcaloides de tipo galantamina se encuentran presentes en los bulbos de *Eucharis formosa* con un porcentaje total de 6,36 %, tiene actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa haciendo de este medicamentos usados para el tratamiento del Alzheimer (Acosta et al. 2014;p. 179).

La galantamina es el alcaloide de Amaryllidaceae más conocido y de acción prolongada, inhibidor selectivo, reversible y competitivo de AChE y también modula alostéricamente los receptores nicotínicos de acetilcolina (Emir et al. 2019; p. 63).

A pesar de que no existen estudios fitoquímicos de *Eucharis formosa*, se realizó un análisis comparativo con otras especies pertenecientes al mismo género para determinar si estas presentan los mismos alcaloides encontrados en *E. formosa*, siendo así que galantamina y licorina predominan en *E. bonplandii*, *E. amazónica* y *E. grandiflora* (Cortes et al. 2017); hamaina en *E. grandiflora*; 11-Hidroxivitatina en *E. grandiflora* y O-Metilmartidina en *E. amazónica* y *E. grandiflora* (Codina et al. 2007).

3.3 Determinación de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa* sobre acetilcolinesterasa.

Primer ensayo

En el primer *screening* de inhibición se usaron cuatro concentraciones (1, 10, 50, 100 µg/mL). Los resultados de esta primera prueba se encuentran en la tabla 3-3, en la que indican que el IC₅₀ del extracto alcaloidal se encuentra en las concentraciones de 1 µg/mL (33,488 ± 4,280) y 10 µg/mL (60,845 ± 1,254).

Tabla 3-3: Primer screening del porcentaje de inhibición de AChE por el extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de inhibición de AChE (%)
1 $\mu\text{g/mL}$	33,488 \pm 4,280
10 $\mu\text{g/mL}$	60,845 \pm 1,254
50 $\mu\text{g/mL}$	79,937 \pm 1,691
100 $\mu\text{g/mL}$	84,129 \pm 0,926

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019

Segundo ensayo

En base al ensayo anterior, se definieron seis concentraciones: 50; 25; 10; 5; 1; 0,5 $\mu\text{g/mL}$, con las cuales se obtuvo la ecuación de la recta, necesaria para el cálculo del IC_{50} . En la tabla 4-3, se puede observar que al utilizar la concentración 50 $\mu\text{g/mL}$ se inhibe AChE en un 83,10 % y además, se cumple con la condición de incluir al menos dos valores por encima del IC_{50} y dos valores por debajo de ese valor.

Tabla 4-3: Segundo screening del porcentaje de inhibición de AChE por el extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*

Concentración extracto alcaloidal ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de inhibición de AChE (%)
50 $\mu\text{g/mL}$	83,103 \pm 0,092
25 $\mu\text{g/mL}$	78,064 \pm 0,388
10 $\mu\text{g/mL}$	70,469 \pm 1,279
5 $\mu\text{g/mL}$	53,702 \pm 3,023
1 $\mu\text{g/mL}$	23,530 \pm 4,782
0,5 $\mu\text{g/mL}$	13,453 \pm 16,493

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019

Tabla 5-3: Inhibición del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa* sobre AChE

Compuesto	IC_{50} AChE ($\mu\text{g/mL}$)
Galantamina	0,71 \pm 0,02 $R^2 = 0,97$
Extracto alcaloidal de <i>Eucharis formosa</i>	4,223 \pm 0,435 $R^2 = 0,99$

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019

Para la actividad inhibitoria de la especie vegetal estudiada sobre acetilcolinesterasa, se realizaron tres repeticiones individuales cada una por triplicado, usando como compuesto de referencia galantamina, con los resultados obtenidos se calculó el IC_{50} .

Los resultados de la tabla 5-3 muestra que *E. formosa* tiene un $\text{IC}_{50} = 4,223 \pm 0,435 \mu\text{g/mL}$, el cual indica una alta actividad inhibitoria sobre AChE, respecto a galantamina que mostró un $\text{IC}_{50} = 0,71 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$.

En la actualidad no existe información bibliográfica sobre la especie *E. formosa* con los que se pueda comparar los resultados obtenidos; sin embargo, se menciona dos estudios del extracto de

alcaloides de *E. bonplandii* y *E. caucana* en el que se indica un alto nivel de actividad inhibitoria frente a AChE con un IC₅₀ en bulbos de $0,72 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ y alrededor de $5 \mu\text{g/mL}$ respectivamente (Cortes et al. 2017).

En el Ecuador los estudios de la familia Amaryllidaceae prometen un crecimiento elevado en los últimos tiempos para el género *Phaedranassa* en la que se muestra una alta actividad inhibitoria sobre AChE. *P. cuencana* IC₅₀ = $1,12 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ (Jaramillo 2019); *P. brevifolia* IC₅₀ = $3,45 \pm 0,29$ (Robles 2019); *P. tunguraguae* IC₅₀ = $11,12 \pm 1,87 \mu\text{g/mL}$ (Montero 2018); *P. dubia* IC₅₀ = $25,48 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ (Inca 2017); *P. cinérea* con IC₅₀ = $37,6 \pm 0,097 \mu\text{g/mL}$ (Salazar 2017); *P. glauciflora* IC₅₀ = $39,94 \pm 5,09 \mu\text{g/mL}$ (Baldeón 2018); sin embargo, *E. formosa* en relación al estudio de las especies mencionadas tiene actividad inhibitoria más alta.

La actividad inhibitoria que presenta *E. formosa* sobre AChE IC₅₀ = $4,223 \pm 0,435 \mu\text{g/mL}$ puede deberse a que los alcaloides muestran diferentes tipos estructurales en los cuales se han demostrado que tanto galantamina, licorina como incartina (Berkov et al. 2007), tienen elevadas propiedades inhibitorias para AChE (Cortes et al. 2017).

Este resultado muestra que la fracción alcaloidal de *E. formosa* IC₅₀ = $4,223 \pm 0,435 \mu\text{g/mL}$ tiene gran relevancia desde el punto de vista fitoquímico como farmacológico ya que posee inhibidores para la actividad de AChE como es galantamina; sin embargo, el alcaloide hemantamina que está presente en este extracto, indica que actúa inhibiendo el sitio activo tanto de AChE como de BuChE, de la misma forma vitatina se establece como molécula potencial con doble inhibición, basadas en resultados obtenidos por simulaciones de acoplamiento molecular (Cortes et al. 2017).

Finalmente, los resultados apoyan la relevancia química de la especie para la inhibición de colinesterasas y como potentes fuentes de metabolitos para el tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer.

3.4 Determinación de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa* sobre Butirilcolinesterasa.

Primer Ensayo

Se dio inicio evaluando la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *Eucharis formosa* en relación a la enzima, para lo cual de acuerdo a la metodología de Ellman *et al* con modificaciones se empleó concentraciones 1, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$; resultados que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6-3: Primer screening del porcentaje de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*

Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de inhibición de BuChE (%)
1 µg/mL	10,773 ± 22,705
10 µg/mL	14,081 ± 5,148
50 µg/mL	35,322 ± 6,165
100 µg/mL	52,540 ± 3,656

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019

De acuerdo a este primer monitoreo el extracto de *Eucharis formosa* inhibió a BuChE con un resultado mayor al 50 % en la concentración de 100 µg/mL, al contar únicamente con un dato superior se decidió realizar otro monitoreo con un aumento de concentraciones para la obtención de dos resultados por encima del 50 % de inhibición y dos por debajo del 50% y así verificar el método propuesto.

A continuación, se muestran los siguientes valores:

Tabla 7-3: Segundo screening del porcentaje de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*

Concentración extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de inhibición de BuChE (%)
300 µg/mL	70,967 ± 1,900
200 µg/mL	61,422 ± 1,586
150 µg/mL	52,720 ± 2,922
100 µg/mL	41,368 ± 5,111
50 µg/mL	29,072 ± 2,806
25 µg/mL	8,883 ± 1,992

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019

Con los resultados del primer *screening* se tuvo que elegir seis concentraciones, tal como se muestra en la tabla en las concentraciones de 300, 200 y 150 µg/mL existen valores en el que el porcentaje de inhibición sobrepasa el 50% y de la misma forma, en las concentraciones de 100, 50 y 25 µg/mL se encuentran por debajo del porcentaje respuesta, de esta manera se obtiene la curva de calibración agregando la línea de tendencia, es así que se alcanza la ecuación necesaria para la determinación del IC₅₀, mismo que se encuentra entre las concentraciones de 150 µg/mL (52,720 ± 2,922 %) y 100 µg/mL (41,368 ± 5,111 %).

Tabla 8-3: Inhibición del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa* sobre BuChE

Compuesto	IC ₅₀ BuChE (µg/mL)
Galantamina	R ² = 0,998 16,055 ± 1,335
Extracto alcaloidal de <i>Eucharis formosa</i>	R ² = 0,99 129,903 ± 12,636

Realizado por: Raúl Chamorro, 2019

Para la actividad inhibitoria de la especie vegetal estudiada sobre butirilcolinesterasa, se realizaron tres repeticiones individuales cada una por triplicado, usando como compuesto de referencia galantamina, con los resultados obtenidos se calculó el IC₅₀. Los resultados de la tabla 8-3 muestra que *E. formosa* tiene un IC₅₀ = 129,903 ± 12,639 µg/mL, el cual indica una actividad inhibitoria media sobre BuChE, respecto a galantamina que mostró un IC₅₀ = 16,055 ± 1,335 µg/mL.

De la comparación realizada entre *E. formosa* con IC₅₀ = 129,903 ± 12,639 µg/mL; *E. bonplandii* con IC₅₀ = 57,87 ± 9,14 µg/mL y *E. caucana* con IC₅₀ = 77,07 ± 9,62 µg/mL, indican que los principales compuestos presentes en la fracción alcaloide no inhibe eficientemente la enzima BuChE (Cortes et al. 2017).

En el Ecuador los estudios de la familia Amaryllidaceae para el género *Phaedranassa* muestran una actividad inhibitoria alta sobre BuChE. *P. cuencana* IC₅₀ = 21,53 ± 1,64 µg/mL (Jaramillo 2019); *P. brevifolia* IC₅₀ = 58,89 ± 0,55 µg/mL (Robles 2019); *P. tunguraguae* IC₅₀ = 64,49 ± 1,34 µg/mL (Montero 2018);

Por otro lado, la actividad inhibitoria sobre butirilcolinesterasa de las siguientes especies *P. dubia* IC₅₀ = 114,96 ± 4,94 µg/mL (Inca 2017); *P. cinérea* con IC₅₀ = 108,51 ± 8,98 µg/mL (Salazar 2017); muestran una actividad inhibitoria media al igual que *E. formosa* con IC₅₀ = 129,903 ± 12,636 µg/mL, a pesar de que

Por otro lado, la actividad inhibitoria sobre butirilcolinesterasa presentó un valor de IC₅₀ de (129,903 ± 12,636 µg/mL), a pesar de que ha sido comprobado que la BuChE tiene la capacidad de sustituir temporalmente la AChE inhibida y así hidrolizar la acetilcolina acumulada (Gabriel et al., 2017, p.3)

Si relacionamos el IC₅₀ de galantamina frente a AChE (0,71 ± 0,02 µg/mL), con el de este alcaloide frente a BuChE (129,903 ± 12,636 µg/mL), evidenciamos que el primero muestra mayor actividad inhibitoria, esto se debe a que la afinidad de galantamina sobre AChE es 50 veces superior a la que tiene sobre BuChE (Salazar et al., 2012, p.269).

Es conocido que los alcaloides de la familia Amaryllidaceae inhiben la BuChE en menor medida que la AChE, (Ortiz et al. 2015; pp.1241-1248), lo que explica la diferencia de valores de IC₅₀ producida por *E. formosa* para ambas colinesterasas, siendo mayor la inhibición de AChE.

La actividad inhibitoria de BuChE fue menor que la actividad inhibitoria de AChE este fenómeno es normal en la investigación enzimática, que puede ser atribuido a las diferencias de actividad inherente de AChE y BuChE. Aunque la inhibición de AChE tiene valor farmacológico significativo, la inhibición de BuChE juega un papel importante en la búsqueda de inhibidores en etapas moderadas de la enfermedad de Alzheimer (Cortes et al. 2017).

La actividad de BuChE aumenta progresivamente a medida que la gravedad de la enfermedad avanza, mientras que la actividad de AChE disminuye (Cortes et al. 2017).

CONCLUSIONES

- Mediante un protocolo basado en el cambio de pH y uso de solventes orgánicos se extrajo la fracción alcaloidal del bulbo de *E. formosa* obteniendo un rendimiento de 0,079 %.
- Mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se identificaron 6 alcaloides presentes en el extracto, siendo licorina el de mayor porcentaje con un total de 62,21 %, seguido de 11- hidroxivitatina/hamaina presente en un 13,16 %, hemantamina con 7,63 %, galantamina con 6,36 %, incartina al igual que O-metilmartidina menor a 0,1 %.
- Empleando el método de Ellman *et al* (1961) con modificaciones de Ortiz *et al* (2016) se determinó la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *E. formosa*, mostrando una alta actividad frente a Ache ($IC_{50} = 4,223 \pm 0,435 \mu\text{g/mL}$) respecto a la galantamina ($IC_{50} = 0,71 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$). Para Buche, el IC_{50} fue de $129,903 \pm 12,639 \mu\text{g/mL}$, lo que indica una actividad inhibitoria media, en comparación con galantamina ($IC_{50} = 16,055 \pm 1,335 \mu\text{g/mL}$); lo cual demostró que los alcaloides presentes en *E. formosa* presentan más afinidad hacia ACHE.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar investigaciones sobre el género *Eucharis* con el fin de comparar el perfil de alcaloides y la actividad inhibitoria frente a las colinesterasas, de igual forma realizar más estudios fitoquímicos de la especie *E. formosa*.
- Se debería realizar estudios complementarios de la molécula no identificada m/z 288^{*a};[M=289]^{*b} en el estudio de cromatografía de gases por espectrometría de masas, todo esto con el fin de encontrar posibles usos terapéuticos.
- Se recomienda desarrollar estudios de toxicidad de los alcaloides presentes en la especie *Eucharis formosa* por el potencial farmacológico en sus metabolitos y además por la limitada bibliografía que se posee sobre esta planta.

GLOSARIO

EA	Enfermedad de Alzheimer
AChE	Acetilcolinesterasa
ACh	Acetilcolina
AChEI	Inhibidor de Acetilcolinesterasa
BIFRENES:	La Biodiversidad Iberoamericana como Fuentes de Recursos Naturales para su Explotación Sostenible
BuChE	Butirilcolinesterasa
APOE-e4	Apolipoproteína E-4
Aβ: Beta	Amiloide
ADDLs	Ligandos difusibles a derivados de A β
UCH-L1	Ubiquitina humana
FDA	Food and Drug Administration
CYTED	Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
IC50	Concentración Inhibitoria media
OMS	Organización Mundial de la Salud
NMDA	Antagonista del receptor ácido- N- metil-D- aspartato.
DTNB	ácido 5,5- ditiobis-2-nitrobenzoico
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, K. et al.. *Identification of the alkaloids of stenomesson aurantiacum (kunth) herb ., an amaryllidaceae species. A: Pharmacology.* Vol. 3, (2014) Buenos Aires pp. 178-183.

ASAMBLEA NACIONAL DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR., *En Ecuador más de 100 mil personas sufren de alzheimer y otras demencias.* Asamblea Nacional (2016) [en línea]. Disponible en: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2016/11/RD_248332rivas_248332_355600.pdf.

ASSOCIATION, A. "Alzheimer ' s disease facts and figures. A: Alzheimer ' s & Dementia" [en línea]. (2018)., Vol. 14, pp. 367-429. [Consulta: 6 Julio 2019] ISSN 1552-5260. DOI 10.1016/j.jalz.2018.02.001. Disponible en : <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.001>.

BASTIDA, J; et al. Alkaloid Diversity in Galanthus elwesii and Galanthus nivalis. A: . Vol. 8, 2011, pp. 115-130.

BASTIDA, J., LAVILLA, R. I VILADOMAT, F."Chemical and biological aspects of narcissus alkaloids. A". Vol. 63, n° 6 (2006), pp. 87-103.

BERKOV S. et al. "Revised NMR data for Incartine: an Alkaloid from Galanthus elwesii. A" (2007): . pp. 1430-1435.

CARRILLO.J., "Evaluación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Eucrosia mirabilis*". [En línea] (Trabajo de titulación) Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, Ecuador 2018.pp 22-24 [Consulta: 2019-06-28] Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8842/1/56T00773.pdf>

CEDRÓN, J.C. et al. "Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives": *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* Vol. 20, 2012 pp. 5464-5472. DOI 10.1016/j.bmc.2012.07.036.

CHENG, Z. et al. "Molecular-docking-guided design and synthesis of new IAA-tacrine hybrids as multifunctional AChE / BChE inhibitors". *Bioorganic Chemistry* [en línea]. Elsevier, Vol. 83, núm 10. 2018, pp. 277-288. ISSN 0045-2068. Disponible en : <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.057>.

CODINA, C. et al., "Alcaloides Y Actividad Biológica En Eucharis amazonica, E. grandiflora, Caliphurria subedentata y Crinum kunthianum, especies colombianas de amaryllidaceae". *Scientia Et Technica*. Vol. 33, 2007, p. 237-241.

COELHO, T. et al., Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer ' s Disease Therapy. A: *Frontiers in Pharmacology*. Vol. 9, núm 6. 2018, pp. 1-14.

CONTRERAS, P. & HANS. J. "Esbozo de alois alzheimer." *Sociedad Peruana de Epidemiología* [en línea]. Vol. 18, 2014 pp. 1-5. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203131355014>.

CORTES, N. et al., "Alkaloids of Amaryllidaceae as Inhibitors of Cholinesterases (AChEs and BChEs)": *An Integrated Bioguided Study*. A: . núm. 67. 2017. pp 32-36.

DOMINY, S. et al. "Porphyromonas gingivalis in alzheimer ' s disease brains : evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors": *science advances*. 2019. pp. 1-22.

ELLMAN, G. et al. "A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination." : *Biochemical Pharmacology*. Vol. 7, 1961 pp. 88-95.

EMIR, C. et al. "South African Journal of Botany Phytochemical constituents from Galanthus alpinus Sosn . var . alpinus and their anticholinesterase activities." *South African Journal of Botany* [en línea]. 2019. Elsevier B.V., Vol. 121, pp. 63-67. [Consulta: 22 agosto 2019] ISSN 0254-6299. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.10.021>.

FISH, P. et al. "New Approaches for the Treatment of Alzheimer's Disease". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [en línea]. 2018 Elsevier Ltd, pp 22-24 [Consulta: 12 Julio 2019] ISSN 0960-894X. Disponible en : <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.034>.

FISHER, A. "Cholinergic Treatments with Emphasis on M1 Muscarinic Agonists as Potential Disease-Modifying Agents for Alzheimer ' s Disease." *American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. Vol. 5, n°6 (2008), (United State of America) pp. 433-442.

FORTENBERRY, M. & CROWDER, J. "The Use of Codeine and Tramadol in the Pediatric Population — What is the Verdict Now?": *Journal of Pediatric Health Care* [en línea] 2019. Elsevier B.V., Vol. 33, núm. 1, p. 117-123. [Consulta: 19 Agosto 2019] ISSN 0891-5245. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pedhc.2018.04.016>.

FRIEDEN, C.& WANG, H. "A mechanism for lipid binding to apoE and the role of intrinsically disordered regions coupled to domain domain interactions" *Design Studies*. (2017) pp. 1-6.

GALI, L. & BEDJOU, F. "South African Journal of Botany Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract , ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*." *South African Journal of Botany* [en línea] 2018. South African Association of Botanists, pp. 1-7.[Consulta: 29 junio 2019]. ISSN 0254-6299. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.011>.

GIBERTI, G. & DOMÍNGUEZIA. I. "Herborizacion y herbarios como referencia en estudios tecnico -cientificos.": *Domínguezia*. Vol. 14, 1998 pp. 19-39.

GONG, C. et al. "Dysregulation of Protein Phosphorylation / Dephosphorylation in Alzheimer ' s Disease : A Therapeutic Target." *Investigación y ciencia*. Vol 2. 2006, pp. 1-11.

INCA, S., "Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *phaedranassa dubia*". [En Línea]. (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.Riobamba- Ecuador 2017. pp 22-23 [Consulta: 2019-07-14]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7927/1/56T00742.pdf>

JARAMILLO, T., "Determinación de la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de *phaedranassa cuencana*, sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa." [En Línea]. (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.Riobamba- Ecuador 2019. pp 12-20 [Consulta: 2019-05-10]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7927/1/56T00742.pdf>

JHA, D. et al. "Alzheimer ' s Disease Detection Using Extreme Learning Machine , Complex Alzheimer ' s Disease Detection Using Extreme Learning Machine , Complex Dual Tree Wavelet Principal Coefficients and Linear Discriminant Analysis." *American Scientific Publishers*. Vol. 8, núm3. (2018), pp. 1-10.

JIN, Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. A: *Natural Product Reports*. Vol. 26, 2009 p. 363-381. DOI 10.1039/b718044f.

JULIEN, C. et al."In vivo induction of membrane damage by β -amyloid peptide oligomers." *Acta Neuropathologica Communications*. 2018 pp. 1-16.

KATSUMOTO, A. et al. "Microglia in Alzheimer ' s Disease : Risk Factors and Inflammation."

Frontiers in Neurology. Vol. 9, núm. November, 2018 pp. 1-7. DOI 10.3389/fneur.2018.00978.

KAYA, G. et al. "South African Journal of Botany Chemical characterization and biological activity of an endemic Amaryllidaceae species : Galanthus cilicicus." *South African Journal of Botany* [en línea]. 2017 South African Association of Botanists, Vol. 108, núm. 1341, pp. 256-260. [Consulta: 15 julio 2019]. ISSN 0254-6299. DOI 10.1016. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2016.11.008>.

KUPPUSAMY, A., GEORGE, S. & ARUMUGAM, M."Combining in silico and in vitro approaches to evaluate the acetylcholinesterase inhibitory profile of some commercially available flavonoids in the management of alzheimer's disease" *International Journal of Biological Macromolecules* [en línea]. 2016 Elsevier B.V., pp. 1-16. [Consulta: 19 junio 2019]. ISSN 0141-8130. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.062>.

LOBBENS, E. et al. "Screening of plants used in the European traditional medicine to treat memory disorders for acetylcholinesterase inhibitory activity and anti amyloidogenic activity." *Journal of Ethnopharmacology* [en línea] 2017. Elsevier, pp. 1-38. [Consulta: 26 mayo 2019] ISSN 0378-8741.. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.020>.

M, P., 1966. THE INHIBITORY EFFECT OF TRIS ON THE ACTIVITY OF CHOLINESTERASES. A: *Biochimica et Biophysica*. Vol. 139, núm. 1967, p. 3-7.

MATHARU, B. et al. "Journal of the Neurological Sciences Galantamine inhibits β -amyloid aggregation and cytotoxicity." *Journal of the Neurological Sciences* [en línea]. 2009 Vol. 280, N°2, pp. 49-58. [Consulta: 30 julio 2019] ISSN 0022-510X. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2009.01.024>.

MEEROW, A. & DEHGAN, B. Pollen Morphology of the Eucharideae (Amaryllidaceae). A: *Botanical Society of America, Inc.* núm. 12, (1988) pp. 1857-1870.

Meerow, A, Jost, L. & Oleas, N. "Two new species of endemic Ecuadorean Amaryllidaceae (Asparagales, Amaryllidaceae)" *PhytoKeys*. Vol. 9, (2015) pp. 1-9.

MEEROW, A. & MISSOURI B, "Systematics of the Amazon Lilies, Eucharis and Caliphurria Annals of the Missouri" *Botanical Garden*, Vol 76, N°1 (1989), pp. 136-220

MERINO, E., SENDIN, M. & OSORIO, J. "Enfermedad de Alzheimer." *Revista de la educación superior* [en línea]. 2015 Elsevier España, S.L.U., Vol. 11, núm. 72, pp. 4306-4315.

[Consulta: 18 julio 2019]. ISSN 0304-5412. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.med.2015.01.002>.

MONTERO.L, 2018. Evaluación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto alcaloidal de "*Phaedranassa tunguraguae*" [En Línea]. (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.Riobamba- Ecuador 2018. pp 22-26 [Consulta: 2019-07-19]. Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/8826/1/56T00762.pdf>

NAIR, J, I STADEN, & J. VAN."The Amaryllidaceae as a source of antiplasmodial crinine alkaloid constituents." *Fitoterapia* [en línea]. 2019 Elsevier, Vol. 134, N°2. January, pp. 305-313. ISSN 0367-326X. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.02.009>.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD Centro de Prensa [EN LINEA] 2019 [Consulta 30 septiembre 2019] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia#.XZez2My18Wg.gmail>

ORTIZ, J.E. et al., 2015. "Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and Their Cholinesterase-Inhibitory Activities: An in Vitro and in Silico Study." *Natural Products*. 2015 pp. 1-8.

ÖZTASKIN, N. et al. "Bioorganic Chemistry Novel antioxidant bromophenols with acetylcholinesterase , butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitory actions". *Bioorganic Chemistry*. Vol. 74. (2017) pp. 104-114.

PETIT, L., BANWELL, M.G. I WILLIS, A.C."The Total Synthesis of the Crinine Alkaloid Hamayne via a Pd [0] -Catalyzed Intramolecular Alder-Ene Reaction." *Organic - Letters*. N°1, (2011), pp. 2009-2012. ISSN 03788741. DOI 10.1016/j.jep.2007.05.006

PLANCHON, E. & AMARYLLIDACEAE, L."Uso tradicional terapêutico de espécies pertencentes ao gênero vegetal Eucharis Planchon & Linden (Amaryllidaceae) Use traditional therapeutic of plant species belonging to the. A": *Etnobotanica*. Vol. 10, N°1, (2016) pp. 13-22. ISSN 87410378. DOI 10.5935/2446- 4775.20160002.

PLANIFICACIÓN, R. DEL E.C.NA. Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021. Toda una Vida. A: *Consejo Nacional de Planificación y Desarrollo* [en línea]. (2017) pp. 1-148. Disponible a: http://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/10/PNBV-26-OCT-FINAL_0K.compressed1.pdf.

RINNE, J.O. et al."Tolerability of ORM-12741 and effects on episodic memory in patients with

Alzheimer ' s disease." *Alzheimer's & Dementia*. Vol. 3, (2017) p. 1-9. ISSN 788741. DOI 10.1016/j.trci.2016.11.004.

ROBLES, J. "*Determinación de la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de phaedaranassa brevifolia, sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa*" (Trabajode titulación) Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, Riobamba- Ecuador 2019. pp 22-24

ROY, M. et al., "A prospective natural lead for anticancer drug discovery." *Biomedicine & Pharmacotherapy* [en línea].(2018), Vol. 107, N°2, pp. 615-624. [Consulta: 18 de mayo 2019] ISSN 0753-3322. DOI 10.1016/j.biopha.2018.07.147. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.147>.

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

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

SABBAGH, M."Drug Development for Alzheimer ' s Disease : Where Are We Now and Where Are We Headed ?" *American Journal of Geriatric Pharmacotherapy* [en línea] 2019. Excerpta Medica Inc., Vol. 7, N°3, pp. 167-185. ISSN 1543-5946. DOI 10.1016/j.amjopharm.2009.06.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjopharm.2009.06.003>.

SANABRIA-CASTRO, A., Alvarado-Echeverría, I. i Monge-Bonilla, C., 2016. Estrategias terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer Alzheimer ' s disease therapeutic strategies. A: *Neurobiología*. Vol. 7, núm. 15, p. 1-17.

TALLINI, L.R.. "Estudio de los alcaloides de las Amaryllidaceae como fuente de nuevas moléculas bioactivas. Taxonomy, Re-Establishment and Lectotypification of Eucharis amazonica Linden ex Planchon." *International Association For Plant Taxonomy*. Vol. 33, N° 3, 2018. pp. 416-422.

Truglio M. & Slyer, J. "Caregiver decisions along the Alzheimer ' s disease trajectory." *Geriatric Nursing* [en línea]. 2018, Vol. 1. ISSN 0197-4572. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.gerinurse.2018.10.015>.

VALNEGRI, P. et al.. "Ubiquitin signaling suppresses synapse formation in the mammalian brain." *Nature Communications* [en línea]. 2017 Springer US, pp. 1-15. ISSN 2041-1723.

Disponibile en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-01333-6>.

VERGURA, S., et al. "Absolute configuration assignment to anticancer Amaryllidaceae alkaloid jonquailine." *Fitoterapia* [en línea]. 2018, Vol. 12., pp. 78-84. [Consulta: 26 Agosto 2019], Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.06.013>.

WANG, Y. et al. "Identification of the optimal cognitive drugs among Alzheimer ' s disease : a Bayesian meta-analytic review." *Dove Medical press*. Vol. 13, (2018) pp. 2061-2073. ISSN 00368075. DOI 10.1126/science.1132814

ZHAN, G. et al. "Amaryllidaceae alkaloids with new framework types from *Zephyranthes candida* as potent acetylcholinesterase inhibitors." *European Journal of Medicinal Chemistry* [en línea], 2016 Elsevier Ltd, pp. 1-26. 2016 [Consulta: 2 Agosto 2019]. ISSN 1060-6507 Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.057>.

ANEXOS

Anexo A: Especie vegetal *Eucharis formosa* recolectada en la provincia de Sucumbíos, cantón Shushufindi en el año 2018



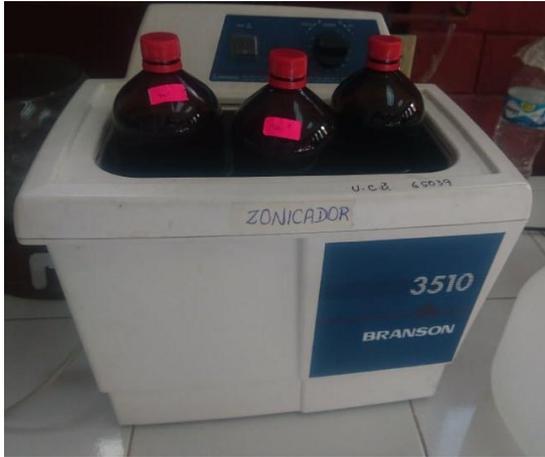
Anexo B: Acondicionamiento del material vegetal



Cortes del bulbo en estado seco

Trituración del material vegetal (bulbo)

Anexo C: Preparación del extracto crudo



Sonicación a intervalos de tiempo



Filtrado de extracto crudo de *Eucharis formosa*

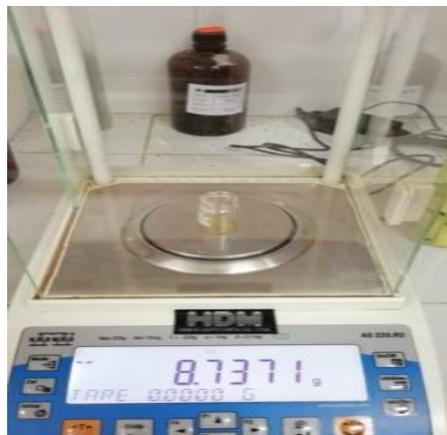
Anexo D: Extracción de alcaloides de *Eucharis formosa*



Filtrado y desengrasado del extracto



Concentración del extracto de *Eucharis formosa*



Extracto purificado mezcla de alcaloides

Anexo E: Ensayo de inhibición de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Eucharis formosa*.



Anexo F: Curva de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*, para el cálculo de IC₅₀, ejecutadas en tres días respectivamente

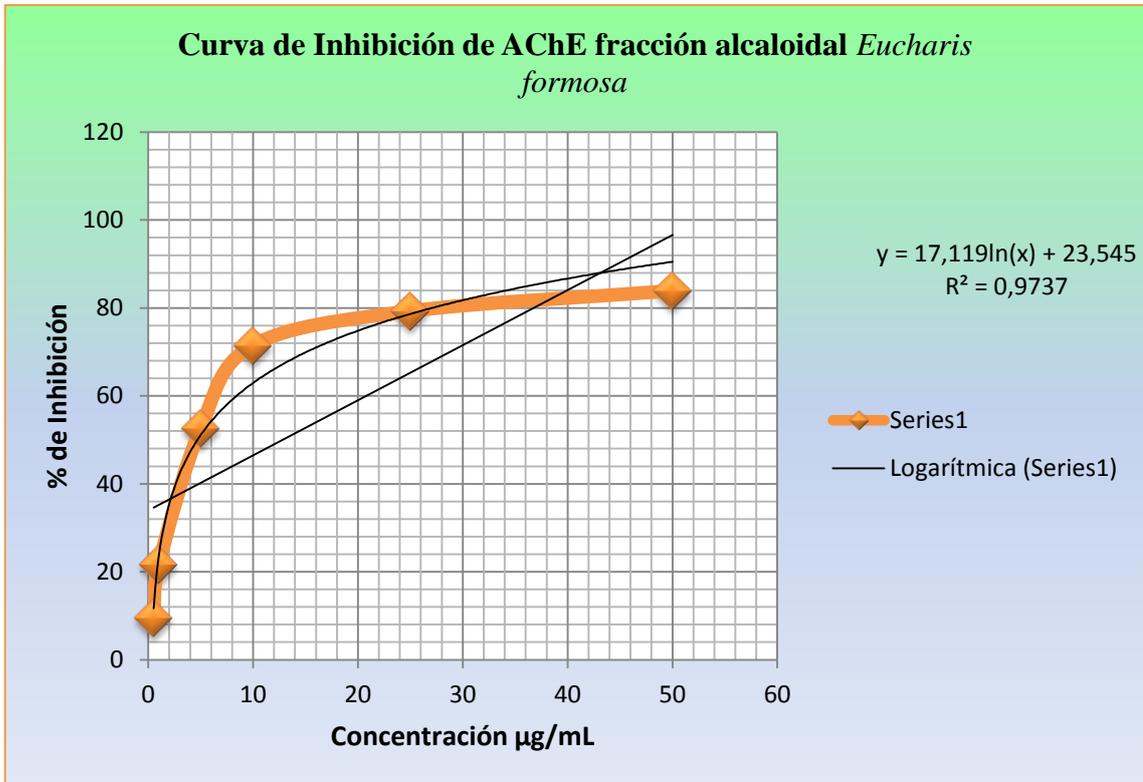


Gráfico1: Primer ensayo de Inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*

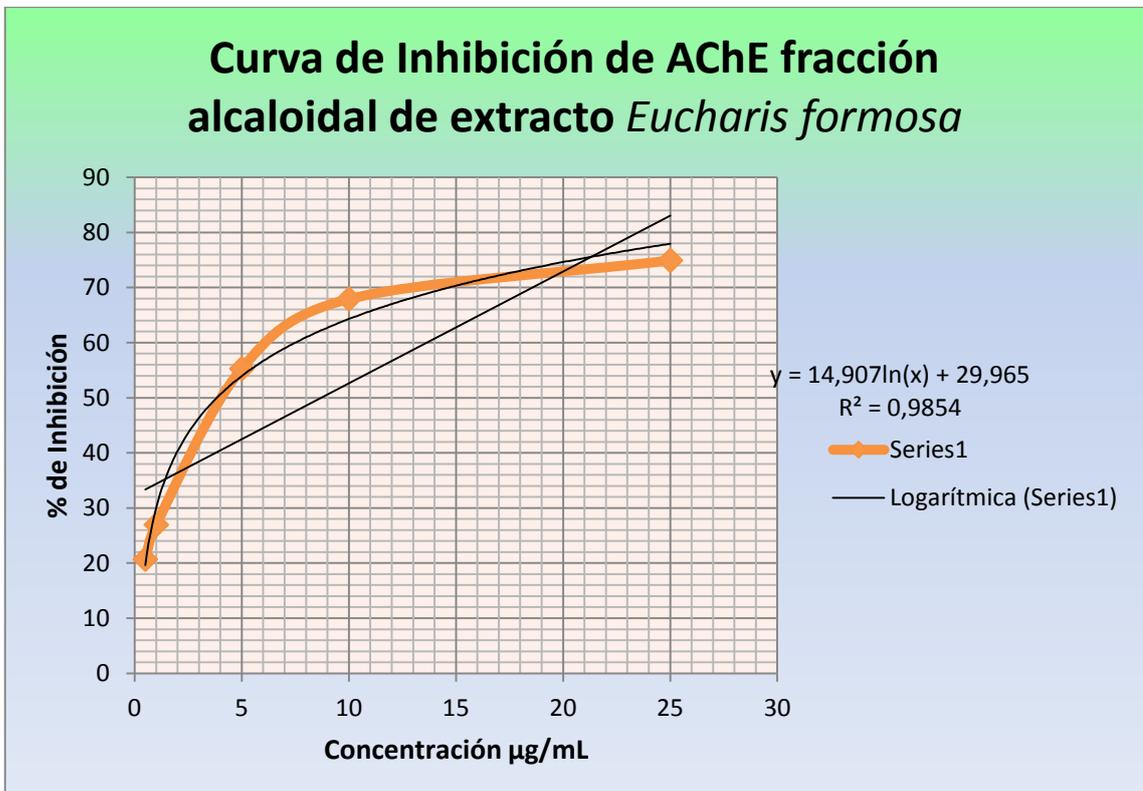


Gráfico 2: Segundo ensayo de Inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*

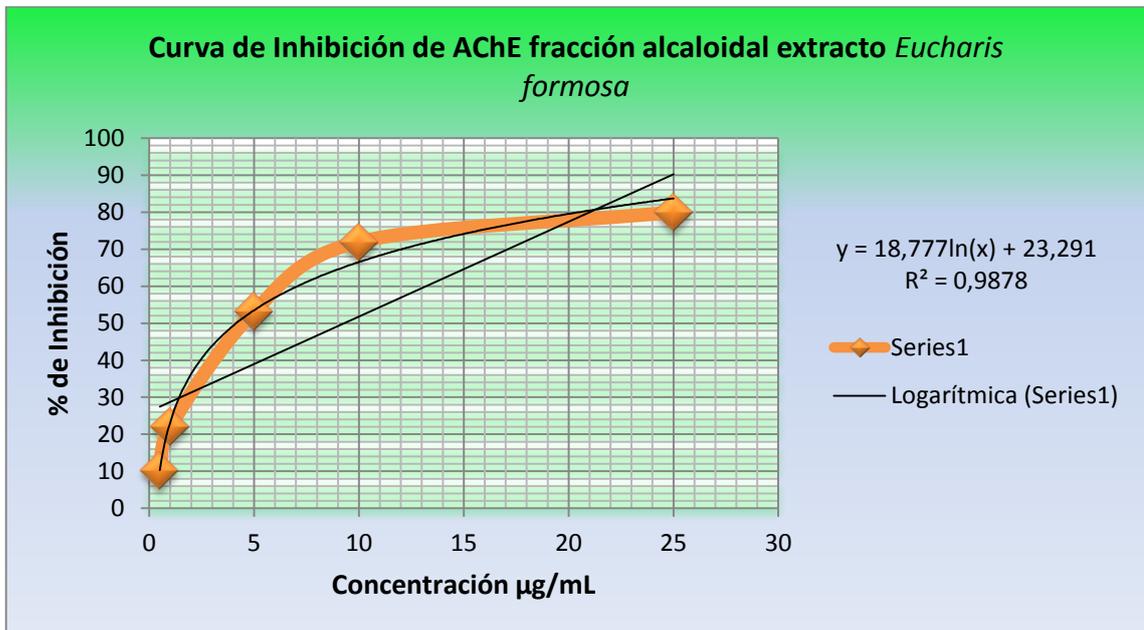


Gráfico 3: Tercer ensayo de Inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*

Anexo G: Curva de inhibición de butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*, para el cálculo de IC₅₀, ejecutadas en tres días respectivamente.

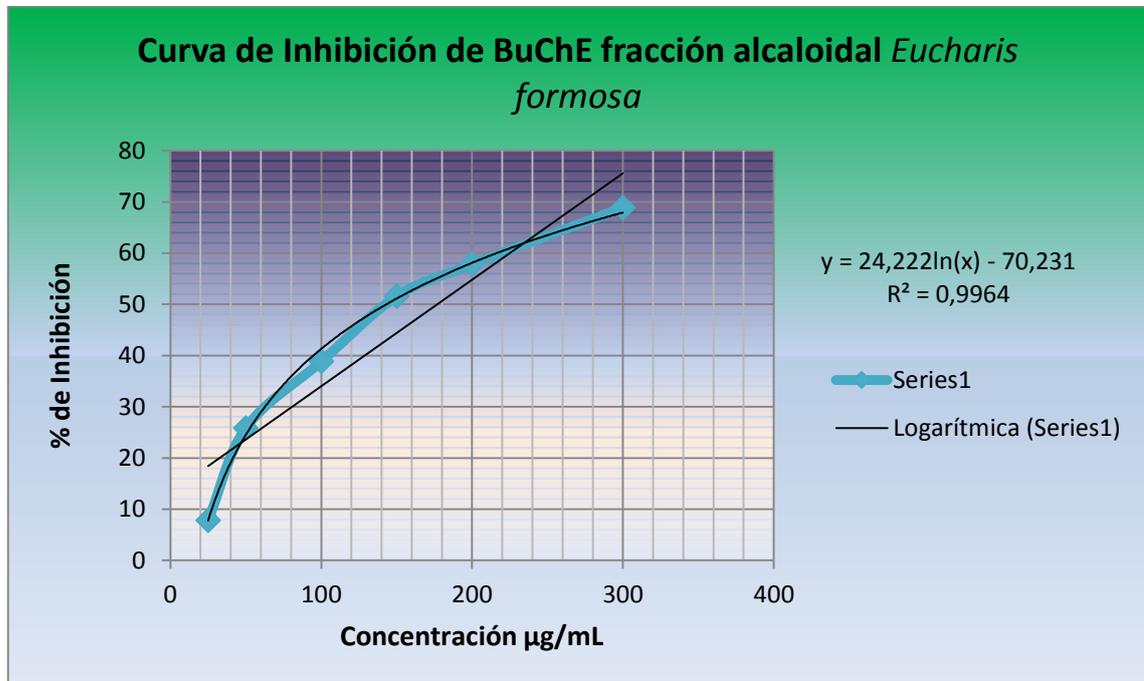


Gráfico 4: Primer ensayo de Inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*.

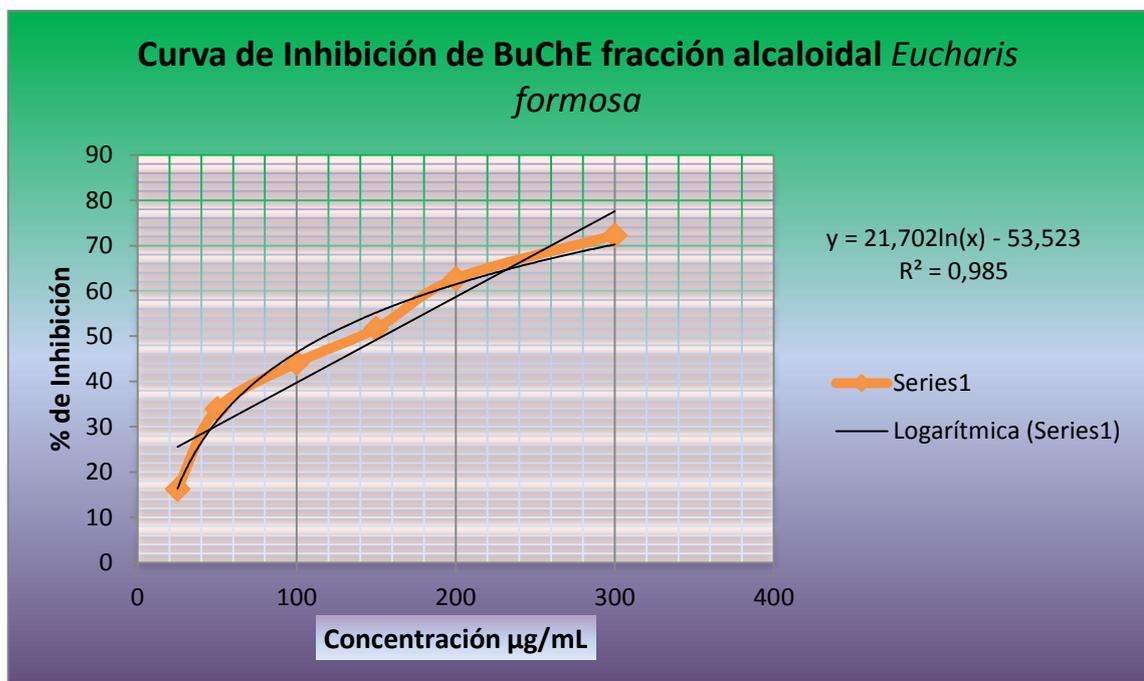


Gráfico 5: Segundo ensayo de Inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*.

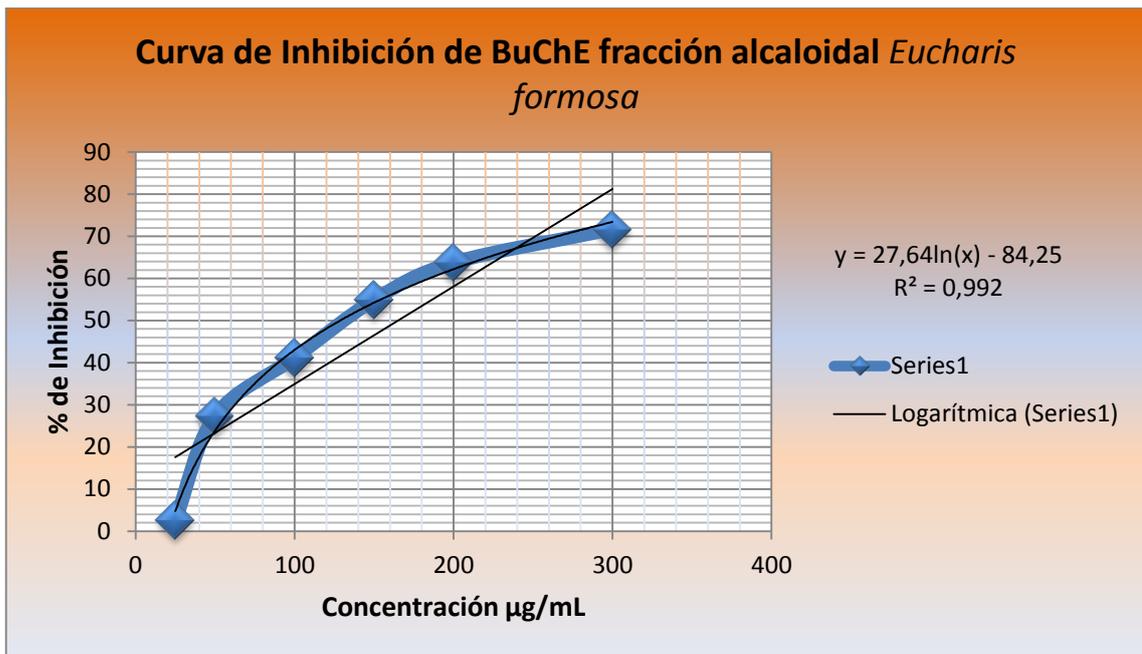
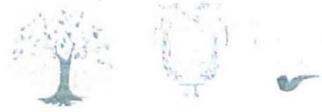


Gráfico 6: Tercer ensayo de Inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *Eucharis formosa*.

Anexo H: Orden de movilización de la especie *Eucharis formosa*



AMBIENTE



GUIA DE MOVILIZACIÓN

Nro. MAE-DPAS-FAU-2018-041

Fecha de emisión: Nueva Loja, 06 de Noviembre del 2018 a las 10:10.

Fecha de movilización: 07 de Noviembre del 2018 Válido hasta: 08 de Noviembre del 2018 hasta 24:00 pm. (24 horas)

La Dirección Provincial de Sucumbíos, Autoriza a: Karen Lisseth Acosta León de Nacionalidad Ecuatoriana con número de cedula N° 100308901-6, para la movilización de especímenes de flora: desde la provincia de Sucumbíos hasta El Distrito Metropolitano de Quito, a las instalaciones de la Universidad Tecnológica Indoamerica y hacia la ESPOCH con sede en Riobamba, donde se dará continuidad al proyecto de investigación, las muestras se movilizarán vía terrestre en transporte Publico Cooperativa Baños, de acuerdo a la siguiente lista:

Código	Orden	Nombre Científico	Familia	Descripción del espécimen o parte constitutiva	Provincia	Estado
S/N	S/N	Eucharis formosa	Amaryllidaceae	Completa	Sucumbíos	Fresco

Observaciones:

Los especímenes o elementos constitutivos se movilizarán en: Transporte Terrestre.

La presente guía se emite cumpliendo las disposiciones dadas en el Permiso de Investigación Nro. MAE-DNB-CM-2015-0054

Los especímenes van en calidad de:

Investigación (54)

Investigación Nro. MAE-DNB-CM-2015-0054.

Nombre de la Investigación: "LA BIODIVERSIDAD DE AMARYLLIDACEAE COMO FUENTE DE RECURSOS NATURALES PARA SU EXPLOTACIÓN SOSTENIBLE"

Firma: 
Dirección Provincial de Sucumbíos
Ministerio del Ambiente

DIRECTOR PROVINCIAL

Sello Dirección Provincial.

Firma: 

BENEFICIARIO
CI: 240063302-4

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS PARA EL APRENDIZAJE
Y LA INVESTIGACIÓN
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 28/ Noviembre/ 2019

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: RAÚL VICENTE CHAMORRO DOMÍNGUEZ
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: CIENCIAS
Carrera: BIOQUÍMICA Y FARMACIA
Título a optar: BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO
f. Analista de bibliotecas responsable: