



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Hippeastrum sp.*”

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: BRYGITH VERÓNICA LLIGUIN MEJÍA

DIRECTOR: Lic. KAREN LISSETH ACOSTA LEON, M.Sc.

**Riobamba - Ecuador
2020**

© 2020, Brygith Verónica Lliguin Mejía

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.

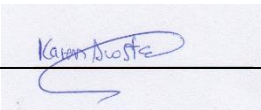

Yo, Brygith Verónica Lliguin Mejía, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora 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, 2020

Brygith Verónica Lliguin Mejía
0604958330-

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

El tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Trabajo Experimental “**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DE EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Hippeastrum sp.***”, realizado por la señorita Brygith Verónica LLiguin Mejía ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Cando Brito Verónica Mercedes PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2020/01/29
Lcda. Acosta León Karen Lisseth DIRECTOR/A DEL TRABAJO DE TITULACION		2020/01/29
BQF. Vinuesa Tapia Diego Renato MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2020/01/29

DEDICATORIA

A Dios por bendecirme todos los días, brindarme momentos llenos de alegría, fortalecerme en momentos de dolor y angustia, por regalarme tanto amor y salud. A mi abuelita Mercedes Miranda, por ser mi soporte y ejemplo de lucha.

A mis padres Xavier y América, quienes me han apoyado durante mi vida estudiantil, brindándome su apoyo y amor incondicional.

Brygith Ll.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, a la Virgen Dolorosa, por brindarme salud, guiarme en momentos difíciles de mi vida, por ayudarme a resolver cada uno de los problemas que se han presentado en el transcurso de mi carrera y por cumplir uno de mis grandes anhelos y sueños.

A mis hermosos padres Xavier y América quienes desde chiquita me han sabido ayudar, guiar para ser no solo una buena profesional, sino una mujer de bien y excelente persona. Les agradezco por darme siempre amor, siendo mi ejemplo a seguir, en donde la perseverancia y el esfuerzo es factor fundamental para lograr las metas anheladas.

Gracias hermanito Cristhoffer por saber comprenderme, ayudarme, apoyarme en todos los momentos de mi vida más aun cuando he tenido resbalones.

A mi abuelita hermosa Mercedes, quien ha sido como mi madre quien me apoyo desde chiquita.

Agradezco infinitamente a la Lic. Karen Acosta M.Sc. quien a más de ser mi docente y guía es mi amiga, quien ha sabido brindarme enseñanzas durante la vida estudiantil, gracias por ayudarnos a encaminarnos en el trabajo de titulación realizado, colaborándonos con su experiencia.

Gracias al BQF. Diego Vinueza M.Sc. por formar parte de este trabajo de titulación, quien me ha brindado sus conocimientos los cuales han sido de mucha ayuda, y a su vez su amistad y apoyo.

A mis amigos quienes han compartido conmigo momentos buenos y malos, por estar siempre apoyándome con una palabra de aliento, porque a pesar de la distancia o el no vernos, basta una llamada, un mensaje para alegrarme el día y ver las cosas de mejor manera.

Brygith Ll.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY	xiv
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	4
1.1. Enfermedad de Alzheimer	4
1.1.1. Descripción	4
1.1.2. Etiología y factores de riesgo	5
1.1.3. Síntomas	5
1.1.3.1. Síntomas de la etapa inicial	5
1.1.3.2. Síntomas de la etapa media	6
1.1.3.3. Síntomas de la etapa final	6
1.1.4. Diagnóstico	6
1.1.5. Tratamiento	7
1.1.5.1. Terapia no farmacológica	7
1.1.5.2. Terapia farmacológica	7
1.2. Familia Amaryllidaceae	8
1.2.1. Amaryllidaceae en Ecuador	9
1.2.2. Alcaloides de Amaryllidaceae	10
1.3. Género <i>Hippeastrum</i>	11
1.4. Galantamina	11

1.4.1. <i>Mecanismo de acción</i>	12
1.5. Acetilcolinesterasa (AChE)	13
1.6. Butirilcolinesterasa (BuChE)	13
1.7. Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas	14
1.7.1. <i>Cromatografía de gases (CG)</i>	14
1.7.2. <i>Espectrometría de Masas (EM)</i>	15
1.8. Método de Ellman	15

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	16
2.1. Población de estudio	16
2.2. Tamaño de la muestra	16
2.3. Selección de la muestra	16
2.4. Lugar de Investigación	16
2.5. Equipos, Materiales y Reactivos	16
2.5.1. <i>Equipos</i>	16
2.5.2. <i>Materiales</i>	17
2.5.3. <i>Reactivos</i>	18
2.6. Recolección del material vegetal	18
2.7. Identificación botánica	19
2.8. Preparación del material vegetal	19
2.9. Extracción de alcaloides	19
2.10. Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)	20
2.11. Preparación de muestras para los ensayos de inhibición enzimática de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa	20
2.11.1. <i>Preparación de soluciones</i>	20
2.11.2. <i>Preparación de enzimas</i>	21
2.11.3. <i>Preparación de sustratos</i>	21

2.11.4. Preparación de Galantamina (compuesto de referencia)	21
2.11.5. Muestra de alcaloides de <i>Hippeastrum sp.</i>	22
2.12. Ensayos de inhibición enzimática de AChE y BuChE	22
2.13. Análisis de datos	23
2.13.1. Curva de inhibición para la determinación del IC_{50}	23

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	24
3.1. Obtención del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i>	24
3.2. Identificación de alcaloides mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).....	25
3.3. Determinación de la actividad inhibitoria de AChE y BuChE	27
3.3.1. Actividad inhibitoria con solución madre 1	27
3.3.1.1. Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa con solución madre 1	27
3.3.1.2. Actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con solución madre 1	29
3.3.2. Actividad inhibitoria con solución madre 2	31
3.3.2.1. Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa con solución madre 2.	31
3.3.2.2. Actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con solución madre 2.	32
3.3.3. Actividad inhibitoria con solución madre 3	33
3.3.3.1. Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa con solución madre 3	33
3.3.3.2. Actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con solución madre 3	35
3.3.4. Análisis comparativo de resultados de IC_{50} usando diferentes soluciones madre	36
3.3.4.1. Acetilcolinesterasa.	36
3.3.4.2. Butirilcolinesterasa.	37
CONCLUSIONES.....	39
RECOMENDACIONES.....	40

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Concentraciones de Galantamina (compuesto de referencia) utilizadas en los ensayos de inhibición de AChE y BuChE respectivamente.....	21
Tabla 2-2: Concentraciones del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i> utilizadas en los ensayos de inhibición de AChE y BuChE.....	22
Tabla 1-3: Resultado del rendimiento del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i>	24
Tabla 2-3: Resultado de los alcaloides identificados por CG-EM del bulbo de <i>Hippeastrum sp.</i>	25
Tabla 3-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i>	28
Tabla 4-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i>	28
Tabla 5-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i> , sobre AChE y su correspondiente R ²	29
Tabla 6-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i>	29
Tabla 7-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i>	30
Tabla 8-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i> , sobre BuChE y su correspondiente R ²	30
Tabla 9-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i> , con solución madre 2.....	31
Tabla 10-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i> , sobre AChE y su correspondiente R ²	32
Tabla 11-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i> , con solución madre 2.....	32
Tabla 12-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i> , sobre BuChE y su correspondiente R ²	33
Tabla 13-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i> , con solución madre 3.....	34
Tabla 14-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i> , sobre AChE y su correspondiente R ²	34
Tabla 15-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i> , con solución madre 3.....	35
Tabla 16-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de <i>Hippeastrum sp.</i> , sobre BuChE y su correspondiente R ²	35
Tabla 17-3: Resultados de IC ₅₀ sobre la enzima acetilcolinesterasa	36
Tabla 18-3: Resultados de IC ₅₀ sobre la enzima butirilcolinesterasa	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Inhibidores de colinesterasas usados para tratar la Enfermedad de Alzheimer. ...8
Figura 2-1:	Geodistribución de las plantas de la familia Amaryllidaceae9
Figura 3-1:	Tipos de estructuras de los alcaloides de Amaryllidaceae10
Figura 4-1:	Estructura de la molécula natural galantamina12
Figura 5-1:	Esquema de la reacción enzimática en que se basa el método colorimétrico para determinar la actividad de inhibición de acetilcolinesterasa.15
Figura 1-3:	Estructura de los alcaloides identificados en el extracto de alcaloides del bulbo de <i>Hippeastrum sp.</i>26

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Representación gráfica de los alcaloides de <i>Hippeastrum sp.</i> ($\mu\text{g gal}/100 \text{ mg PS}$)	25
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: RECOLECCIÓN DE *Hippeastrum sp.*

ANEXO B: PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

ANEXO C: EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES

ANEXO D: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

ANEXO E: MICROPLACA LUEGO DE LA LECTURA

ANEXO F: CURVA DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA SOBRE ACETILCOLINESTERASA (ACHE) DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DE *Hippeastrum sp.*, TRES REPETICIONES.

ANEXO G: CURVA DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA SOBRE BUTIRILCOLINESTERASA (BUCHE) DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DE *Hippeastrum sp.*, TRES REPETICIONES.

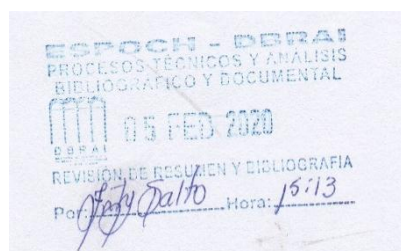
ANEXO H: CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS

ANEXO I: GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE *Hippeastrum sp.*

RESUMEN

El objetivo fue determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, especie vegetal que pertenece a la familia Amaryllidaceae. Los alcaloides se extrajeron mediante el proceso de maceración con solventes orgánicos y cambios de pH con un rendimiento de extracción de 0.95 %. Para identificar los alcaloides que se encuentran en el bulbo de *Hippeastrum sp.* se efectuó Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. Para la determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa se utilizó el método colorimétrico de Ellman et al. (1961), con modificaciones de Ortiz et al (2016), siendo galantamina el compuesto de referencia. Se evaluaron las actividades inhibitorias variando la concentración del cosolvente. Se realizaron tres repeticiones consecutivas para obtener la curva de inhibición enzimática con cuya ecuación de la recta se calculó la concentración inhibitoria máxima media (IC50). En la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (CG-EM) se identificaron 4 alcaloides, siendo el más representativo montanina con 22.7540 (ug gal/100 mg PS), seguido de tazetina con 14.8693 (ug gal/100 mg PS), y en menor cantidad crinina y licorina con 10.99440 y 10.2120 (ug gal/100 mg PS), respectivamente. El extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, mostró una actividad inhibitoria alta frente a acetilcolinesterasa con un valor de IC50 de 7.25 ± 0.11 ug/ml, en relación al compuesto de referencia galantamina con IC50 DE 0.37 ± 0.03 ug/ml. La actividad inhibitoria frente a butirilcolinesterasa fue medianamente alta con un IC50 de 105.06 ± 2.14 ug/ml, respecto a galantamina que presento IC50 de 16.03 ± 0.77 ug/ml. Se observa que existe mayor afinidad por la enzima acetilcolinesterasa. Se recomienda realizar más estudios sobre la especie *Hippeastrum sp.*

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <GALANTAMINA>, <EXTRACTO ALCALOIDAL>, <BULBO (*Hippeastrum sp.*)>, <AMARYLLIDACEAE>, <ACTIVIDAD INHIBITORIA>, <COLINESTERASA>, <ALZHEIMER (ENFERMEDAD)>



SUMMARY

The objective was to determine the inhibitory activity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from the alkaloidal extract of *Hippeastrum sp.*, a plant species that belongs to the Amaryllidaceae family. The alkaloids were extracted by the process of maceration with organic solvents and pH changes with an extraction yield of 0.95%. To identify the alkaloids present in the bulb of *Hippeastrum sp.* Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry was performed. For the determination of the inhibitory activity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, the colorimetric method of Ellman et al. (1961), modified by Ortiz et al. (2016) was used, the reference compound being galantamine. The inhibitory activities were evaluated by varying the concentration of the cosolvent. Three consecutive repetitions were performed to obtain the enzyme inhibition curve with which equation of the line, the mean maximum inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. In the gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) 4 alkaloids were identified, the most representative being montanin with 22.7540 (ug gal/100 mg PS), followed by tazetine with 14.8693 (ug gal/100 mg PS), and in smaller quantity crinina and licorina with 10.99440 and 10.2120 (ug gal/100mg PS), respectively. The alkaloidal extract of *Hippeastrum sp.*, showed a high inhibitory activity against acetylcholinesterase with an IC₅₀ value of 7.25 ± 0.11 ug/ml, in relation to the reference compound galantamine with IC₅₀ of 0.37 ± 0.03 ug/ml. The inhibitory activity against butyrylcholinesterase was moderately high with an IC₅₀ of 105.06 ± 2.14 ug/ml, compared to galantamine that presented IC₅₀ of 16.03 ± 0.77 ug/ml. It is observed that there is greater affinity for the acetylcholinesterase enzyme. Further studies on the species *Hippeastrum sp.* is recommended.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <GALANTAMINE>, <ALKALOIDAL EXTRACT>, <BULB (*HIPPEASTRUM SP.*) >, <AMARYLLIDACEAE>, <INHIBITORY ACTIVITY>, <CHOLINESTERASE>, <ALZHEIMER'S (DISEASE) >



INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer es una alteración neurodegenerativa y la principal causa de demencia, en la cual se ve afectada la función neuronal produciendo la pérdida sináptica y muerte neuronal, causando pérdidas en la capacidad funcional, incapacitando de varias tareas del diario vivir a la persona que lo padece (Zúñiga Santamaría et al., 2018: pp.2-4).

El Alzheimer afecta preferentemente a sujetos mayores de 65 años de edad, de acuerdo con el informe de la ADI (Alzheimer's Disease International) en el año 2015 existieron 46 millones de personas con demencia en todo el mundo. Esta cifra aumentaría para el año 2050 siendo así que llegaría a 131.5 millones (Zúñiga Santamaría et al., 2018: pp.2-4).

En los posteriores años se evidenciará un incremento de esta demencia en países en vías de desarrollo como por ejemplo en el Caribe y América Latina ya que en estos sitios los accesos a servicios médicos son escasos (Zúñiga Santamaría et al., 2018: pp.2-4).

En Ecuador según la Fundación TASE (Trascender con Amor Servicio y Excelencia), habría unas 420 mil personas con Alzheimer siendo la relación de esta enfermedad mayor en mujeres que en hombres, con un porcentaje de 60 y 40 %, respectivamente (TASE, 2017, p.1).

La esperanza media de vida de quienes padecen de Alzheimer está entre cinco y diez años. En la actualidad, gracias a las mejoras en los tratamientos y cuidados médicos muchos pacientes pueden llegar a vivir hasta 15 años o más. En Ecuador, esta esperanza de vida para las personas que padecen Alzheimer llega a los 77 años en 2015, siete años más que en 1990 (TASE, 2017, p.1).

El Alzheimer se caracteriza por un importante déficit de neurotransmisores cerebrales, sustancias químicas que transmiten los impulsos nerviosos, en particular la acetilcolina, sustancia altamente vinculada con la memoria. Como se sabe la acetilcolina es un neurotransmisor, sirve para transmitir señales de una neurona a otra, lo cual permite pensar, recordar, sentir, moverse. La acetilcolina es esencial para la memoria y el funcionamiento cerebral, en la enfermedad de Alzheimer disminuye su cantidad (Bredesen, 2018, p.5).

La enfermedad de Alzheimer no tiene un tratamiento curativo. Los medicamentos utilizados son sintomáticos y paliativos, tratan de enlentecer el deterioro y minimizar las consecuencias de la enfermedad. En la actualidad se utilizan 4 fármacos, siendo tres de estos inhibidores de acetilcolinesterasa (donezepilo, rivastigmina y galantamina) y un antagonista parcial del glutamato (memantina) (Alpízar y Morales, 2003: p.3).

Estos tratamientos farmacológicos tienden a presentar efectos secundarios como diarrea, náuseas, vómitos, cefaleas, calambres musculares o pérdida de peso. Además, su costo social y económico es alto y es superado tan solo por la cardiopatía isquémica y el cáncer, siendo así que las personas que padecen de esta enfermedad no sólo en nuestro país, sino en todo el mundo no pueden ser tratados adecuadamente, conllevando a la mala calidad de vida de la persona enferma y a su vez el sufrimiento que ocasiona a la familia (Association, 2018, p.2).

La tendencia de la investigación académica se basa en la realización de estudios que sean de gran beneficio y utilidad para la sociedad, más aún cuando el beneficio recae en la salud. Siendo de vital importancia el hallazgo de nuevas fuentes biológicas, que tengan propiedades farmacológicas.

Ecuador es un país muy diverso en relación a su vegetación, cuenta con un sin número de especies vegetales que en su mayoría no han sido estudiadas, como es el caso de *Hippeastrum sp.*, la cual pertenece a la familia Amaryllidaceae. Las Amaryllidaceae se encuentran distribuidas a través de regiones tropicales y subtropicales del globo y son prominentes en América del Sur.

Esta familia vegetal ha sido estudiada por los metabolitos que presentan potencial para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Sintetizan diversas estructuras de alcaloides, entre ellas la galantamina, la cual fue probada en la enfermedad de Alzheimer en 1989 (inhibidor de acetilcolinesterasa) un activo comercializado desde el 2002 como estrategia para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer (Cortes et al., 2015: p.280).

Galantamina es el segundo principio activo más usado en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, este alcaloide posee un costo relativamente alto debido a su obtención y está presente en el género *Hippeastrum* (Bergoñón, 1994, p.163). *Hippeastrum*, a más de la inhibición enzimática presenta propiedades antivirales, antitumorales, antiparasitarias, antiproliferativas.

Este trabajo está basado en determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Hippeastrum sp.*, ya que es un recurso promisorio para nuestro país.

Este trabajo contribuye al objetivo 1 del Plan Nacional del Desarrollo Toda una Vida “Garantizar una vida digna con iguales oportunidades para todas las personas”, y al objetivo 3 “Garantizar los derechos de la naturaleza para las actuales y futuras generaciones” ya que se enfoca a brindar una posible alternativa en el tratamiento de Alzheimer, lo que representaría a largo plazo el uso y conservación de la biodiversidad ecuatoriana (SENPLADES, 2017, pp. 53-64).

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Hippeastrum sp.*

Objetivos Específicos

- Obtener el extracto de alcaloides de los bulbos de *Hippeastrum sp.*
- Identificar los alcaloides del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.
- Evaluar la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *Hippeastrum sp.* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, mediante el método de Ellman et al. (1961) con modificaciones de Ortiz et al (2016), utilizando como compuesto de referencia galantamina.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Enfermedad de Alzheimer

1.1.1. Descripción

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia a nivel global y su prevalencia aumenta con el envejecimiento de la población, siendo así que requiere un alto nivel de recursos sanitarios y sociales por ello es indispensable su investigación (Arizaga et al., 2018: p.46).

En la actualidad, prevenir la enfermedad de Alzheimer es un objetivo importante por varias razones, una de ellas es que con la edad disminuya la probabilidad de padecer esta enfermedad, se procura apaciguar el progreso del deterioro cognitivo mediante medidas farmacológicas (Gómez y Gómez, 2017: p.303).

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo, se presenta con la pérdida de memoria, que empieza de manera engañosa y va aumentando progresivamente, afectando las capacidades funcionales, produciendo invalidez social, dependencia y dificultando así sus actividades funcionales sociolaborales cotidianas (Barquero y Payno, 2007: p.4930).

Es una enfermedad de completa patogenia, a veces hereditaria, desde el punto de vista anatómico se caracteriza por la pérdida de neuronas y sinapsis, presencia de placas seniles y degeneración neurofibrilar (Peyronnet, 2011, p.34).

Se diferencian dos formas principales de la enfermedad de Alzheimer: la familiar, se presenta a temprana edad poco común y determinada genéticamente, y la no familiar o esporádica, la cual afecta a más del 95 % de los pacientes de demencia, de escasa evolución (González y Mas, 2000: p.1).

El Alzheimer se origina cuando los valores de acetilcolina disminuyen, causando el deterioro de los circuitos colinérgicos del sistema cerebral. Se desconoce la razón por la cual se ve disminuido la producción de acetilcolina, siendo de esta manera complicado conocer quiénes pueden padecer esta enfermedad (Sánchez et al., 2016: p. 10).

1.1.2. Etiología y factores de riesgo

La enfermedad de Alzheimer hoy en día es una enfermedad de etiología desconocida, en la cual se ha diferenciado varias teorías, entre ellas está el factor genético sobre la cual actúan los factores medioambientales (Barquero y Payno, 2007: p.4930).

El factor de riesgo más importante en esta enfermedad es la edad, ya que la persona a medida que envejece aumenta el riesgo de padecerla, la cual se duplica cada 5 años por encima de los 65, en personas con 85 años la prevalencia es del 40 % (Barquero y Payno, 2007: p.4930).

El sexo es otro de los factores predisponentes en donde la mujer corre más riesgo de padecerla ya que podría influir la carencia de estrógenos en la mujer postmenopáusicas (Barquero y Payno, 2007: p.4930).

La enfermedad de Alzheimer es más frecuente en antecedentes como TEC, patología tiroidea, enfermedades cardiovasculares, antecedentes de hipertensión arterial mal controlada, diabetes mellitus, dislipidemia, síndrome metabólico, etc. (Pareja, 2017, p.21).

La baja escolaridad también influye en la aparición de la enfermedad, debido a que las personas con un alto nivel de escolaridad utilizan en mayor cantidad las neuronas lo cual favorece los procesos de neurogénesis y sinaptogénesis, contando así con una mayor dotación de neuronas (Pareja, 2017, p.21).

Se considera que la historia familiar es un factor importante para padecer Alzheimer, dado que el 75 % de los casos pueden ser de tipo familiar, por existir un autosoma dominante el cual afecta el 50 % de los sujetos que alcanzan edades avanzadas (González y Mas, 2000: p.5).

De todos los factores antes mencionados la edad no es modificable, pero otros sí, es por ello que se debe influir en aquellos modificables para pretender retrasar que la enfermedad se presente o evolucione, siendo de vital importancia mantener una dieta adecuada al igual que actividad física, mental y social (Navarro et al., 2015: p.4308).

1.1.3. Síntomas

1.1.3.1. Síntomas de la etapa inicial

- Reducción de la atención
- Cambios de humor o personalidad

- Depresión
- Olvidos
- Dificultades en el trabajo (Román, 2005, p.112).

1.1.3.2. Síntomas de la etapa media

- Desorientación de tiempo o lugar
- Perdida de la memoria
- Confusión
- Falta de sueño
- Problemas de expresión
- Intranquilidad (Navarro y Orozco, 2015: p.21).

1.1.3.3. Síntomas de la etapa final

- Dificultad para reconocer objetos, personas, etc.
- Incapacidad de llevar a cabo tareas o movimientos
- Agresión
- Incontinencia
- Dificultad para desempeñar tareas de la vida cotidiana
- Alteraciones de la marcha (Navarro y Orozco, 2015: p.21).

1.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico se fundamenta en la historia clínica del paciente la cual es mencionada por parte de los familiares, se realizan pruebas de memoria y funcionamiento o evaluación intelectual. El médico evalúa la dieta, nutrición, enfermedades como la presión arterial, diabetes, insuficiencia renal, etc. (Albert et al., 2014: p.5).

Otra de las maneras de ayudar con el diagnóstico del Alzheimer es realizando evaluaciones neurológicas en donde el médico evaluará tono, reflejos y fuerza muscular, lenguaje movimiento de ojos (Association, 2016, p.14).

Se ha logrado aproximar en la certeza del diagnóstico entre un 85 y 90 % gracias a exámenes como tomografía computarizada (TC), imagen por resonancia magnética (IRM), estos dos exámenes pueden develar si existen daños provocados por un trauma en la cabeza (Association, 2016, pp.15-16).

No existe un test premortem para realizar un diagnóstico concluyente de esta enfermedad, ya que el diagnóstico definitivo se logra haciendo pruebas histológicas sobre el tejido cerebral obtenidas en la autopsia (Molloy y Caldwell, 2002: p.91).

Actualmente existen biomarcadores que probablemente sean indicadores de esta enfermedad, se constituyen en dos categorías, biomarcadores de la acumulación beta-amiloide y biomarcadores del daño o degeneración (Salazar y Villar, 2007: p.28).

1.1.5. Tratamiento

Para la enfermedad de Alzheimer no existe ningún tratamiento curativo, existen fármacos y tratamientos no farmacológicos que han demostrado enlentecer la evolución de la enfermedad.

1.1.5.1. Terapia no farmacológica

La terapia no farmacológica tiene enfoques distintos a la medicación, como por ejemplo la musicoterapia, terapia utilizando fotografías familiares para fortalecer la memoria, arteterapia, taller de relajación, laborterapia, psicomotricidad, actividades culturales, etc. Es primordial que los familiares estén comprometidos directamente con el paciente, lo cual permite que se adapte al entorno, mejore su autoestima y autocontrol (López, 2015, p.62).

Esta terapia es utilizada con el objetivo de conservar y optimizar las funciones cognitivas del paciente, así también la capacidad de ejecutar las actividades de la vida cotidiana, mejorando la calidad de vida de estos pacientes (CEAFA, 2016, p.7).

1.1.5.2. Terapia farmacológica

En esta enfermedad muchas veces no se puede tratar todos los síntomas presentes, hay que saber priorizar el tratamiento de los más conflictivos, para así elegir un síntoma diana principal, debe empezarse con dosis bajas, evitando utilizarse varios fármacos a la vez, siendo preferible ajustar la dosis del fármaco ya prescrito que sustituirlo por otro (Alpízar y Morales, 2003: p.5).

El tratamiento farmacológico es utilizado para mejorar los síntomas cognitivos, psicológicos y de conducta, destinado a potenciar y modificar los procesos de neurotransmisión que están íntegros.

Los principales fármacos utilizados en la enfermedad de Alzheimer son:

- Inhibidores de colinesterasa: sirven para retrasar la inactivación de la acetilcolina, potenciando así la memoria y el aprendizaje, es el único tratamiento aprobado que resulta en beneficio clínico, existen tres inhibidores; Donepezil (aprobado para tratar todas las etapas de Alzheimer), Rivastigmina y Galantamina (aprobado para tratar Alzheimer leve o moderada) (Alpízar y Morales, 2003: p.5).
- Memantina regula la actividad del glutamato, promueve el mantenimiento de los mecanismos de aprendizaje y memoria, se utiliza en la fases moderada y severa, ocasionalmente se utiliza en combinación con un inhibidor de colinesterasa (Alpízar y Morales, 2003: p.5).

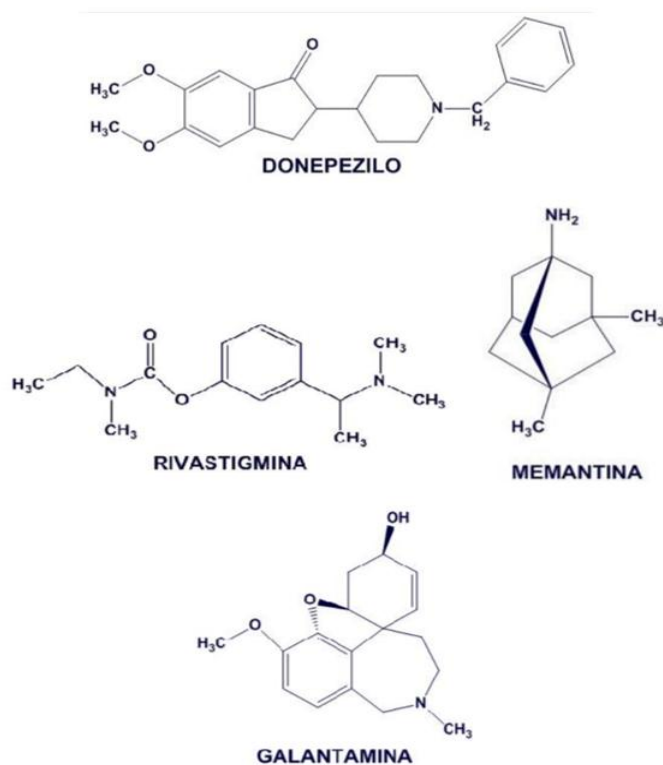


Figura 1-1: Inhibidores de colinesterasas usados para tratar la Enfermedad de Alzheimer.

Fuente: Alpízar y Morales, 2003: p.4

1.2. Familia Amaryllidaceae

Amaryllidaceae es una familia de plantas monocotiledóneas, conocidas por su atractivo hortícola y ornamental, se caracterizan por ser herbáceas, perennes, con flores muy atractivas y la mayoría

presentan bulbos. Existen aproximadamente 85 géneros y 1100 especies, que se distribuyen ampliamente en las regiones tropicales y templadas de todo el mundo, particularmente en África, América del Sur, en la región andina y el Mediterráneo (Fan Chiang et al., 2016, p.5642).

Los alcaloides que constituyen este tipo de plantas poseen interesantes actividades biológicas y frecuentemente usos etnobotánicos. Estos compuestos resultan del metabolismo de los aminoácidos tirosina y fenilalanina, ambos dan lugar al precursor base de todos los alcaloides de Amarilidáceas, la norbelladina (De Andrade , 2014, p.31).

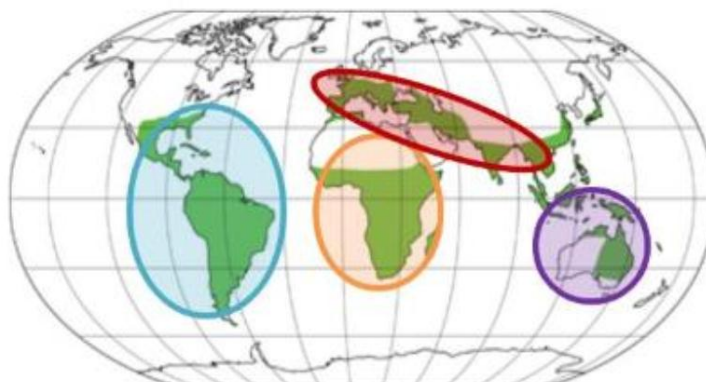


Figura 2-1: Geodistribución de las plantas de la familia Amaryllidaceae

Fuente: Acosta, 2013, p.1

Las especies de la familia Amaryllidaceae, pertenecen a la subfamilia Amaryllidoideae, sintetizan alcaloides que poseen actividades biológicas de vital importancia, así también un valor quimiotaxonómico (Marcet, 2015, p.1).

Estas especies son productoras de galantamina (G), compuesto inhibidor de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, las cuales prevalecen en el cerebro sano, pero aumentan en las personas que padecen la enfermedad de Alzheimer. Siendo así que son útiles para el tratamiento del déficit colinérgico (Marcet, 2015, p.1).

1.2.1. Amaryllidaceae en Ecuador

En nuestro país existe diversidad de la familia Amaryllidaceae, estas plantas se hallan distribuidas entre los 0 y 4000 metros de altitud, en diferentes hábitats como bosques andinos, valles secos interandinos y bosques del litoral seco y húmedo. La mayoría de las especies son endémicas y se encuentran amenazadas debido a su distribución restringida y hábitat donde se producen, por lo que su explotación debería ser controlada. (Minga et al., 2015, p.50).

En el Ecuador existen 36 especies de plantas de la familia Amaryllidaceae, entre las más conocidas se encuentran: *Phaedranassa dubia*, *P. cinérea*, *P. cuencana*, *P. schizantha*, *P. brevifolia*, *P. tunguraguae*, *P. glauciflora*, *P. viridiflora*, *Eucrosia aurantiaca*, *Eucharis grandiflora*, *Eucharis moorei*, *Eucharis formosa*, *Eucharis candida*, *Stenomesson aurantiacum*, *Hippeastrum puniceum* y *Crinum amabile* (Meerow et al., 2015: pp.4-6).

1.2.2. Alcaloides de Amaryllidaceae

Los alcaloides de Amaryllidaceae constituyen un grupo importante de bases naturales, siendo así que se ha logrado aislar 100 alcaloides de esta familia, las cuales presentan efectos fisiológicos, incluyendo actividades antitumoral, antiviral, citotóxica, analgésica, antiinflamatoria, inhibitoria de la acetilcolinesterasa, entre otras (Brandt Giordani, Balvedi Pagliosa, Henriques, S. Zuanazzi, & A. Dutilh, 2008). Debido a esta última actividad, algunos de estos alcaloides se han utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Es así como en el año de 2002, el compuesto galantamina fue aprobado por la FDA para el tratamiento de casos leves de esta enfermedad, actuando sobre el sistema nervioso central (Stephen, 1987, p.262).

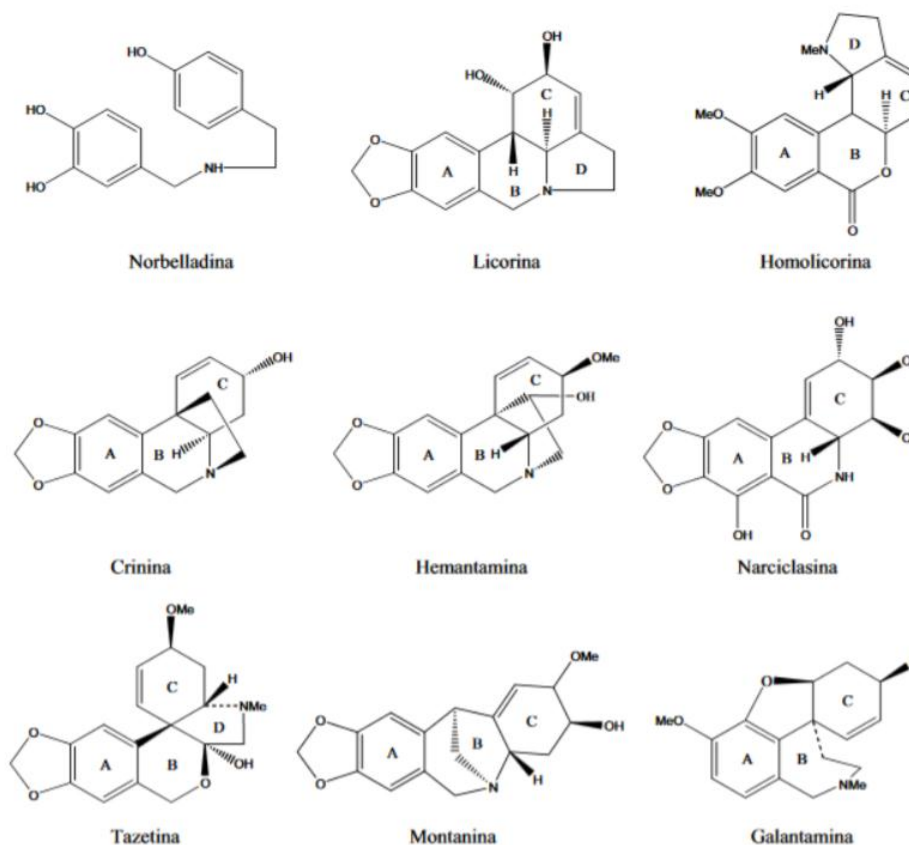


Figura 3-1: Tipos de estructuras de los alcaloides de Amaryllidaceae

Fuente: Osorio, 2008, p.9

Dicha familia presenta nueve tipos de estructuras en base al sistema heterocíclico (Figura 3): galantamina, montanina, tazetina, narciclisina, hemantamina, crinina, licorina, homolicorina y norbelladina (Osorio, 2008, p.9).

Las características químicas más importantes de los alcaloides de esta familia de plantas son, su estructura base es C6-C1-N-C2-C6. La parte C6-C1 proviene del aminoácido L-Phe, mientras que la fracción N-C2-C6 proviene de L-Tyr. Son bases ligeramente débiles, con pKa entre 6 y 9. Poseen un solo átomo de nitrógeno, que puede ser secundario, terciario e, incluso, cuaternario y por lo general el número de átomos de carbono oscila entre 16 y 20 de acuerdo a los sustituyentes del sistema cíclico (López et al., 2004: p.2).

Los alcaloides de Amaryllidaceae tienen un cierto grado de similitud, conteniendo generalmente un grupo arilo o-dioxigenado (por ejemplo, benzodioxol) con anillos heterocíclicos fusionados en él. Esta semejanza química permite que las estructuras complicadas sean obtenidas a través de una serie de semisíntesis de una forma más simple (Fan Chiang et al., 2016, p.5643).

1.3. Género *Hippeastrum*

Hippeastrum pertenece a la familia Amaryllidaceae son plantas perennes y bulbosas, se distribuyen en las regiones subtropicales de América, desde Argentina hasta México y el Caribe. Es un género que se expande por los Andes y en la actualidad existen entre 40 a 70 especies. Estas plantas han sido cultivadas debido a sus hermosas flores, son conocidas popularmente, pero a la vez de manera errónea como *Amaryllis*, un género africano de Amaryllidaceae (Gómez y Arellano, 2019: p.1).

Hippeastrum es originario de Chile, viene del vocablo griego Hippos, que significa caballo, fue descubierta por Eduard Frederick Poepping (médico alemán) en 1828 (Plantas, 2014, p.1).

Las especies de *Hippeastrum* son plantas ornamentales bulbosas muy apreciadas y comercializadas, se caracterizan por tener flores grandes de llamativos colores (rojo, rosa, salmón, naranja y blanco), por lo que tienen un lugar muy importante dentro de la floricultura comercial para la venta como flor cortada o flores de maceta. Además, por el alto contenido de alcaloides algunas especies de este género son usadas en la industria farmacéutica (Plantas, 2014, p.5).

1.4. Galantamina

La galantamina es un compuesto de origen natural utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Gracias a una nueva estrategia de cultivo y purificación podrá obtenerse con mayor

eficacia de las plantas la molécula que interesa. Galantamina es un alcaloide de tipo isoquinoleínico presente en la mayoría de especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae, es una amina terciaria con estructura fenantrénica (Vergara, 2017, p.20).

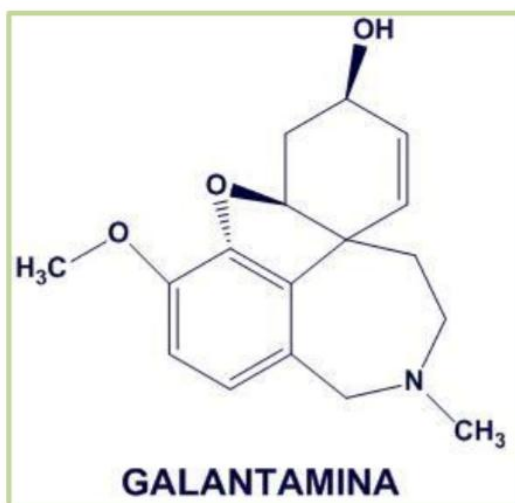


Figura 4-1: Estructura de la molécula natural galantamina

Fuente: Vergara, 2017, p.20

Los extractos que contienen galantamina se utilizaban inicialmente en el tratamiento del dolor nervioso y la poliomielitis. En 1955, fue detallada por Mashkovskii M.D., investigador ruso, como una molécula usada para la parálisis muscular, siendo Irwin R.L. y Smtih H.J. quienes años después dieron a conocer su potencial inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa y en 1960 se logró perfeccionar su síntesis química (Vergara, 2017, p.20).

Galantamina fue aprobada para la enfermedad de Alzheimer leve y severa, debido a su acción colinomimética no debe ser administrado con otros fármacos que tengan el mismo mecanismo de acción (Salazar et al., 2014, p.271). También se ha demostrado que la galantamina conserva la función cognitiva, mejora el rendimiento en las actividades del diario vivir y retarda la aparición de síntomas en la enfermedad de Alzheimer (Mendoza, 2008, p.227).

1.4.1. Mecanismo de acción

La galantamina es un inhibidor competitivo, selectivo y reversible de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y estimula la acción intrínseca de la acetilcolina (ACh), sobre los receptores nicotínicos, mediante la unión a un sitio alostérico del receptor. Cuando la galantamina y la acetilcolina, se ensamblan en sus lugares de unión, el receptor nicotínico presináptico se hace más sensible a la acetilcolina y se incrementa su respuesta (Alpízar y Morales, 2003: p.5). La estimulación presináptica de

los receptores de acetilcolina de tipo nicotínico (nACh) origina una retroalimentación positiva aumentando la liberación de acetilcolina en la terminal sináptica (Carretero, 2003, p.141).

En pacientes que sufren de la enfermedad de Alzheimer se puede lograr un acrecentamiento de la actividad del sistema colinérgico asociada a una mejora de la función cognitiva (Carretero, 2003, p.141).

1.5. Acetilcolinesterasa (AChE)

La acetilcolinesterasa fue descubierta en 1920, durante varios años esta enzima ha sido estudiada por su mecanismo de acción, efecto fisiológico, naturaleza de su centro activo, así también por su distribución y localización en diferentes tejidos (Rodríguez et al., 2017: p.8).

Las colinesterasas están presentes en plantas, invertebrados, vertebrados y organismos unicelulares, surge en fases del desarrollo embrionario antes de la sinaptogénesis, siendo así que estas enzimas poseen diversas funciones (Rodríguez et al., 2017: p.8).

La acetilcolinesterasa es una enzima presente en la terminación postsináptica, la cual tiene como papel fundamental la hidrólisis rápida de acetilcolina en las sinapsis colinérgicas, neurotransmisor en varias sinapsis, especialmente en las placas neuromotoras (Carretero, 2003, p.115).

La hidrólisis se da por ataque nucleófilo al grupo carbonilo, acilación de la enzima y liberación de colina, posteriormente se hidroliza la enzima acilada dando ácido acético, obteniéndose como resultado la regeneración de la enzima (Carretero, 2003, p.115).

Los inhibidores que ejercen acción en el centro activo de la enzima impiden la unión de una molécula de sustrato o su hidrólisis, bloqueando del sitio por su alta actividad reaccionando irreversiblemente con la serina próxima al centro catalítico (Carretero, 2003, p.115).

1.6. Butirilcolinesterasa (BuChE)

La butirilcolinesterasa se encuentra en mayor cantidad en zonas que se ven afectadas muy temprano en las demencias como por ejemplo la zona límbica, existen medicamentos que posee doble acción tanto para inhibir la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, son muy útiles para estos trastornos. Los medicamentos que contiene esta acción retrasan el progreso de la enfermedad con mayor efectividad (Alpizar y Morales, 2003: p.4).

La butirilcolinesterasa es una esterasa inespecífica, se encarga de hidrolizar a sustratos ésteres, también es distinguida como pseudocolinesterasa, colinesterasa inespecífica, colinesterasa sérica, o acilcolina acilhidrolasa (Estrada, 2014, p.31).

Esta enzima es sintetizada en el hígado y en el tejido adiposo, se halla dispersa en páncreas, piel, mucosa intestinal, corazón, sustancia blanca cerebral, musculo liso, plasma y adipocitos (Estrada, 2014, p.31).

Varias han sido las funciones atribuidas a esta enzima, pero a pesar de su diversa distribución no se ha podido determinar claramente su función biológica (Albendín, 2009, p.58).

Asimismo, se ha demostrado que la inhibición de la butirilcolinesterasa afecta la formación y la maduración de amiloide, provocando que las placas inertes no se hagan dañina (Alpízar y Morales, 2003: p.5).

1.7. Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas

La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), es una técnica analítica dedicada a la separación, identificación y cuantificación de componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas, esta técnica combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas (Barquero, 2006, p.20).

Ambas técnicas poseen una alta sensibilidad, con un costo relativamente bajo, esta técnica proporciona un gran poder de identificación, haciéndole insustituible en el momento de identificar un compuesto (Morel, 1998, p.64).

1.7.1. Cromatografía de gases (CG)

La Cromatografía de Gases (CG) proporciona información cualitativa y cuantitativa de los componentes presentes en las muestras, se utiliza cuando los componentes de la mezcla son volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de hasta 350-400°C, esta técnica establece la cantidad de componentes que se encuentran en una muestra, utilizando curvas de calibración de los patrones (Gutiérrez y Droguet, 2002: p.36).

En la actualidad se utiliza para análisis de mezclas complejas de hidrocarburos, productos vegetales, pesticidas, productos alimenticios, aceites esenciales e inclusive como parte de ciencias forenses (Barquero, 2006, p.21).

1.7.2. Espectrometría de Masas (EM)

La Espectrometría de Masas (EM) es una técnica analítica, la cual sirve para identificar estructuras orgánicas o para cuantificar compuestos conocidos (concentración o masa molecular), previamente convertidos en iones (Cocho, 2007, p.27). Poseen gran sensibilidad al detectar concentraciones, es un método que se ejecuta en cuestiones de décimas de segundo, siendo que se puede monitorear su información en tiempo real (Gutiérrez y Droguet, 2002: p.37).

1.8. Método de Ellman

El método de Ellman es un método espectrofotométrico, en el cual la acetilcolinesterasa (AChE) hidroliza la acetiltiocolina originando tiocolina y acetato, esto se logra mediante la reacción continua del tiol con el 5-tio-2-nitrobenzoato, para producir el anión amarillo del ácido 5,5'-ditiobis (2nitrobenzoico). La tasa de producción del color se mide a través del espectrofotómetro UV-VIS a una $\lambda = 412$ nm. Este método es el más empleado ya que es extremadamente sensible y aplicable a pequeñas cantidades de tejidos o a bajas concentraciones de enzima, además el espectrofotómetro UV-VIS presenta una mayor disponibilidad en muchos laboratorios, es de fácil manejo y permite un análisis rápido (Ellman et al., 1961: pp.88-89).

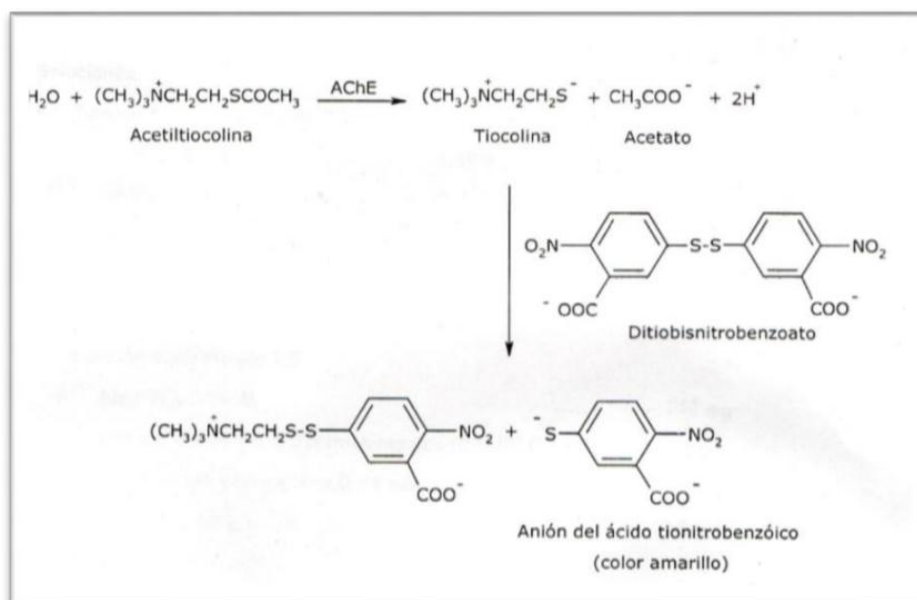


Figura 5-1: Esquema de la reacción enzimática en que se basa el método colorimétrico para determinar la actividad de inhibición de acetilcolinesterasa.

Fuente: Carrasco Ruiz, 2017,21

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Población de estudio

4 bulbos de *Hippeastrum sp.* fueron recolectados en la provincia de Chimborazo en la ciudad de Riobamba.

2.2. Tamaño de la muestra

Se recolectaron aproximadamente 185 g de bulbo fresco de *Hippeastrum sp.*, los cuales fueron sometidos a secado, teniendo como peso final 31 g aproximadamente.

2.3. Selección de la muestra

La selección de la muestra se realizó de acuerdo a los criterios de inclusión; es decir, bulbos que presentaban buen estado, vigorosidad, tamaño adecuado y frescos. Así también, mediante criterios de exclusión, aquellos bulbos que presentaban daños por condiciones externas, deterioro por agua o viento, y bulbos en proceso de descomposición fueron excluidos.

2.4. Lugar de Investigación

La investigación se ejecutó en el Laboratorio de Productos Naturales en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, donde se llevó a cabo la extracción de alcaloides y los ensayos de inhibición. Además, la Universidad de Barcelona colaboró realizando los análisis de Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas.

2.5. Equipos, Materiales y Reactivos

2.5.1. Equipos

- Molino Arthur H. Thomas C.O
- Estufa de secado.
- Balanza analítica.
- Sorbona
- Sonicador
- Rotavapor.
- Centrífuga
- pH-metro
- Refrigerador
- Congelador.
- Agitador vórtex
- Cronómetro
- Espectrofotómetro ELISA
- Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas

2.5.2. *Materiales*

- Pipetas 5 ml, 10 ml y 100 ml.
- Probeta de 100 ml.
- Balones aforados de 25 ml, 100 ml, 1000 ml.
- Vaso de precipitación de 50 ml, 100 ml, 250 ml, 600 ml, 1000 ml.
- Pesa muestra.
- Pera de succión.
- Frasco ámbar de 250 ml, 1000 ml.
- Varilla de agitación.
- Matraz de 1000 ml.
- Balón esmerilado de 250 ml.
- Pipeta pasteur de vidrio.
- Viales de vidrio.
- Tubos Eppendorf de 0.5 ml, 1.5 ml
- Tubos de tapa azul de 20 ml.
- Tubos tapa ploma de 14 ml.
- Puntas amarillas para micropipeta
- Puntas azules para micropipeta.
- Microplaca.

- Paleta para la pipeta multicanal.
- Placa de hielo reutilizable.
- Placa de polietileno.

2.5.3. *Reactivos*

- Metanol CH₄O
- Ácido sulfúrico H₂SO₄ (2 % V/V)
- Éter etílico (C₂H₅)₂
- Hidróxido de amonio NH₄OH (25 % V/V)
- Acetato de etilo C₄H₈O₂
- Sulfato de sodio anhidro Na₂SO₄
- Goma arábica.
- Cloruro de sodio NaCl
- Ácido clorhídrico HCl (0.5N)
- Fosfato di potásico K₂HPO₄
- Bifosfato de sodio NaH₂PO₄
- Hidróxido de sodio NaOH (0.5N)
- Acido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
- Acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus*
- Butirilcolinesterasa de suero equino
- Yoduro de acetilcolina
- Yoduro de butirilcolina
- Galantamina

2.6. Recolección del material vegetal

La especie vegetal *Hippeastrum sp.*, fue recolectada en el mes de septiembre de 2018 en estado de floración, en la provincia de Chimborazo en la Ciudad de Riobamba, a 2764 metros sobre el nivel del mar.

Se recogieron 185 g aproximadamente de bulbos frescos, dentro del Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos No. MAE-DNB-CM-2015-0054, del Proyecto de Investigación Científica denominado: “LA BIODIVERSIDAD DE AMARYLLIDACEAE COMO FUENTE DE RECURSOS NATURALES PARA SU EXPLOTACIÓN SOSTENIBLE”. (Anexo H)

Se tramitó el permiso de movilización en la Dirección Provincial del Ambiente de Chimborazo Guía de Movilización de Especímenes de Flora y Fauna Silvestre Nro. 020-2018. (Anexo I)

2.7. Identificación botánica

La identificación botánica fue realizada por la Dra. Nora Oleas, botánica responsable del Herbario de la Universidad Tecnológica Indoamérica Quito-Ecuador y del Dr. Alan Meerow (USA).

2.8. Preparación del material vegetal

Para preparar el material vegetal, se procedió a seleccionar los bulbos de la especie vegetal *Hippeastrum sp.*, escogiendo aquellos que presentaban buenas condiciones macroscópicamente, sin ningún tipo de lesión. Se eliminaron las impurezas con agua destilada y alcohol desinfectante, se realizaron cortes de 2 cm a los bulbos para facilitar de este modo el sacado en estufa con extracción de aire a 60°C durante 72 horas. Posteriormente, se efectuó la molienda en el molino Arthur H. Thomas C.O.

2.9. Extracción de alcaloides

Luego de haber realizado la molienda se pesaron 20 gramos, los cuales se maceraron con 800 ml de metanol por 72 horas en un frasco color ámbar, complementando con baños de ultrasonido durante 1 a 2 horas por día. Seguidamente, se filtró y el extracto bruto se colocó en un balón esmerilado para evaporar el solvente en el rotavapor con presión reducida y temperatura de 50°C, consiguiendo así el extracto crudo seco (Acosta et al, 2014, p.8).

El extracto crudo se acidificó con ácido sulfúrico al 2 % junto con éter etílico con el objetivo de desengrasar el extracto, para posteriormente obtener una fase acuosa ácida en la cual se encontraban los alcaloides y una fase orgánica con metabolitos que no eran de interés como: ceras, mucílagos y clorofilas (Acosta et al, 2014, p.8).

La fase acuosa ácida se basificó con hidróxido de amonio al 25 % hasta llegar a un pH de 10, consiguiendo que los alcaloides se retuviesen en la fase orgánica en su forma desionizada, se lavó con acetato de etilo, obteniendo dos fases: una acuosa alcalina que se desecha y otra fase orgánica

donde quedaron retenidos los alcaloides. Posteriormente se añadió sulfato de sodio anhidro y goma arábica para lograr absorber el agua de la muestra. Este extracto se filtró y se evaporó a presión reducida a 50°C, obteniendo el extracto puro de alcaloides (Acosta et al, 2014,p.8).

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

Este análisis se realizó en la Universidad de Barcelona (España).

Para la realización de este análisis se utilizó el extracto puro de alcaloides, el equipo empleado fue el Cromatógrafo de Gases Agilent, modelo 6890, acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico, modelo 5975, el cual trabaja a 70 Ev a 230°C en la fuente iónica.

La columna del cromatógrafo es SAPIENS-XS-MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), teniendo como fase estacionaria la fenilmetilsilicona al 5 %.

La fluctuación de temperatura se dará de la siguiente manera:

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

El inyector trabajó a 280°C con un flujo de helio de 0,8 ml/min, y se utilizó el método *splitless*. Codeína se usó como compuesto de referencia. Para el análisis de los datos se utilizó un software llamado AMDIS 2.71 (NIST), verificando la pureza de las señales y así poder realizar el cálculo de los índices de retención (Acosta, 2013, p.7).

2.11. Preparación de muestras para los ensayos de inhibición enzimática de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

2.11.1. Preparación de soluciones

PBS (buffer fosfato salino): para su preparación se ocupó bifosfato de sodio (NaH₂PO₄) 2,3mM, fosfato dipotásico (K₂HPO₄) 8mM, cloruro de sodio (NaCl) 0,15 M y se disolvió con agua bidestilada, ajustando a un pH de 7,5 con NaOH (0,5 N).

Solución salina: para preparar se utilizó fosfato de di sodio (Na_2HPO_4) 0,04 M, ajustando a un pH de 7,5 con ácido clorhídrico (HCl) 0,5 N.

DTNB (ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzoico)): se elaboró a una concentración de 2 mg/ml, almacenándose en tubos Eppendorf a -20°C .

2.11.2. Preparación de enzimas

Acetilcolinesterasa (AChE): se empleó una concentración de 0.195 U/ml.

Butirilcolinesterasa (BuChE): se empleó una concentración de 6.25 U/ml.

2.11.3. Preparación de sustratos

Yoduro de acetilcolina (ATC): el sustrato de AChE se elaboró a una concentración de 1.7 mg/200 μL .

Yoduro de butirilcolina (BTC): el sustrato de BuChE se elaboró a una concentración de 1.9 mg/200 μL .

Los sustratos se almacenaron en tubos Eppendorf a -20°C .

2.11.4. Preparación de Galantamina (compuesto de referencia)

Tabla 1-2: Concentraciones de Galantamina (compuesto de referencia) utilizadas en los ensayos de inhibición de AChE y BuChE respectivamente.

Conc. de Galantamina para Acetilcolinesterasa		Conc. de Galantamina para Butirilcolinesterasa	
(mg/ml)	Mol	(mg/ml)	Mol
12.5	1.25×10^{-5}	100	1×10^{-4}
10	1×10^{-5}	30	0.3×10^{-4}
7.5	0.75×10^{-5}	10	1×10^{-5}
5	0.5×10^{-5}	5	0.5×10^{-5}
2.5	0.25×10^{-5}	1	1×10^{-6}
0.5	0.5×10^{-6}	0.5	0.5×10^{-6}
0.1	1×10^{-7}		

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

2.11.5. Muestra de alcaloides de *Hippeastrum sp.*

Se ejecutaron ensayos de inhibición enzimática disolviendo el extracto alcaloidal en diferentes cosolventes (metanol y dimetilsulfóxido) variando las concentraciones, con el propósito de determinar en qué caso existe mejores valores de IC₅₀. Se prepararon las soluciones madres que se observan a continuación: presentando en todos los casos una concentración de 10 mg/mL

Solución Madre 1: extracto *Hippeastrum sp.* + cosolvente 1 + PBS

Solución Madre 2: extracto *Hippeastrum sp.* + cosolvente 1 + cosolvente 2 + PBS

Solución Madre 3: extracto *Hippeastrum sp.* + cosolvente 1 + cosolvente 2 + PBS

A partir de cada una de las soluciones madre se prepararon las diluciones que se puede observar a continuación:

Tabla 2-2: Concentraciones del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.* utilizadas en los ensayos de inhibición de AChE y BuChE.

N° dilución	Conc. (µg/ml) del extracto para AChE	Conc. (µg/ml) del extracto para BuChE
1	75	175
2	50	150
3	25	125
4	10	100
5	5	75
6	2.5	50
7	1	25

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

2.12. Ensayos de inhibición enzimática de AChE y BuChE

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 K₂HPO₄, 2.3 mM NaH₂PO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.6) y 50 µL de la muestra disuelta en el mismo

buffer. Se incubó la placa a 24 °C durante 30 min y se agregó 100 µL de solución sustrato (acetiltiocolina o butiriltiocolina, 0.1 M Na₂HPO₄, 0.5 M DTNB, and 0.6 mM ATCI in 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 (Ellman et al, 1961, p.88).

2.13. Análisis de datos

El análisis se ejecutó en Microsoft Excel luego de realizar las tres repeticiones consecutivas utilizando las absorbancias para así determinar el porcentaje de inhibición enzimática para cada muestra. La fórmula que se aplicó fue la siguiente:

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

En donde:

M: lectura de la muestra

C: lectura del control

BM: lectura del blanco muestra

BC: lectura del blanco control

2.13.1. Curva de inhibición para la determinación del IC₅₀

Se representó una gráfica de manera que en el eje X se colocó la concentración del extracto alcaloidal y en el eje Y los porcentajes de inhibición, con el fin de obtener una línea de tendencia logarítmica y su respectiva ecuación de la recta.

Con los datos de la gráfica se calculó la concentración a la cual se inhibe el 50 % de la actividad enzimática (IC₅₀). Los resultados obtenidos fueron la media de tres repeticiones realizadas.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados de los análisis del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, realizados mediante la metodología descrita en el capítulo anterior.

3.1. Obtención del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*

Se pesaron 20 g de muestra triturada, posteriormente se procedió a la extracción con metanol obteniendo los alcaloides de *Hippeastrum sp.*, con un rendimiento de 0.95 %, valor que se evidencia en la tabla 1-3:

Tabla 1-3: Resultado del rendimiento del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*

Extracto	Muestra Vegetal	Peso de muestra seca (g)	Volumen de metanol (ml)	Extracto de alcaloides (mg)	% de Rendimiento
Metanólico	Bulbo de <i>Hippeastrum sp.</i>	20	800	190.4	0.95 %

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

El porcentaje de rendimiento del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, fue de 0.95 %, mayor en relación a diferentes géneros de la familia Amaryllidaceae en donde *Eucrosia mirabilis* tiene un porcentaje de rendimiento de 0.25 %, *Crinum x amabile* con 0.69 %, *Phaedranassa glauciflora* 0.3 % y *Phaedranassa cinerea* con 0.11 % (Baldeón, 2018, p.23), (Carrasco, 2017, p.33), (Carrillo, 2018, p.33).

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

Mediante el análisis de CG-EM del extracto purificado de alcaloides de *Hippeastrum sp.*, se identificaron 4 alcaloides, siendo el alcaloide más representativo montanina ya que presenta una concentración de 22.7540 $\mu\text{g gal}/100 \text{ mg PS}$, tazetina es el segundo alcaloide en mayor abundancia con 14.8693 $\mu\text{g gal}/100 \text{ mg PS}$, seguido crinina y licorina con abundancias de 10.9440 y 10.2120 $\mu\text{g gal}/100 \text{ mg PS}$, respectivamente.

Tabla 2-3: Resultado de los alcaloides identificados por CG-EM del bulbo de *Hippeastrum sp.*

Alcaloide	Rt	RI	$\mu\text{g gal}/100 \text{ mg PS}$
Crinina	24.0866	2507.7	10.9440
Montanina	26.3242	2656.3	22.7540
Tazetina	26.6104	2675.9	14.8693
Licorina	28.1371	2783.0	10.2120

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

Realizado por: Laura Torras / Jaume Bastidas

Fuente: Universidad de Barcelona (España)

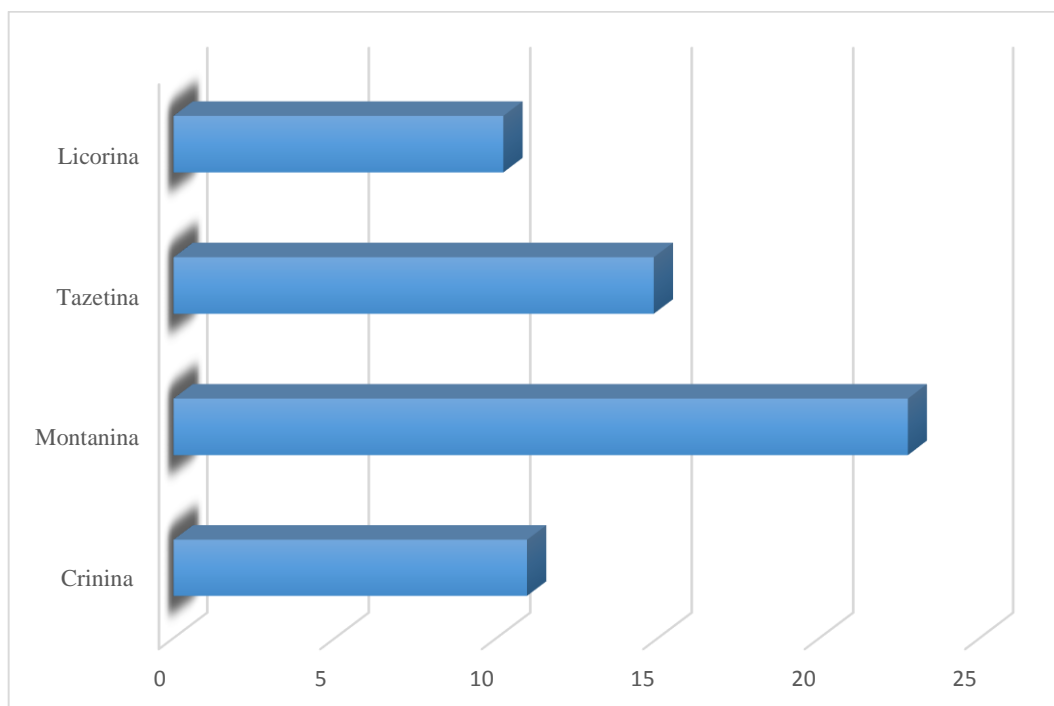


Gráfico 1-3: Representación gráfica de los alcaloides de *Hippeastrum sp.* ($\mu\text{g gal}/100 \text{ mg PS}$)

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

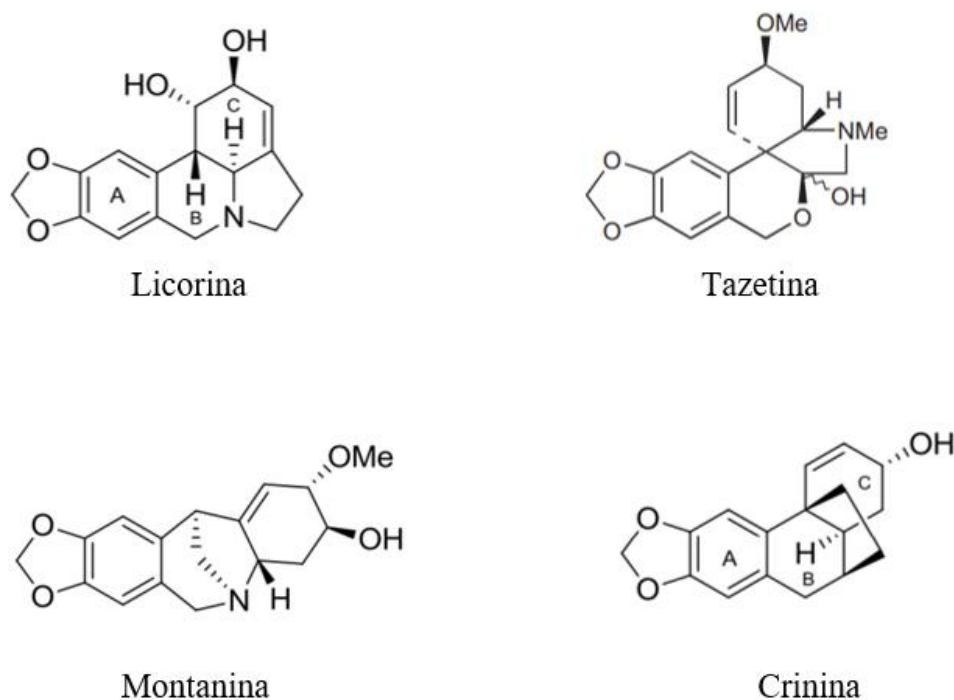


Figura 1-3: Estructura de los alcaloides identificados en el extracto de alcaloides del bulbo de *Hippeastrum sp.*

Fuente: Stephen, 1987, p.2

Montanina ha sido uno de los compuestos más estudiados en los últimos años, se conoce que posee actividad antibacteriana, frente a cepas de *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*. Este alcaloide ha sido sometido a varios estudios psicofarmacológicos en roedores en donde se ha evidenciado que poseen actividad antidepresiva, anticonvulsiva, ansiolítica y citotóxica (De Andrade , 2014, p.37).

Montanina ha mostrado una actividad inhibitoria significativa frente la enzima AChE, utilizando el método de Ellman. En ensayos bioquímicos este alcaloide es capaz de activar cascadas de fosforilaciones y mediadores intracelulares responsables de la memoria (Pigni , 2013, pp.20-24).

Al ser tazetina el segundo alcaloide presente en *Hippeastrum sp.*, cabe mencionar que posee actividad citotóxica moderada, es levemente activa contra ciertas líneas celulares tumorales, presenta actividad hipotensiva, antipalúdica débil y antiviral, así también presenta amplia actividad inhibitoria frente a acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa (Pigni , 2013, p.19).

Licorina es un importante inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, así mismo presenta actividad antitumoral, posee capacidad para inhibir las células del melanoma murino BL6, carcinoma pulmonar de Lewis, ascitis murina, células de leucemia humanas HL-60 y células Hela, es un potente inhibidor de la biosíntesis del ácido ascórbico, actividad antiviral. Este alcaloide es el

responsable parcial de la inhibición del crecimiento celular y del efecto citotóxico. La actividad antiviral está relacionada con su capacidad de acción frente al ADN y ARN (De Andrade , 2014, p.35).

Crinina posee acción antiproliferativa frente a variadas líneas de células tumorales, así también posee actividad antibacteriana frente a *Entamoeba histolytica* y actividad entre moderada y débil frente a cepas de *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *Plasmodium falciparum* (De Andrade , 2014, p.35).

Durante varios años se han estudiado diferentes especies del género *Hippeastrum*, en donde se han encontrado alcaloides similares, por ejemplo, el alcaloide licorina se presentó en las siguientes especies; *H. puniseum*, *H. auliculum* *H. reginae*, *H. bifidum*, *H. brachyandrum*, *H. equestre*, *H. glaucescens*, *H. johnsonii*, *H. rutilum*, *H. vittatum*, estas cinco últimas especies a más de presentar el alcaloide licorina también presenta el alcaloide tazetina (Carlesso, 2017, pp. 18-19), (Lacerda, 2017, p.26), (Sebben, 2005, p.20).

3.3. Determinación de la actividad inhibitoria de AChE y BuChE

Para el análisis de actividad inhibitoria de *Hippeastrum sp.*, sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, se realizó en base a la metodología de Ellman et al. (1961), modificado por Ortiz et al (2016), empleando deferentes soluciones madres, detalladas en el apartado de metodología.

3.3.1. Actividad inhibitoria con solución madre 1

Se utiliza el extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, junto con el cosolvente 1 y PBS.

3.3.1.1. Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa con solución madre 1

Para realizar los análisis de los extractos de Amaryllidaceae, primeramente, se utilizaron las concentraciones de 100, 50, 10 y 1 µg/ml, para tener una base sobre la tendencia de la recta y el valor de IC₅₀. Luego de tres repeticiones consecutivas, se observaron los resultados presentes en la Tabla 3-3, en los que se evidencia que el IC₅₀, podría encontrarse entre las concentraciones de 1 y 10µg/ml.

Tabla 3-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de inhibición de AChE
100	87.52 ± 0.59
50	83.03 ± 1.18
10	58.66 ± 3.96
1	15.10 ± 0.51

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

En base a los resultados de la tabla 3-3, se aumentó el número de diluciones a 75, 50, 25, 10, 5, 2.5 y 1 $\mu\text{g/ml}$, con el fin de obtener la curva de inhibición, la línea de tendencia logarítmica y el IC_{50} . Se obtuvieron los siguientes resultados del porcentaje de inhibición (Tabla 4-3).

Tabla 4-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de inhibición de AChE
75	82.26 ± 2.23
50	78.29 ± 3.10
25	68.45 ± 3.12
10	49.02 ± 2.21
5	32.15 ± 3.16
2.5	14.05 ± 3.59
1	-7.69 ± 2.80

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

Con estos resultados se dedujo que el IC_{50} del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.* frente a acetilcolinesterasa se podría encontrar entre 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$. Además, se observó que existían al menos dos valores superiores y dos inferiores al 50 % de inhibición, lo que indica idoneidad para que la representación de la curva y la línea de tendencia logarítmica.

Para calcular el valor de IC_{50} del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, sobre la enzima acetilcolinesterasa con metanol, se representó una gráfica de concentración frente a porcentajes de inhibición, obteniendo una ecuación de la recta, empleada para el cálculo de IC_{50} .

Tabla 5-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, sobre AChE y su correspondiente R²

Compuesto	IC ₅₀ (µg/ml)	R ²
Galantamina	0.48 ± 0.14	0.93
<i>Hippeastrum sp.</i>	12.86 ± 0.83	0.99

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

El IC₅₀ del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, fue de 12.86 ± 0.83 µg/ml, valor ligeramente superior al IC₅₀ del control galantamina que dio 0.48 ± 0.14 µg/ml, presentando el extracto de estudio una actividad inhibitoria alta frente a AChE.

3.3.1.2. Actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con solución madre 1

Para el análisis se utilizó inicialmente las concentraciones de 100, 50, 10 y 1 µg/ml, obteniendo luego de tres repeticiones consecutivas, teniendo de esta manera base sobre la tendencia de la recta y el valor de IC₅₀. Observando que el IC₅₀ podría encontrarse entre las concentraciones de 50 y 100 µg/ml.

Tabla 6-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*

Concentración del extracto alcaloidal (µg/ml)	Porcentaje de inhibición de BuChE
100	56.43 ± 1.58
50	43.95 ± 1.74
10	11.90 ± 2.12
1	-4.77 ± 3.68

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

Con los resultados observados en la tabla 6-3 se aumentó el número de diluciones a 175, 150, 125, 100, 75, 50 y 25 µg/ml, para así lograr la curva de inhibición, la línea de tendencia logarítmica, y su IC₅₀.

Tabla 7-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de inhibición de BuChE
175	62.85 ± 0.58
150	58.85 ± 0.41
125	53.26 ± 0.96
100	44.85 ± 1.32
75	33.76 ± 2.10
50	20.38 ± 2.15
25	-2.09 ± 2.51

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

Luego de obtener la media de las tres repeticiones realizadas se obtuvo los resultados donde se dedujo que el IC_{50} del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.* frente a la enzima butirilcolinesterasa podría estar entre 100 y 125 $\mu\text{g/ml}$, observándose dos valores superiores y dos inferiores al 50 % de inhibición enzimática, proporcionando la curva y la línea de tendencia logarítmica.

El cálculo del valor de IC_{50} para butirilcolinesterasa del extracto alcaloidal con el cosolvente A, se lo ejecuta con los datos conseguidos de la ecuación de la recta con un valor de R^2 de 0.99.

Tabla 8-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, sobre BuChE y su correspondiente R^2

Compuesto	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	R^2
Galantamina	16.70 ± 1.38	0.99
<i>Hippeastrum sp.</i>	117.28 ± 2.19	0.99

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

En la tabla 8-3, se proporciona los resultados de la actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa en donde el IC_{50} del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, fue de 117.28 ± 2.19 $\mu\text{g/ml}$, siendo superior al control de galantamina con 16.70 ± 1.38 $\mu\text{g/ml}$, presentando una actividad alta.

3.3.2. Actividad inhibitoria con solución madre 2

Cabe recordar que la solución madre 2 corresponde al extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.* junto con el cosolvente 1 + el cosolvente 2 a una concentración 1 y PBS, visualizándose que la muestra madre está mejor diluida ya que se observan menos partículas flotantes y mayor transparencia frente a la luz con relación a la solución madre 1 con el cosolvente 1 junto con PBS. A partir de la solución madre se realizaron diluciones, efectuando las mismas concentraciones de la fase anterior tanto para acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, Obtenido la gráfica correspondiente para calcular el IC₅₀.

3.3.2.1. Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa con solución madre 2.

Para este análisis se utilizó las mismas concentraciones empleadas con la solución madre 1, pero el cosolvente 1 junto con el cosolvente 2 a concentración 1, comparando de esta manera las concentraciones que presenta en los distintos casos.

Las concentraciones utilizadas fueron 75, 50, 25, 10, 5, 2.5 y 1 µg/ml, obteniendo los siguientes resultados del porcentaje de inhibición (Tabla 9-3).

Tabla 9-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, con solución madre 2.

Concentración del extracto alcaloidal (µg/ml)	Porcentaje de inhibición de AChE
75	82.34 ± 1.59
50	77.87 ± 0.39
25	67.60 ± 2.29
10	47.72 ± 2.25
5	30.43 ± 2.09
2.5	15.80 ± 2.08
1	7.02 ± 0.68

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

Luego de obtener los resultados, en donde el mayor porcentaje de inhibición enzimática se observó en la concentración de 75 µg/ml con 82.34 %, el valor de inhibición enzimática media está entre las concentraciones 10 y 25 µg/ml, tomando en cuenta que se encuentran dos valores superiores e

inferiores del 50 % de inhibición enzimática. Para el cálculo de IC₅₀ se lo realizo con los datos de la ecuación de la recta.

Tabla 10-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, sobre AChE y su correspondiente R²

Compuesto	IC ₅₀ (µg/ml)	R ²
Galantamina	0.3 ± 0.02	0.96
<i>Hippeastrum sp.</i>	12.20 ± 0.58	0.99

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

En la tabla 10-3, se muestran los resultados del IC₅₀ del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, siendo este valor de 12.20 ± 0.47 µg/ml, el cual es ligeramente superior en relación al compuesto de referencia galantamina que tiene como IC₅₀ 0.3 ± 0.02 µg/ml.

3.3.2.2. Actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con solución madre 2.

Para este análisis se usó el cosolvente 1 junto con el cosolvente 2 a una concentración 1 empleándose las mismas concentraciones de la solución madre 1 siendo estas; 175, 150, 125, 100, 75, 50 y 25 µg/ml, obteniendo los siguientes resultados del porcentaje de inhibición (Tabla 11-3).

Tabla 11-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, con solución madre 2.

Concentración del extracto alcaloidal (µg/ml)	Porcentaje de inhibición de BuChE
175	63.28 ± 1.63
150	59.48 ± 1.18
125	55.11 ± 0.87
100	49.59 ± 0.45
75	39.75 ± 0.30
50	25.97 ± 1.07
25	3.77 ± 0.64

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

En la anterior tabla se divisa que el IC₅₀ se encuentra entre la concentración de 100 y 125 µg/ml sobre la enzima butirilcolinesterasa del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, siendo así que para una mejor curva y línea de tendencia logarítmica están dos valores superiores e inferiores del 50 % de inhibición enzimática. Estos resultados fueron tomados de tres repeticiones consecutivas realizadas

en las mismas condiciones mediante una media, en donde la ecuación de la recta se consigue con las concentraciones del extracto alcaloidal y el porcentaje de inhibición, calculando de esta manera el IC₅₀.

Tabla 12-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, sobre BuChE y su correspondiente R²

Compuesto	IC ₅₀ (µg/ml)	R ²
Galantamina	16.13 ± 0.39	0.99
<i>Hippeastrum sp.</i>	106.95 ± 1.07	0.99

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

En el análisis con el cosolvente 1 junto con el cosolvente 2 a concentración 1 del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, el valor del IC₅₀ fue de 106.95 ± 1.07 µg/ml valor superior en relación al compuesto de referencia galantamina que se obtuvo el valor de 16.13 ± 0.39 µg/ml los dos con un R² de 0.99, concentraciones requeridas para inhibir la enzima un 50 %.

3.3.3. Actividad inhibitoria con solución madre 3

Cabe mencionar que en la solución madre 3 se utilizó el cosolvente 1 + cosolvente 2 a una concentración de 2 junto con el extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.* y PBS, evidenciándose que esta dilución es más translúcida con relación a la dilución con el cosolvente 1 y cosolvente 2 a concentración 1 con menos partículas flotantes, utilizando las mismas concentraciones que en las dos soluciones madres anteriores tanto para acetilcolinesterasa como butirilcolinesterasa.

3.3.3.1. Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa con solución madre 3

Este análisis se efectuó con el cosolvente 1 junto con el cosolvente 2 a una concentración 2, utilizando las siguientes concentraciones 75, 50, 25, 10, 5, 2.5 y 1 µg/ml, obteniendo los resultados del porcentaje de inhibición (Tabla 13-3).

Tabla 13-3: Porcentaje de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, con solución madre 3.

Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de inhibición de AChE
75	80.56 ± 0.68
50	76.83 ± 0.80
25	69.49 ± 1.22
10	59.15 ± 0.79
5	44.32 ± 1.14
2.5	31.64 ± 1.26
1	22.09 ± 1.18

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

El IC_{50} se encuentra entre las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ sobre la enzima acetilcolinesterasa, evidenciando dos valores superiores e inferiores del 50 % de inhibición obteniendo una curva y línea de tendencia logarítmica adecuada.

Para el cálculo de IC_{50} se lo realizo con los datos de la ecuación de la recta luego de tres repeticiones consecutivas realizadas.

Tabla 14-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, sobre AChE y su correspondiente R^2

Compuesto	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	R^2
Galantamina	0.37 ± 0.03	0.95
<i>Hippeastrum sp.</i>	7.25 ± 0.11	0.99

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

En la anterior tabla se muestran los resultados del IC_{50} del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, con 7.25 ± 0.11 $\mu\text{g/ml}$ con R^2 0.99, el cual es superior al compuesto de referencia galantamina con 0.37 ± 0.03 $\mu\text{g/ml}$ con R^2 0.99.

3.3.3.2. Actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con solución madre 3

El extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, se lo disolvió con el cosolvente 1 junto con el cosolvente 2 a una concentración de 2, el cual se sometió a las siguientes concentraciones; 175, 150, 125, 100, 75, 50 y 25 µg/ml, obteniendo los siguientes resultados del porcentaje de inhibición (Tabla 15-3).

Tabla 15-3: Porcentaje de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, con solución madre 3.

Concentración del extracto alcaloidal (µg/ml)	Porcentaje de inhibición de BuChE
175	62.06 ± 0.75
150	58.65 ± 0.76
125	54.09 ± 0.84
100	49.08 ± 0.90
75	41.33 ± 1.40
50	32.22 ± 2.09
25	14.73 ± 0.24

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

El IC₅₀ se encuentra entre las concentraciones de 100 y 125 µg/ml sobre la enzima butirilcolinesterasa del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, teniéndose sobre el 50 % de inhibición dos valores superiores y tres inferiores proporcionando una mejor curva y línea de tendencia logarítmica, resultados evidenciados de tres repeticiones consecutivas en las mismas condiciones de temperatura y tiempo, para el cálculo del IC₅₀ se utilizó la ecuación de la recta.

Tabla 16-3: Actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, sobre BuChE y su correspondiente R²

Compuesto	IC ₅₀ (µg/ml)	R ²
Galantamina	16.03 ± 0.77	0.99
<i>Hippeastrum sp.</i>	105.06 ± 2.14	0.99

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

En la tabla 16-3, se observa que el valor del IC₅₀ del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, es de 105.06 ± 2.14 µg/ml el cual es superior al compuesto de referencia galantamina el cual es 16.03 ± 0.77 µg/ml los dos con un R² de 0.99 concentraciones en las cuales se inhibe la enzima en un 50 %.

3.3.4. Análisis comparativo de resultados de IC₅₀ usando diferentes soluciones madre

3.3.4.1. Acetilcolinesterasa.

En la tabla 17-3, se observan los valores de IC₅₀ empleando las tres soluciones madre diferentes, valores obtenidos de tres repeticiones realizadas en las mismas condiciones.

Tabla 17-3: Resultados de IC₅₀ sobre la enzima acetilcolinesterasa

	IC ₅₀ (µg/ml)	R ²
<i>Hippeastrum sp.</i> Solución Madre 1 (Cosolvente 1 + PBS)	12.86 ± 0.83	0.99
Galantamina	0.48 ± 0.14	0.93
<i>Hippeastrum sp.</i> Solución Madre 2 (Cosolvente 1 + cosolvente 2 a una concentración 1 + PBS)	12.20 ± 0.58	0.99
Galantamina	0.3 ± 0.02	0.96
<i>Hippeastrum sp.</i> Solución Madre 3 (Cosolvente 1 + cosolvente 2 a una concentración 2 + PBS)	7.25 ± 0.11	0.99
Galantamina	0.37 ± 0.03	0.95

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

Usando la solución madre 1 del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, se obtuvo un IC₅₀ de 12.86 ± 0.83 µg/ml, en la solución madre 2 un IC₅₀ de 12.20 ± 0.58 µg/ml y en la solución madre 3 un IC₅₀ de 7.25 ± 0.11 µg/ml. Estos resultados evidencian que en el caso de la solución madre 3 se obtuvo mejor actividad enzimática, lo cual indica que los alcaloides fueron disueltos de forma más efectiva usando el cosolvente 2 a una concentración 2, mostrando incluso esta disolución más translucidez y la presencia de menor cantidad de partículas suspendidas.

La actividad inhibitoria sobre AChE del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, fue alta (IC₅₀ de 7.25 ± 0.11 µg/ml) respecto a galantamina (IC₅₀ de 0.37 ± 0.03 µg/ml).

En evidencia científica se observa que *Hippeastrum papilio* presenta una actividad enzimática sobre acetilcolinesterasa con un IC₅₀ de 4.35 ± 0.01 µg/ml siendo un valor inferior al compuesto de referencia galantamina con un IC₅₀ de 0.354 ± 0.02 µg/ml, *Hippeastrum reticulatum* presento una inhibición débil de AChE con IC₅₀ de 5.75 ± 0.26 mientras que la galantamina presento inhibición con un IC₅₀ de 0.099 ± 0.008 µg/ml (De Andrade , 2014, p.66), (Tallini , y otros, 2017).

3.3.4.2. Butirilcolinesterasa.

En la tabla 18-3, se observa los resultados de las tres soluciones madre realizadas de la actividad inhibitoria de la enzima butirilcolinesterasa del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*

Tabla 18-3: Resultados de IC₅₀ sobre la enzima butirilcolinesterasa

	IC ₅₀ (µg/ml)	R ²
<i>Hippeastrum sp.</i> Solución Madre 1 (Cosolvente 1 + PBS)	117.28 ± 2.19	0.99
Galantamina	16.70 ± 1.38	0.99
<i>Hippeastrum sp.</i> Solución Madre 2 (Cosolvente 1 + cosolvente 2 a una concentración 1 +PBS)	106.95 ± 1.07	0.99
Galantamina	16.13 ± 0.39	0.99
<i>Hippeastrum sp.</i> Solución Madre 3 (Cosolvente 1 + cosolvente 2 a una concentración 2 + PBS)	105.06 ± 2.14	0.99
Galantamina	16.03.± 0.03	0.99

Realizado por: Lliguin Mejía, Brygith, 2019

La solución madre 1 dio un IC₅₀ de 117.28 ± 2.19 µg/ml, la solución madre 2 con un IC₅₀ de 106.95 ± 1.07 µg/ml y la solución madre 3 con un IC₅₀ de 105.06 ± 2.14 µg/ml. Observando que la solución 3 tuvo mejor actividad enzimática, evidenciándose que los alcaloides están disueltos de manera más efectiva usando el cosolvente 2 a una concentración 2, siendo a simple vista traslucido y con menor cantidad de partículas suspendidas.

La actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa, del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.* fue mucho mayor ($105.06 \pm 0.77 \mu\text{g/ml}$) al compuesto de referencia galantamina con el IC_{50} de $16.03 \pm 0.77 \mu\text{g/ml}$.

Estudios realizados sobre la enzima butirilcolinesterasa en *Hippeastrum reticulatum* evidencia que no existe inhibición enzimática, mientras que la galantamina presento inhibición con un IC_{50} de $0.823 \pm 0.041 \mu\text{g/ml}$ (Tallini , y otros, 2017). *Hippeastrum argentinum* mostro una actividad inhibitoria débil frente a esta enzima con un IC_{50} de $125.36 \pm 0.026 \mu\text{g/ml}$ (Ortiz et al, 2016: p.1576).

CONCLUSIONES

- Se logró obtener el extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, a partir de los bulbos de la especie vegetal antes mencionada, mediante un procedimiento en donde se utilizó cosolventes orgánicos con cambios de pH, obteniendo un rendimiento de 0.95 %.
- Se identificó mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas cuatro alcaloides en el bulbo de *Hippeastrum sp.*, siendo montanina el compuesto más abundante, seguido por tazetina y en menor cantidad los alcaloides de crinina y licorina.
- Se evaluó la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*, sobre la enzima acetilcolinesterasa utilizando como compuesto de referencia galantamina, con diferentes cosolvente, siendo la solución madre 3 (cosolvente 1 y cosolvente 2 a una concentración 2 junto con PBS), dando un IC_{50} de 7.25 ± 0.11 $\mu\text{g/ml}$, lo que corresponde a una actividad inhibitoria alta sobre AChE.
- En el caso de la enzima butirilcolinesterasa, la mejor actividad enzimática se determinó usando la solución madre 3, en la que el IC_{50} fue de 105.06 ± 2.14 $\mu\text{g/ml}$, representando una actividad inhibitoria alta del extracto alcaloidal de *Hippeastrum sp.*

RECOMENDACIONES

- *Hippeastrum* es un género vegetal ornamental muy apreciado y comercializado, por lo general han sido cultivadas en jardines por sus atractivos colores. Por ello, sería recomendable continuar manteniendo esta especie a través de cultivos.
- Los protocolos para obtener los resultados de actividad inhibitoria enzimática deben ser seguidos adecuadamente ya que el tiempo y temperatura influye sobre estos datos.
- Se recomienda realizar estudios sobre el género *Hippeastrum* ya que contiene alcaloides que son beneficiosos como antitumorales a más de su gran actividad sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

GLOSARIO

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ADI	Alzheimer's Disease International
ATC	Yoduro de Acetilcolina
BIFRENES	La Biodiversidad Iberoamericana como Fuente de Recursos Naturales para su Explotación Sostenible
BTC	Yoduro de Butirilcolina
BuChE	Butirilcolinesterasa
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
DTNB	Ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzoico)
EA	Enfermedad de Alzheimer
FDA	Food and Drugs Administration (Administración de alimentos y medicamentos)
G	Galantamina
IC₅₀	Concentración inhibitoria máxima media
IRM	Imagen por resonancia magnética
nACh	Acetilcolina de tipo nicotínico
PBS	Buffer Fosfato salino
TC	Tomografía Computarizada
TASE	Trascender con Amor Servicio y Excelencia

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA LEÓN, Karen. Identificación de los alcaloides de *Stenomesson aurantiacum* (Kunth) Herb [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad de Barcelona, España. 2013. pp. 1-8. [Consulta: 2019-07-15]. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1541/1/T-SENESCYT-00674.pdf>

ACOSTA LEON, K; et al. "Identification of the Alkaloids of *Stenomesson Aurantiacum* (Kunth) Herb., an Amaryllidaceae Species from the Ecuadorian Andes". *PharmacologyOnline Scielo* [En línea], 2014, (España) (3), pp. 180-182. [Consulta: 16 enero 2020]. Disponible en: https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2014/vol3/PhOL_2014_3_A025_Acosta_178_025.pdf

ALBENDÍN GARCÍA, María Gemma. Caracterización de las colinesterasas presentes en cerebro y músculo de dorada (*Sparus aurata*) y estudio de su inhibición por insecticidas organofosforados [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad de Cádiz, Cádiz, España. 2009. p. 58. [Consulta: 2019-09-16]. Disponible en: https://rodin.uca.es/xmlui/bitstream/handle/10498/15731/Tes_2009_22.pdf?sequence=1&isAllowed=y

ALBERT CABRERA, M; et al. "Pathogenesis and current treatment of Alzheimer's disease". *Scielo* [En línea], 2014, (Cuba) 48(3), p. 5. [Consulta: 2 agosto 2019]. ISSN 1561-2988. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152014000300016

ALPÍZAR QUESADA, C. L., & MORALES ALPÍZAR, C. "La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa". *Scielo* [En línea], 2003, (Costa Rica) 45(2), pp. 3-5. [Consulta: 4 agosto 2019]. ISSN 0001-6012. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022003000200005

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Asociación de Alzheimer. Información Básica Sobre la Enfermedad de Alzheimer. [En línea], 2016, [Consulta: 7 agosto 2019]. Disponible: https://www.alz.org/national/documents/sp_brochure_basicsofalz.pdf

ARIZAGA, R; et al. "Diet and prevention in Alzheimer's disease". *ScienceDirect* [En línea], 2018, (España) 10, p. 46. [Consulta: 8 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1853002817300940>

ASSOCIATION, A. Asociación de Alzheimer. Alzheimer y Demencia Tratamientos. [En línea], 2018, [Consulta: 9 agosto 2019]. Disponible: <https://www.alz.org/alzheimer-demencia/tratamientos?lang=es-MX>

BALDEÓN SAMANIEGO, V. S. Evaluación de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Phaedranassa glauciflora* sobre acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa [En línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, 2018, p.23. [Consulta: 2020-01-07]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8819/1/56T00759.pdf>

BARQUERO JIMÉNEZ, M., & PAYNO VARGAS, M. “Enfermedad de Alzheimer. Concepto. Etiopatogenia. Manifestaciones clínicas. Criterios de sospecha. Formas de presentación. Historia natural. Diagnóstico diferencial”. *ScienceDirect* [En línea], 2007, (España) 9, p. 4930. [Consulta: 8 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0211344907754747>

BARQUERO QUIRÓS, M. *Principios Y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases* [En línea]. Costa Rica : Universidad de Costa Rica, 2006. [Consulta: 15 agosto 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=g3o_PUTmr3wC&dq=Principios+y+Aplicaciones+de+la+Cromatografía+de+Gases.+baquero&hl=es&source=gbs_navlinks_s

BERGOÑÓN FUSTER , S. Aislamiento y caracterización química de alcaloides del tipo Amaryllidaceae. Producción de galantamina por cultivos “in vitro” de *Narcissus confusus* [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad de Barcelona, España. 1994. p. 163. [Consulta: 2019-07-15]. Disponible en: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2629/02.SBF_2de2.pdf?sequence=2

BRANDT GIORDANI, R; et al. “Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae)”. *SciELO* [En línea], 2008, (Brasil) 31(8), p. 2042. [Consulta: 15 agosto 2019]. ISSN 1678-7064. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000800024

BREDESEN, D. E. *El fin del Alzheimer (Colección Vital): El primer programa para prevenir y revertir el deterioro cognitivo* [En línea]. México: Penguin Random House Grupo Editorial México, 2018. [Consulta: 18 agosto 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=vRdWDwAAQBAJ&hl=es&source=gbs_navlinks_s

CALDAS AVILA, A. P. Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Escuela de Ingeniería Química, Ecuador. 2012. p. 12. [Consulta: 2019-08-21]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2468/1/tq1111.pdf>

CARLESSO SOPRANI , L. Estudio químico e Biológico de *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntze (Amaryllidaceae) [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Federal Espírito Santo, Brasil. 2017. pp. 18-19. [Consulta: 2019-08-22]. Disponible en:

http://repositorio.ufes.br/jspui/bitstream/10/8360/1/tese_9449_Disserta%20a7%20a3o%20final%20-%20Let%20adcia%20Carlesso%20Soprani.pdf

CARRASCO RUIZ, A. F. Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile*. [En línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. Riobamba, 2017, pp.21-33. [Consulta: 2020-01-15]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7925/1/56T00741.pdf>

CARRETERO, M. “Galantamina”. *Elsevier* [En línea], 2003, (España) 22(8), p. 141. [Consulta: 18 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-galantamina--13051501>

CARRETERO, M. “Los inhibidores de la acetilcolinesterasa en el tratamiento del Alzheimer”. *Elsevier* [En línea], 2003, (España) 22(7), p. 115. [Consulta: 18 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-inhibidores-acetilcolinesterasa-el-tratamiento-13050017>

CARRILLO YÁNEZ, D. F. Evaluación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Eucrosia mirabilis*. [En línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. Riobamba, 2018, p.33. [Consulta: 2020-01-07]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8842/1/56T00773.pdf>

CAVALLARO, V. Plantas de la región como fuente potencial de metabolitos secundarios inhibidores de colinesterasa [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad Nacional del Sur, Argentina, 2015. p. 53. [Consulta: 2019-08-25]. Disponible en: [.http://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/123456789/2486/1/Tesis%20doctoral%20Cavallaro%20Valeria.pdf](http://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/123456789/2486/1/Tesis%20doctoral%20Cavallaro%20Valeria.pdf)

CEAFA. Ceafa. Terapias no farmacológicas en las asociaciones de familiares de personas con alzheimer. [En línea], 2016, [Consulta: 26 agosto 2019]. Disponible: <https://www.ceafa.es/files/2017/08/ManualTNF-2.pdf>

COCHO DE JUAN, J. Á. Desarrollo de un método por espectrometría de masas en tándem para la de determinación de acilcarnitinas y la detección neonatal de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de Santiago de Compostela, Facultades de Química y de Medicina y Odontología, España, 2007. p. 27. [Consulta: 2019-08-26]. Disponible en: https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2383/9788497509749_content.pdf?sequence=1.

CORTES, N; et al. “Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants”. *ScienceDirect* [En línea], 2015, (Colombia) 102, p. 280. [Consulta: 26 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708514004695>

COSTA LÓPEZ, J. *Curso de ingeniería química* [En línea]. España: Reverte, 1983. [Consulta: 18 agosto 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=XZNYpvnO_V8C&dq=que+es+la+extraccion&hl=es&source=gbs_navlinks_s

DE ANDRADE , J. P. Estudio de la composición alcaloídica de *Narcissus broussonetii* y de tres especies brasileñas del género *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia, España. 2014. pp. 31-66. [Consulta: 2019-10-01]. Disponible en: http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/55988/1/JPdA_TESIS.pdf

ELLMAN, G; et al. “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity”. *ScienceDirect* [En línea], 1961, (España) 7, pp. 88-89. [Consulta: 27 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0006295261901459>

ESTRADA SERRATO, C. Polimorfismos del gen butirilcolinesterasa responsables de reacciones adversas en pacientes consumidores de “cocaína” [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Bogota. 2014. p. 31. [Consulta: 2019-10-02]. Disponible en: <https://repository.urosario.edu.co/bitstream/handle/10336/8796/EstradaSerrato-Carlos-2014.pdf;jsessionid=444CA51BAEFA2F0FD9BE8A808C812F86?sequence=1>

FAN CHIANG, T; et al. “Synthesis of phenanthridine skeletal Amaryllidaceae alkaloids”. *ScienceDirect* [En línea], 2016, (España) 72, p. 5642. [Consulta: 03 septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402016307232?via%3Dihub>

GÓMEZ GALLEGO, M., & GÓMEZ GARCÍA, J. “Music therapy and Alzheimer's disease: Cognitive, psychological, and behavioural effects”. *ScienceDirect* [En línea], 2017, (España) 32, p. 303. [Consulta: 4 septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213485316000049>

GÓMEZ MURILLO, P., & ARELLANO MARTÍN, I. “Notas sobre *Hippeastrum reginae* (Linnaeus) Herbert en Bolivia”. *Micobotanica* [En línea], 2019, (Bolivia), p. 1. [Consulta: 7 septiembre 2019]. Disponible en: [http://micobotanicajaen.com/Revista/Articulos/PGomezM/NOTAS%20SOBRE%20HIPPEASTRUM%20REGINAE%20\(LINNAEUS\)%20HERBERT%20EN%20BOLIVIA.pdf](http://micobotanicajaen.com/Revista/Articulos/PGomezM/NOTAS%20SOBRE%20HIPPEASTRUM%20REGINAE%20(LINNAEUS)%20HERBERT%20EN%20BOLIVIA.pdf)

GONZÁLEZ MAS, R., & MAS GONZÁLEZ, R. *Enfermedad de Alzheimer* [En línea]. España: Elsevier España, 2000. [Consulta: 10 septiembre 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=Mo5jNBBVGKEC&dq=enfermedad+de+alzheimer&hl=es&source=gbs_navlinks_s

GUTIÉRREZ , M., & DROGUET, M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. [En línea], 2002, [Consulta: 11 septiembre 2019]. Disponible: <https://core.ac.uk/download/pdf/41780740.pdf>

LACERDA DE OLIVEIRA, M. V. Estudio químico em alcaloides de *Hippeastrum reginae* (L.) Herb. (Amaryllidaceae) [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Federal Espírito Santo, Brasil. 2017. p. 26. [Consulta: 2019-09-25]. Disponible en: http://repositorio.ufes.br/bitstream/10/8354/1/tese_9419_DISSERTA%c3%87%c3%83O%20DE%20MESTRADO%20MARCOS_PPGCFar%20UFES.pdf

LÓPEZ LOCANTO, D. “Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias”. *Arch Med* [En línea], 2015, (Uruguay) 37(1), p. 62. [Consulta: 15 septiembre 2019]. ISSN 0250-3816. Disponible en: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/ami/v37n2/v37n2a03.pdf>

LÓPEZ, S; et al. Galanthamine Pattern in *Narcissus confusus* Plants [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad de Barcelona, España. 2004. p. 2. [Consulta: 2019-09-29]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/8897320_Galanthamine_Pattern_in_Narcissus_confusus_Plants

MARCET, S. Fuentes de Galantamina para el Alzheimer. [En línea], 2015, [Consulta: 1 octubre 2019]. Disponible: <http://www.suplementos.unsj.edu.ar/octubre73/?p=127>

MEEROW, A; et al. “Two new species of endemic Ecuadorean Amaryllidaceae (Asparagales, Amaryllidaceae, Amarylloideae, Eucharideae)”. *PubMed* [En línea], 2015, (Ecuador), pp. 4-6. [Consulta: 29 septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25931969>

MENDOZA PATIÑO, N. *Farmacologia medica / Medical Pharmacology* [En línea]. Mexico : Ed. Médica Panamericana, 2008. [Consulta: 2 octubre 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=EUBNE4Y0v9sC&dq=galantamina+para+el+tratamiento+d+el+alzheimer&hl=es&source=gbs_navlinks_s

MOLLOY, W., & CALDWELL, P. *La enfermedad de Alzheimer: una guía práctica para cuidadores y familiares* [En línea]. España: Grafiques S.A., 2002. [Consulta: 5 octubre 2019]. Disponible en:

https://books.google.com.ec/books?id=cBan0jk_La8C&dq=diagnostico+de+la+enfermedad+de+alzheimer&hl=es&source=gbs_navlinks_s

MORELL EVANGELISTA, I. *Plaguicidas: aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos* [En línea]. España: Castello D'impressio S.I., 1998. [Consulta: 5 octubre 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=Ti3ZZRNlIaaYC&dq=que+es+cromatograf%C3%ADa+de+gases+acoplada+a+espectrometr%C3%ADa+de+masas&hl=es&source=gbs_navlinks_s

NAVARRO MERINO, E; et al. "Alzheimer's disease". *ScienceDirect* [En línea], 2015, (España) 11, p. 4308. [Consulta: 25 septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541215000037>

NAVARRO MEZA, M., & OROZCO CEBALLOS, J. L. *Cuidado y alimentación en la neurodegeneración, Alzheimer y Parkinson: Información básica* [En línea]. Mexico: Editorial Universitaria, 2015. [Consulta: 7 octubre 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=UYD7CAAQBAJ&hl=es&source=gbs_navlinks_s

ORTIZ, J., & PIGNI, N. "Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and Their Cholinesterase-Inhibitory Activities: An in Vitro and in Silico Study". *Journal of Natural Products*. En línea], 2016, (Universidad San Juan, Argentina) 17(11), pp.1575-1577. [Consulta: 15 enero 2020]. ISSN 0163-3864. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/38695>

OSORIO DURANGO , E. J. Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora colombiana: alcaloides de *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) y biflavonoides de *Garcinia madruno* (Clusiaceae) [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia, España. 2008. p. 9. [Consulta: 2019-10-14]. Disponible en: https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/2618/EJOD_TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y

PAREJA GIJON, F. B. *ALZHEIMER - Prevención desde la niñez* [En línea]. España: ACCI (Asoc. Cultural y Científica Iberoameric.), 2017. [Consulta: 8 octubre 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=OdLhDgAAQBAJ&hl=es&source=gbs_navlinks_s

PÉREZ ROMERO, A., & GONZÁLEZ GARRIDO, S. "The importance of behavioural and psychological symptoms in Alzheimer's disease". *ScienceDirect* [En línea], 2018, (España) 33, p. 380. [Consulta: 10 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213485316300111>

PEYRONNET, M. *Prevenir el Alzheimer* [En línea]. Hispano Europea: Editorial Hispano Europea, 2011. [Consulta: 12 octubre 2019]. Disponible en:

https://books.google.com.ec/books?id=YY_iJmqVYQC&dq=que+es+el+alzheimer&hl=es&source=gbs_navlinks_s

PIGNI, N. B. Biodiversidad y Conservación de Recursos Fitogenéticos. Las Amarillidáceas como Fuente de Productos Bioactivos [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia, España. 2013. pp. 19-114. [Consulta: 2019-10-17]. Disponible en: https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/120668/NBP_TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y

PLANTAS, F. Flores y Plantas. Hippeastrum. [En línea], 2014, [Consulta: 6 octubre 2019]. Disponible: <https://www.floresyplantas.net/hippeastrum/>

RODRIGUEZ, Y; et al. “Uso de plantas mexicanas con efecto inhibitorio sobre la enzima Acetilcolinesterasa como un posible tratamiento para la enfermedad de Alzheimer”. *Revista Mexicana De Ciencias Farmacéuticas* [En línea], 2017, (México) 45(2), p. 8. [Consulta: 9 octubre 2019]. ISSN 1870-0195-6012. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57956617002.pdf>

ROMÁN GARCÍA, M. M. *Manual del cuidador de enfermos de alzheimer* [En línea]. España: MAD-Eduforma, 2005. [Consulta: 14 octubre 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=34FqmJRD4QcC&dq=SINTOMAS+DEL+ALZHEIMER&hl=es&source=gbs_navlinks_s

SALAZAR VALLEJO, M; et al. *Tratado de Psicofarmacología Bases y Aplicación Clínica* [En línea]. (Segunda ed.). Buenos Aires - Madrid: Medica Panamericana, 2014. [Consulta: 16 octubre 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=ugBvQChj4JAC&dq=galantamina+para+el+tratamiento+de+l+alzheimer&hl=es&source=gbs_navlinks_s

SALAZAR, C., & VILLAR, S. *Evaluación Neuropsicológica e Intervención en Demencias: La Enfermedad de Alzheimer* [En línea]. CAAP, 2007. [Consulta: 14 octubre 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=YlgCLJetat8C&dq=diagnostico+de+la+enfermedad+de+alzheimer&hl=es&source=gbs_navlinks_s

SÁNCHEZ LÓPEZ, I; et al. *ALZHEIMER*. [En línea]. (Primera ed.). 3Ciencias, 2016. [Consulta: 18 octubre 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=sF9vCwAAQBAJ&dq=galantamina+para+el+tratamiento+del+alzheimer&hl=es&source=gbs_navlinks_s

SEBBEN, C. Investigación química e biológica em *Hippeastrum breviflorum* Herb. (Amaryllidaceae) [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Federal Do Rio Grande

Do Sul, Facultad de Farmacia, Brasil. 2005. p. 20. [Consulta: 2019-10-17]. Disponible en: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/4977/000507324.pdf?sequence=1>

SENPLADES. Semplades. Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021 Toda una Vida. [En línea], 2017, [Consulta: 16 octubre 2019]. Disponible: http://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/10/PNBV-26-OCT-FINAL_0K.compressed1.pdf

STEPHEN F., M. “Chapter 3 The Amaryllidaceae Alkaloids”. *ScienceDirect* [En línea], 1987, (Estados Unidos) 30, p. 262. [Consulta: 4 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099959808602084>

TALLINI , L; et al. “*Hippeastrum reticulatum* (Amaryllidaceae): Alkaloid Profiling, Biological Activities and Molecular Docking”. *molecules* [En línea], 2017, (Barcelona) 22(12), pp. 3-5. [Consulta: 15 enero 2020]. DOI 10.3390. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/321737066_Hippeastrum_reticulatum_Amaryllidaceae_Alkaloid_Profiling_Biological_Activities_and_Molecular_Docking

TASE. Fundación Tase. Alzheimer. [En línea], 2017, [Consulta: 18 octubre 2019]. Disponible: <https://www.fundaciontase.org/mes-de-alzheimer>

VERGARA SERRANO , Á. Galantamina y enfermedad del Alzheimer [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad De Sevilla, Facultad de Farmacia, España. 2017. p. 20. [Consulta: 2019-10-14]. Disponible en: <https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/64911/Galantamina%20y%20enfermedad%20del%20Alzheimer.pdf?sequence=1>

ZÚÑIGA SANTAMARÍA, T; et al. “Estudios farmacogenéticos en la enfermedad de Alzheimer”. *Elsevier* [En línea], 2018, (España), pp. 2-4. [Consulta: 19 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-295-avance-resumen-estudios-farmacogeneticos-enfermedad-alzheimer-S0213485318301567>

ANEXOS

ANEXO A: RECOLECCIÓN DE *Hippeastrum* sp.



Hippeastrum sp., recolectada en Riobamba

ANEXO B: PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL



Selección de los bulbos en buen estado

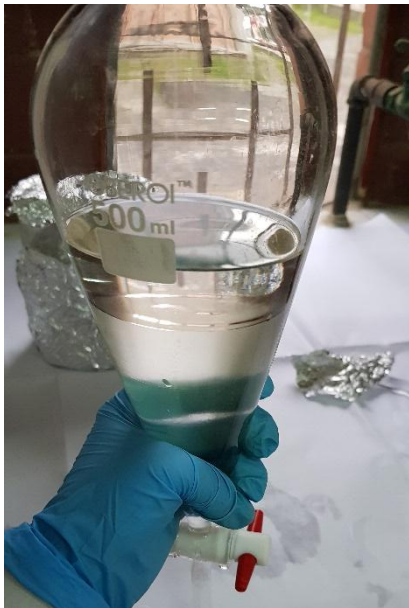


Bulbos limpios para realizar cortes de 1.5cm

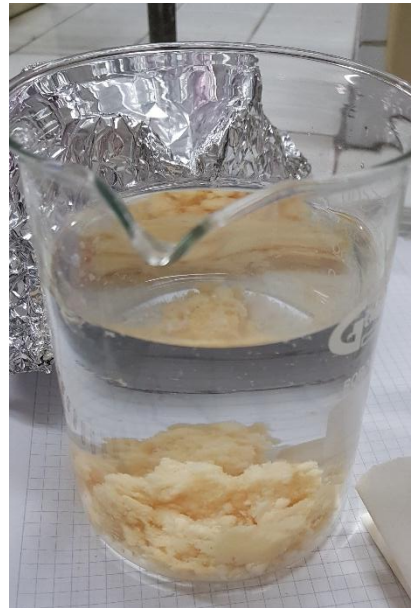


Secado de bulbos de *Hippeastrum sp.*, para luego ser molidos y pesados.

ANEXO C: EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES



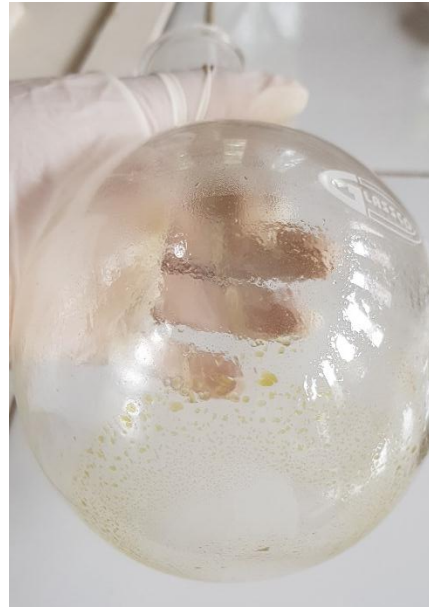
Extracción alcaloidal con éter etílico



Colocado de sulfato de sodio anhidro y goma arábica para luego filtrarlo.



Concentración de los alcaloides por medio del rotavapor.

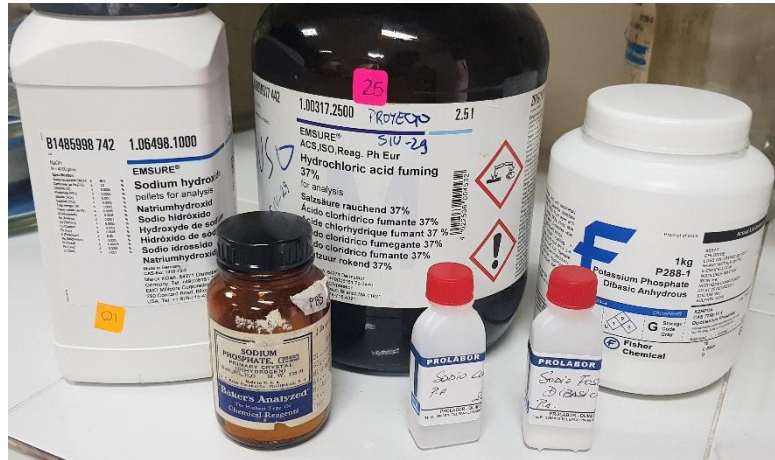


Alcaloides de *Hippeastrum sp.*



Extracto puro de alcaloides de *Hippeastrum sp.*

ANEXO D: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES



Reactivos utilizados para preparar las diferentes soluciones

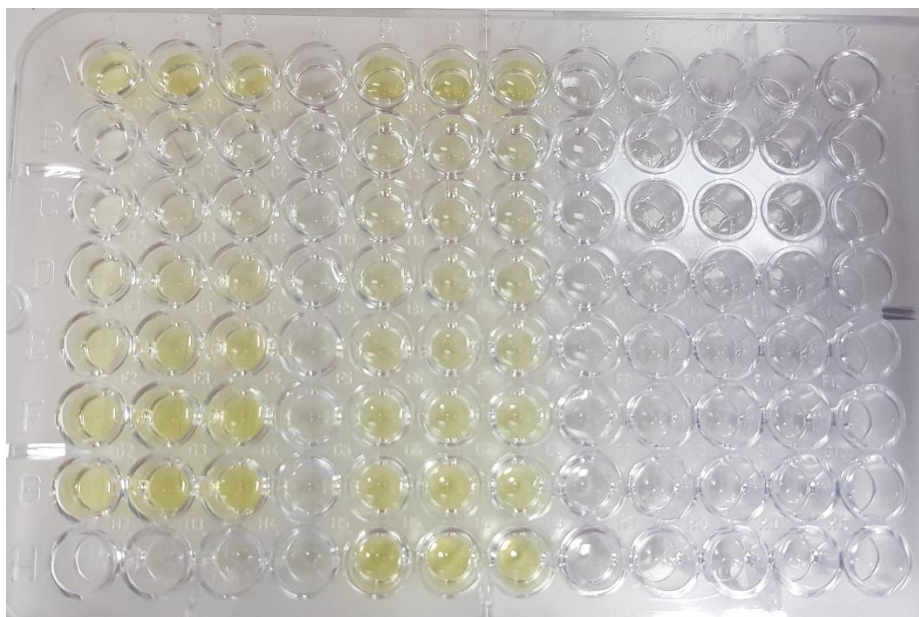


Solución salina y PBS

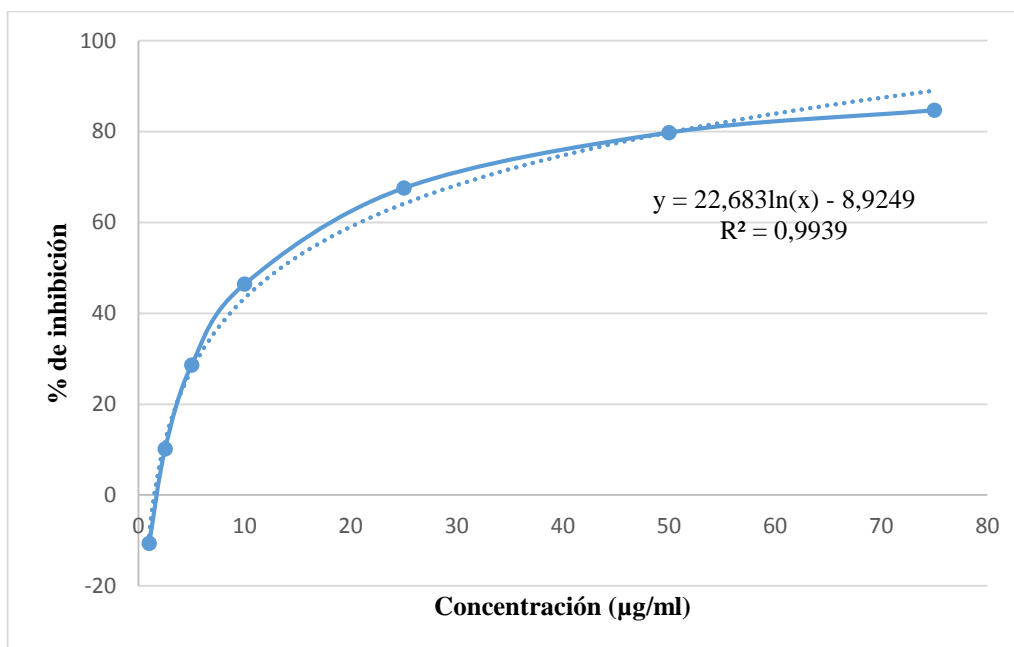


Pesaje de reactivos

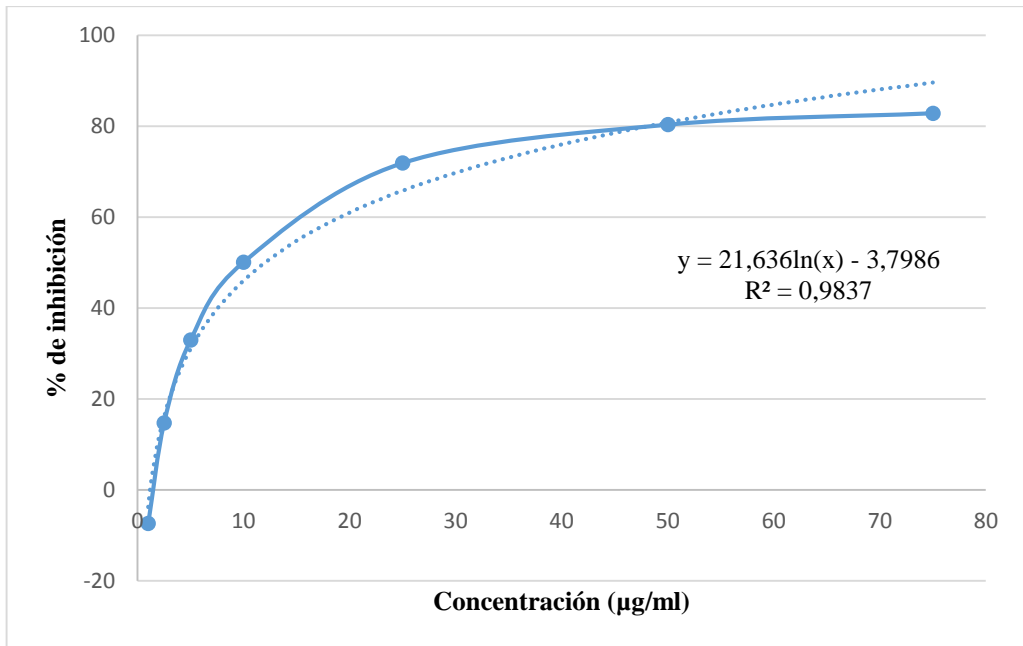
ANEXO E: MICROPLACA LUEGO DE LA LECTURA



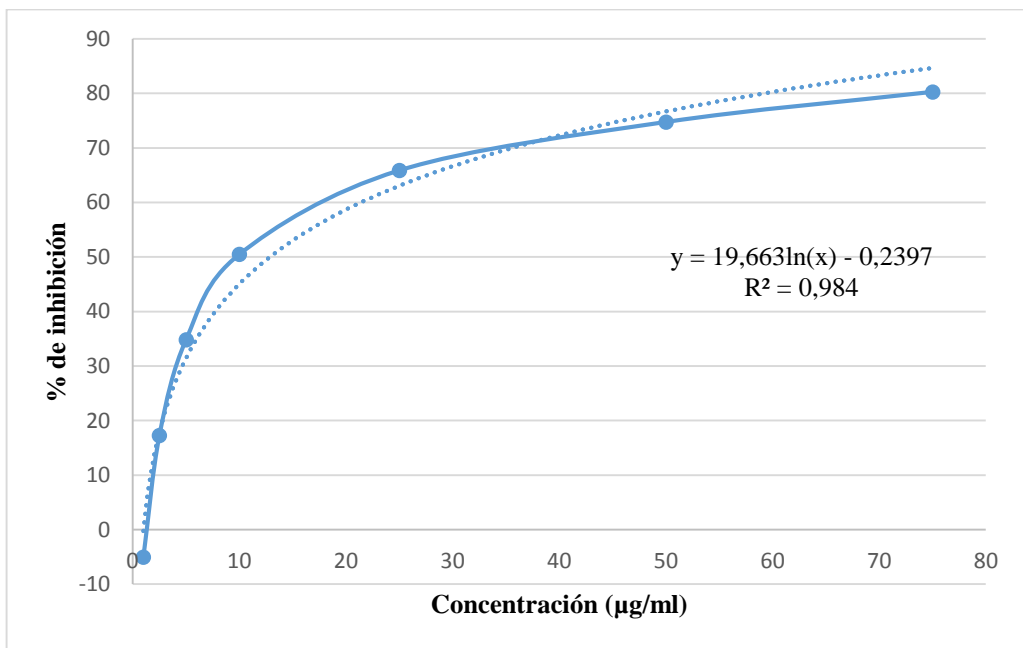
ANEXO F: CURVAS DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA SOBRE ACETILCOLINESTERASA (ACHE) DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DE *Hippeastrum sp.*, TRES REPETICIONES.



Curva de la primera repetición del ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal

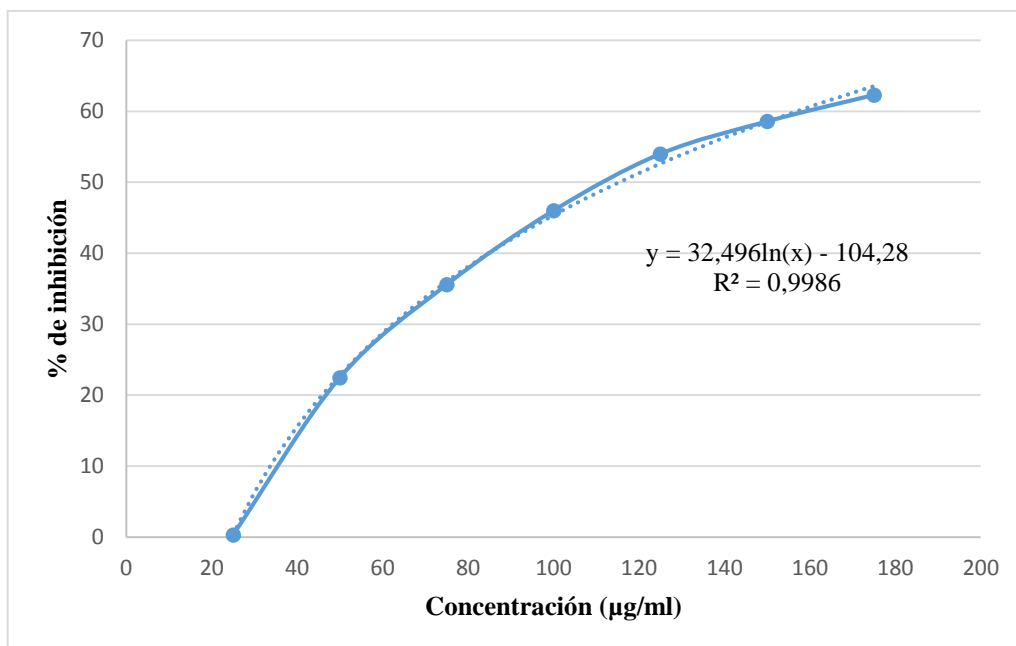


Curva de la segunda repetición del ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal

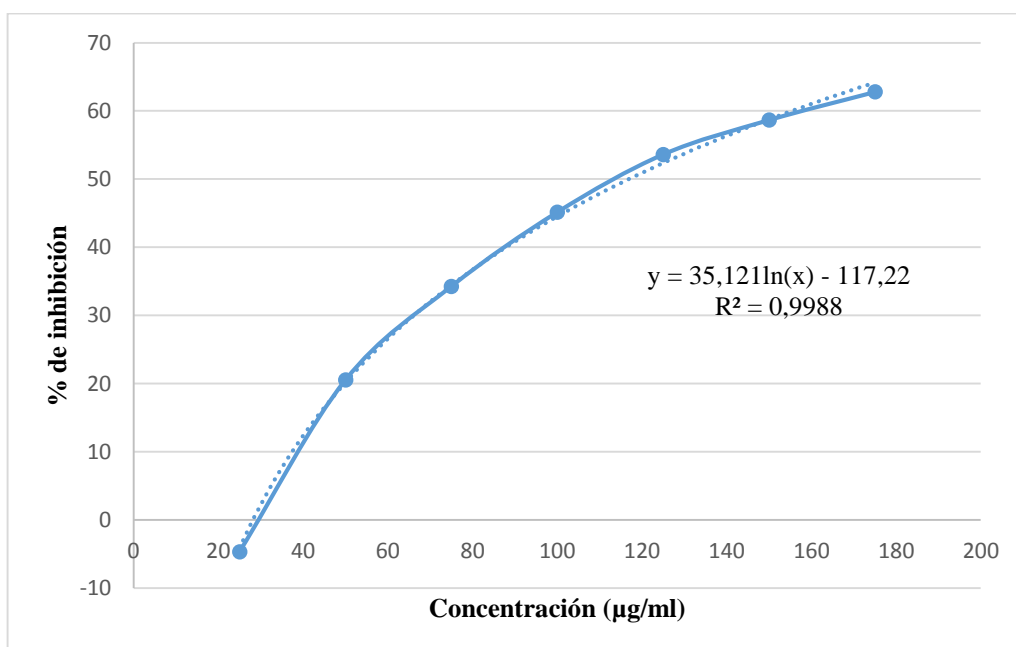


Curva de la tercera repetición del ensayo de inhibición de AChE del extracto alcaloidal

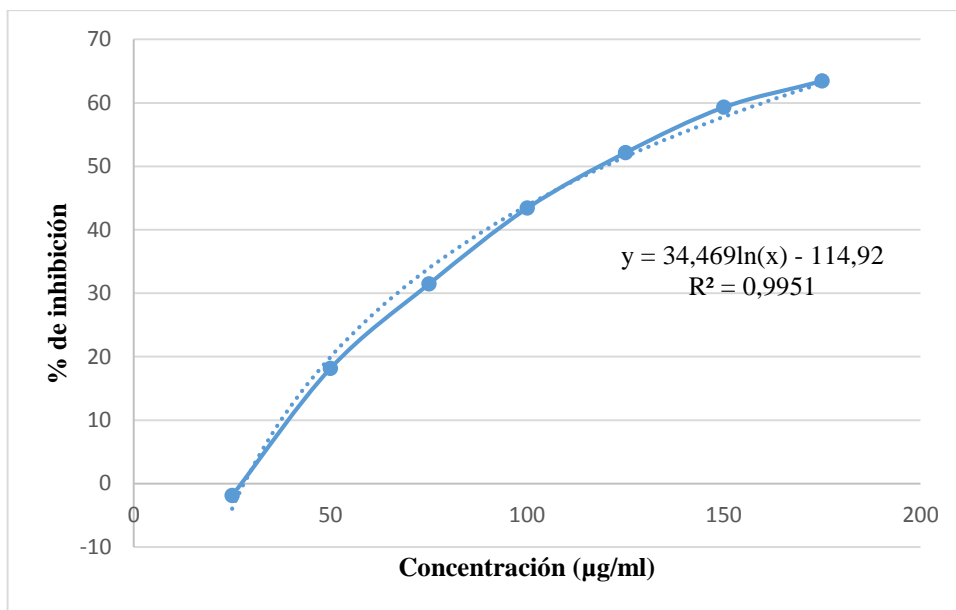
ANEXO G: CURVAS DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA SOBRE BUTIRILCOLINESTERASA (BUCHE) DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DE *Hippeastrum sp.*, TRES REPETICIONES.



Curva de la primera repetición del ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal



Curva de la segunda repetición del ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal



Curva de la tercera repetición del ensayo de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal

ANEXO H: CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS



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

MAE – DNB – CM – 2015 – 0054

COMPARECIENTES:

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

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

PRIMERA. ANTECEDENTES.-

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

SS / WR / RA / JP / ER / EN

ANEXO I: GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE *Hippeastrum* sp.

MINISTERIO DEL AMBIENTE



DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y FAUNA SILVESTRE Nro. 020-2018

Fecha de emisión: 27-09-2018 10H00 (Fecha y hora).

Fecha de movilización: 28-09-2018 Válido hasta: 29-09-2018 (Máx 24 horas)

La Dirección Provincial del Ambiente de Chimborazo, Autoriza a: Karen Lisseth Acosta León Cédula: 1003089016, para la movilización de especímenes de FLORA desde: Provincia de Chimborazo, hacia: Provincia de Pichincha, cantón Quito, sitio: Herbario Universidad Tecnológica Indoamérica de acuerdo al siguiente detalle:

Familia	Especie	Descripción del espécimen o parte constitutiva	Estado	Cantidad
Amaryllidaceae	<i>Hippeastrum</i> sp.	Hojas, flores, bulbo	En bolsas plásticas (muestras frescas)	3
				3 muestras

Observaciones:

Las muestras fueron recolectadas en la Provincia de Chimborazo, Cantón Riobamba. Ciudad de Riobamba, con Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos: MAE/DNB-2015-0054: "La Biodiversidad de *Amaryllidaceae* como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible".

Movilización:

Vehículo: Chevrolet Sail

Conductor: Xavier Hernan Lliguin

Color: Blanca

Cédula: 0602440133

Placa: HBB8133

Motivo de movilización:

Traslado a Unidad de manejo (x) Nombre: Herbario Universidad Tecnológica Indoamérica
Patente: 005-2018-FLO-DPAP-MA

Investigación (x) Contrato Marco: MAE-DNB-CM-2015-0054

Exhibición itinerante (no) Nombre:.....

Otros (no).....

Ministerio del Ambiente
DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL
AMBIENTE DE CHIMBORAZO

ING. MARCELO PINO CÁCERES

DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO

ENTREGO CONFORME

DIRECCIÓN PROVINCIAL
DEL AMBIENTE DE
CHIMBORAZO

VIDA SILVESTRE

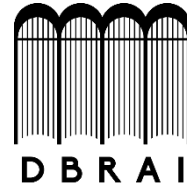


RESPONSABLE UNIDAD DE VIDA SILVESTRE

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO



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: 14 / 02 / 2020

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Brygith Verónica Lliguin Mejía
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímica Farmacéutica
f. Analista de bibliotecas responsable: