



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES DEL BULBO DE
Eucharis astrophiala”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTOR: THALIA LIZET HEREDIA MIRANDA

DIRECTORA: Lcda. KAREN LISSETH ACOSTA LEON, M. Sc.

Riobamba – Ecuador

2021

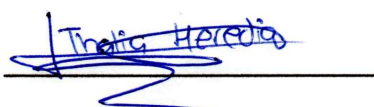
© 2021, **Thalia Lizet Heredia Miranda**

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, Thalia Lizet Heredia Miranda declaro que el presente trabajo de titulación 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, 12 de febrero de 2021



Thalia Lizet Heredia Miranda

060418695-7

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Trabajo Experimental, **IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES DEL BULBO DE *Eucharis astrophiala***, realizado por la señorita: **THALIA LIZET HEREDIA MIRANDA**, 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. Susana del Pilar Abdo López |  Firmado electrónicamente por: SUSANA DEL PILAR ABDO LOPEZ | 12/02/2021 |
| PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL | | |
| Lcda. Karen Lisseth Acosta León, M. Sc. |  Firmado electrónicamente por: KAREN LISSETH | 12/02/2021 |
| DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN | | |
| BQF. Diego Renato Vinueza Tapia, M. Sc. |  Firmado electrónicamente por: DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA | 12/02/2021 |
| MIEMBRO DEL TRIBUNAL | | |

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación se lo dedico a mis padres, Augusto Heredia y Mery Miranda, por ser un pilar fundamental en mi vida que, gracias a sus consejos y al apoyo incondicional que me han brindado todos estos años, he podido crecer como persona y mejorar día a día.

Una dedicación especial a mis abuelitos en el cielo, que han sido ejemplo de sacrificio y lucha constante para conseguir sus sueños, y por cuidarme y apoyarme para conseguir los míos.

A mis hermanos, Rodrigo y Danny Heredia, que me han protegido siempre y han estado para mí en todo momento, han sido un apoyo indispensable que me ha permitido superar cada obstáculo que se ha presentado en mi vida.

A mis amigos, que han sido muy importantes en mi vida, que me han brindado ánimos y fuerza para continuar con esta etapa de mi vida y estar cerca de poder alcanzarla.

THALIA

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a mis padres, abuelitos y hermanos, por ser el motor en mi vida, por cada palabra de aliento, por su apoyo y por enseñarme valores que me hicieron crecer como persona, y que de seguro me servirán para esta etapa profesional que está por comenzar.

A mis amigos, por cada experiencia vivida en esta etapa universitaria, por las risas y malas noches dedicadas a cada proyecto que nos permitió generar más conocimientos de los impartidos en clase; de igual manera agradecer a nuestros docentes que en cada nivel no proporcionaban conocimientos.

Un agradecimiento especial, a la Lic. Karen Acosta, que ha sido un apoyo fundamental en el desarrollo del presente trabajo de titulación, ya que supo guiarme en cada etapa del proceso, y aportando valiosos conocimientos sobre el tema.

De igual forma agradecer a la Dra. Nora Oleas que forma parte del grupo de investigación de la Universidad Tecnológica Indoamérica (Ecuador), y al grupo de investigación de la Universidad de Barcelona (España), que otorgaron una contribución fundamental en el trabajo de titulación.

Gracias por todo.

THALIA

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|------|
| ÍNDICE DE TABLAS | x |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xi |
| ÍNDICE DE ANEXOS..... | xii |
| RESUMEN | xiii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| OBJETIVOS | 4 |
| Objetivo General | 4 |
| Objetivos Específicos..... | 4 |
| CAPÍTULO I | |
| 1. MARCO TEÓRICO..... | 5 |
| 1.1 Familia Amaryllidaceae..... | 5 |
| 1.1.1 Alcaloides de Amaryllidaceae | 5 |
| 1.2 Género <i>Eucharis</i> | 6 |
| 1.2.1 Distribución geográfica | 7 |
| 1.2.2 Especies..... | 7 |
| 1.2.2.1 <i>Eucharis astrophiala</i> | 8 |
| 1.3 Enfermedad de Alzheimer | 8 |
| 1.3.1 Generalidades | 8 |
| 1.3.2 Hipótesis colinérgica | 9 |
| 1.3.3 Signos y síntomas | 9 |
| 1.3.4 Etapas de la Enfermedad de Alzheimer | 10 |
| 1.3.4.1 EA leve..... | 10 |
| 1.3.4.2 EA moderada..... | 10 |
| 1.3.4.3 EA grave..... | 10 |
| 1.3.5 Diagnóstico | 10 |
| 1.3.6 Tratamiento | 11 |
| 1.3.6.1 Inhibidores de colinesterasa..... | 11 |
| 1.3.6.2 Inhibidores de glutamato | 11 |
| 1.3.6.3 Combinación de medicamentos..... | 12 |
| 1.4 Enzimas Colinesterasas | 12 |

| | | |
|---------|---|----|
| 1.4.1 | Generalidades | 12 |
| 1.4.2 | Acetilcolinesterasa..... | 12 |
| 1.4.2.1 | Inhibidores de acetilcolinesterasa | 12 |
| 1.4.3 | Butirilcolinesterasa | 13 |
| 1.5 | Cáncer | 13 |
| 1.5.1 | Tumor..... | 13 |
| 1.6 | Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) | 13 |

CAPÍTULO II

| | | |
|-------|---|----|
| 2. | MARCO METODOLÓGICO | 14 |
| 2.1 | Localización del estudio | 14 |
| 2.2 | Recolección de la especie vegetal..... | 14 |
| 2.3 | Identificación botánica | 14 |
| 2.4 | Equipos, materiales y reactivos | 14 |
| 2.4.1 | Equipo | 14 |
| 2.4.2 | Materiales..... | 15 |
| 2.4.3 | Reactivos | 15 |
| 2.5 | Acondicionamiento de la especie vegetal | 16 |
| 2.6 | Preparación del extracto alcaloidal | 16 |
| 2.7 | Identificación de alcaloides del bulbo de <i>Eucharis astrophiala</i> por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas | 18 |

CAPÍTULO III

| | | |
|-------|--|----|
| 3. | ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 19 |
| 3.1 | Extracción de la fracción alcaloidal de <i>Eucharis astrophiala</i> | 19 |
| 3.2 | Identificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas los alcaloides que contiene el bulbo del extracto alcaloidal de <i>Eucharis astrophiala</i> | 20 |
| 3.3 | Determinación del potencial farmacológico de los alcaloides presentes en el extracto alcaloidal del bulbo de <i>Eucharis astrophiala</i> | 24 |
| 3.3.1 | Inhibidores de enzimas colinesterasas | 24 |
| 3.3.2 | Actividad antitumoral | 25 |
| 3.3.3 | Propiedad antimicrobiana | 26 |
| 3.3.4 | Actividad antiinflamatoria | 26 |
| 3.3.5 | Otras actividades | 27 |

| | |
|-----------------------|----|
| CONCLUSIONES | 28 |
| RECOMENDACIONES | 29 |
| GLOSARIO | |
| BIBLIOGRAFÍA | |
| ANEXOS | |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1-2: Equipos necesarios para la investigación de acuerdo al procedimiento | 14 |
| Tabla 2-2: Materiales necesarios para la investigación de acuerdo al procedimiento | 15 |
| Tabla 3-2: Reactivos necesarios para la investigación | 15 |
| Tabla 1-3: Porcentaje de rendimiento de extracción en <i>Eucharis astrophiala</i> | 19 |
| Tabla 2-3: Alcaloides presentes en el bulbo de <i>Eucharis astrophiala</i> , obtenidos por CG-EM. | 20 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1-1. Tipos de alcaloides de Amaryllidaceae..... | 6 |
| Figura 2-1. Distribución general de Eucharis, Caliphuria y Urceolina en Centro y Sudamérica | 7 |
| Figura 3-1. Distribución geográfica de Eucharis astrophiala en Ecuador | 8 |
| Figura 1-2. Esquema de la extracción de alcaloides del bulbo de Eucharis astrophiala..... | 17 |
| Figura 1-3. Estructura de los alcaloides identificados por CG-EM en el bulbo de Eucharis astrophiala..... | 21 |
| Figura 2-3. a) Esqueleto de tipo crinina – b) Estructura del alcaloide 3-O-Metil-macowina..... | 21 |
| Figura 3-3. Biosíntesis de galantamina | 22 |
| Figura 4-3. Estructura de 11-hidroxivitatina (7) y hamaina (8) | 23 |

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Especie *Eucharis astrophiala*

ANEXO B: Acondicionamiento de la especie vegetal

ANEXO C: Obtención del extracto crudo de *Eucharis astrophiala*

ANEXO D: Extracción de los alcaloides de *Eucharis astrophiala*

Anexo E: Contrato marco “Estudio de la biodiversidad en el Ecuador, ecología, conservación y su potencial uso sostenible”

RESUMEN

El trabajo de investigación tuvo como objetivo principal identificar los alcaloides que están presentes en el bulbo de *Eucahris astrophiala*, para ello, en primer lugar, se obtuvo el extracto alcaloidal de la especie vegetal usando solventes orgánicos y cambios de pH, una vez que la muestra vegetal paso por el proceso de secado y triturado. Para la identificación de los alcaloides se utilizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, y una vez identificados, mediante bibliografía se determinó el potencial farmacológico de los alcaloides encontrados. El extracto alcaloidal de *Eucharis astrophiala* tuvo un porcentaje de rendimiento de extracción de 0,918%, que es mayor a otras especies de Amarylliaceae; los alcaloides obtenidos fueron galantamina, narwedina, hemantamina, 11-hidroxitatina/hamaina, licorina, pseudolicorina y un alcaloide desconocido que podría tratarse de 3-O-metilmacowina. El alcaloide en mayor proporción fue la licorina (47,225%), seguido de hemantamina (36,910%), galantamina (10,551%), 11-hidroxitatina/hamaina (3,027%), pseudolicorina (0,853%), narwedina (0,740) y 3-O-metilmacowina (0,694%). Se determinó bibliográficamente que estos alcaloides presentan actividades: inhibitoria frente a enzimas colinesterasas, antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatoria, entre otras. Por último, se recomienda realizar un estudio sobre la inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, puesto que en la presente investigación se encontraron alcaloides con propiedad inhibitoria de enzimas colinesterasas como la galantamina y licorina.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FITOQUÍMICA>, <ALCALOIDES>, <*Eucharis astrophiala*>, <EXTRACTO ALCALOIDAL>, <POTENCIAL FARMACOLÓGICO>, <ENZIMAS COLINESTERASAS>, <ANTITUMORAL>, <ANTIMICROBIANA>, <ANTIINFLAMATORIA>



Firmado electrónicamente por:
**LUIS ALBERTO
CAMINOS
VARGAS**



0643-DBRAI-UPT-2021

ABSTRACT

The main objective of the research work was to identify the alkaloids that are present in the *Eucharis astrophiala* bulb, for this, in the first place, the alkaloidal extract of the plant species was obtained using organic solvents and pH changes, once the vegetable sample went through the drying and crushing process. For the identification of the alkaloids, gas chromatography coupled to mass spectrometry was used, and once identified, the pharmacological potential of the alkaloids found was determined through bibliography. The alkaloidal extract of *Eucharis astrophiala* had an extraction yield percentage of 0.918%, which is higher than other Amarylliaceae species; the alkaloids obtained were galantamine, narwedine, hemantamine, 11-hydroxyvitamin / hamaine, liquorine, pseudolichorin and an unknown alkaloid that could be 3-O-methylmacowine. The alkaloid in the highest proportion was liquorine (47.225%), followed by hemantamine (36.910%), galantamine (10.551%), 11-hydroxyvitamin / hamaine (3.027%), pseudolichorin (0.853%), narwedine (0.740) and 3- O-methylmacowin (0.694%). It was bibliographically determined that these alkaloids have activities: inhibitory against cholinesterase enzymes, antitumor, antimicrobial, anti-inflammatory, among others. Finally, it is recommended to carry out a study on the inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, since in the present investigation alkaloids with inhibitory properties of cholinesterase enzymes such as galantamine and liquorine were found.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <PHYTOCHEMISTRY>, <ALKALOIDS>, <*Eucharis astrophiala*>, <ALKALOID EXTRACT>, <PHARMACOLOGICAL POTENTIAL>, <CHOLINESTERASE ENZYMES>, <ANTITUMOR>, <ANTIMICROBIAL>, <ANTI-INFLAMMATORY>

INTRODUCCIÓN

La familia Amaryllidaceae consta de 1100 especies de 85 géneros diferentes distribuidos por todo el mundo, son plantas ornamentales que también se pueden usar como hierbas medicinales; presentan un valor medicinal debido que contiene alcaloides derivados de tirosina, lo cual se ha logrado determinar por medio de las investigaciones a las que se han sometido estas especies vegetales (Ding et al., 2017, p. 53).

Los alcaloides de esta familia de plantas son de gran interés, debido a que se ha demostrado que tienen actividades farmacológicas significativas como inhibidores de enzimas colinesterasas relacionadas con demencias como la EA, antitumorales, antibacterianas, antifúngicos, antivirales, antipalúdicos, antiinflamatorios, entre otras actividades (Ding et al., 2017, p. 54).

Las demencias son enfermedades en ascenso, afecta a 50 millones de personas alrededor del mundo, con un porcentaje de 60-70 % correspondiente a la enfermedad de Alzheimer (EA). La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que cada año se incrementan 10 millones de nuevos casos, además se habla de una aproximación de 82 millones de personas que presenten la enfermedad en 2030 y 152 millones en 2050 (OMS, 2019).

Según las estadísticas de Alzheimer's Association, 1 de cada 3 adultos mayores mueren con esta enfermedad neurodegenerativa, debido a la prevalencia que presenta la misma en la sociedad y la dificultad de diagnosticarla tempranamente (Alzheimer's Association, 2018a).

La EA es un trastorno neurodegenerativo que provoca la muerte de las células cerebrales, dando como resultado la pérdida de las capacidades cognitivas de las personas que la padecen; es decir, produce la pérdida de la memoria de forma gradual, además de la incapacidad de retener nueva información (Romano et al., 2007, p. 9).

Existen hipótesis que tratan de explicar cómo se origina la enfermedad, entre estas hipótesis tenemos la colinérgica, en la que se estipula que la enfermedad se desarrolla al existir una disminución de la producción de acetilcolina o por el aumento de acetilcolinesterasa (AChE), enzima que degrada a la acetilcolina, disminuyendo su concentración a nivel cerebral (Singh et al., 2013, p. 166).

La AChE hidroliza la acetilcolina, neurotransmisor asociado a procesos cognitivos y a la memoria en el Sistema Nervioso Central (SNC), y a la contracción de músculos esqueléticos. Por lo tanto, la inhibición de la AChE se traduciría en una prolongación del estímulo nervioso de la acetilcolina, al

restaurar sus niveles en el espacio sináptico. Los pacientes con EA sufren de una fuerte reducción de la función colinérgica y los tratamientos se han focalizado en los inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE). El alcaloide galantamina es un AChE, de actividad prolongada, selectivo, reversible y competitivo (Ortiz et al., 2013, p. 19).

La galantamina se biosintetiza de algunas especies vegetales de la familia de Amaryllidaceae, principio activo aprobado en el año 2001 por la Food Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer (National Institute of Health, 2018).

En 1877 se aisló licorina de *Narcissus pseudonarcissus*, los alcaloides aislados presentaban diversas estructuras con actividades biológicas, como la actividad inhibitoria frente a AChE. A partir de estos estudios se han aislado alcaloides de diferentes órganos de este tipo de plantas y en diferentes fases vegetativas, pertenecientes a 36 diferentes géneros (Ding et al., 2017, pp. 53 - 54).

En 1992 se empezó a hablar del alcaloide galantamina aislado de una especie vegetal de la familia Amaryllidaceae, y cómo este compuesto sería viable para el tratamiento de la EA, puesto que la tacrina que era el fármaco candidato a ser usado, tenía poca fiabilidad. Estos fármacos presentan el mismo mecanismo bioquímico sobre la EA, lo que potencia el uso de la galantamina sobre la tacrina, es la farmacocinética, vida media y biodisponibilidad mayor del fármaco, además de presentar menor cantidad de efectos adversos en comparación con la tacrina (Bergoñón, 1994, p. 163).

Los estudios realizados sobre plantas que pertenecen a esta familia, han dado resultados favorables en cuanto a la inhibición de enzimas colinesterasas, a más del alcaloide galantamina se ha encontrado el alcaloide sanguinina. Éste último presenta una actividad mayor *in vitro* que la galantamina, pero debido a la abundancia natural de este alcaloide no se ha podido desarrollar como medicamento (López et al., 2002, p. 2522); además que, galantamina muestra una mayor permeabilidad para atravesar la barrera hematoencefálica (Bores et al., 1996, p. 737).

El Ecuador es un país rico en especies vegetales, muchas de las cuales no han sido investigadas. Por ello, en esta investigación se realizará el estudio de la especie *Eucharis astrophiala* perteneciente a la familia Amaryllidaceae, con el fin de determinar los alcaloides de la especie mencionada y su potencial farmacológico.

En los últimos años, en el Ecuador se ha estudiado la especie *Eucharis formosa*, que se encuentra mayoritariamente en la cuenca occidental del Ecuador, estudio en el que se determinó su composición alcaloidal y la actividad inhibitoria frente a AChE y BuChE. En dicho estudio, se obtuvo como alcaloide mayoritario la licorina, con actividad inhibitoria alta frente a AChE, y actividad media para BuChE (Chamorro, 2019).

Eucharis astrophiala, es una especie poco estudiada, que simplemente cuenta con estudios botánicos, por lo que se desconoce si presenta o no grupos de metabolitos, como alcaloides. Es importante conocer que alcaloides se encuentran en el bulbo, y de acuerdo a la composición alcaloidal determinar el potencial farmacéutico de la especie, y para un posterior estudio en el que se compruebe si presenta actividad inhibitoria *in vitro* de AChE y BuChE.

La investigación científica es de gran importancia en la sociedad, con el paso de los años los métodos y temas de investigación han ido mejorando, respondiendo a nuevas interrogantes y tratando de dar solución a nuevos y antiguos problemas. Los estudios experimentales, son de gran impacto a nivel de salud e industria farmacéutica; en el caso de este estudio, permite conocer en que enfermedades sería de mayor impacto en la población, como en el caso de la EA.

La presente investigación busca extraer e identificar los alcaloides que contiene el bulbo de *Eucharis astrophiala*, además de determinar bibliográficamente el potencial farmacológico de los compuestos identificados. Así, este estudio pueda ser la base para futuras investigaciones, en las que se pueda determinar si el extracto alcaloidal presenta actividad inhibitoria frente a enzimas colinesterasas.

El estudio está vinculado al proyecto de investigación científica “La Biodiversidad Iberoamericana como Fuente de Recursos Naturales para su Explotación Sostenible - BIFRENES”, del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), por lo cual se contará con la colaboración de la Universidad Tecnológica Indoamérica (Ecuador) y la Universidad de Barcelona (España).

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar los alcaloides presentes en el bulbo de *Eucharis astrophiala*.

Objetivos Específicos

- Extraer la fracción alcaloidal del bulbo de *Eucharis astrophiala* mediante el uso de solventes orgánicos y cambios de pH.
- Identificar los alcaloides del bulbo de *Eucharis astrophiala* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Determinar el potencial farmacológico de los alcaloides presentes en el bulbo de *Eucharis astrophiala* mediante búsqueda bibliográfica.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Familia Amaryllidaceae

Amaryllidaceae es una familia de plantas monocotiledóneas que se conocen por su atractivo y se les da un uso ornamental, son herbáceas, perennes, con flores y la mayoría presentan bulbos. Dentro de esta familia, aproximadamente existen 85 géneros y 1100 especies, que se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo en regiones tropicales y templadas, en particular en África, América del Sur, en la región andina y el mediterráneo (Fan-Chiang et al., 2016, p. 5640).

1.1.1 *Alcaloides de Amaryllidaceae*

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 (Paulo De Andrade, 2014, pp. 7-8).

Existen un gran número de estructuras de los alcaloides de Amaryllidaceae que de acuerdo al esqueleto de su estructura se han podido clasificar en 9 tipos, y los alcaloides representativos de cada uno son: norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, hemanthamina, narciclasina, tazettina, montanina y galantamina (Bastida et al., 2011, p. 66).

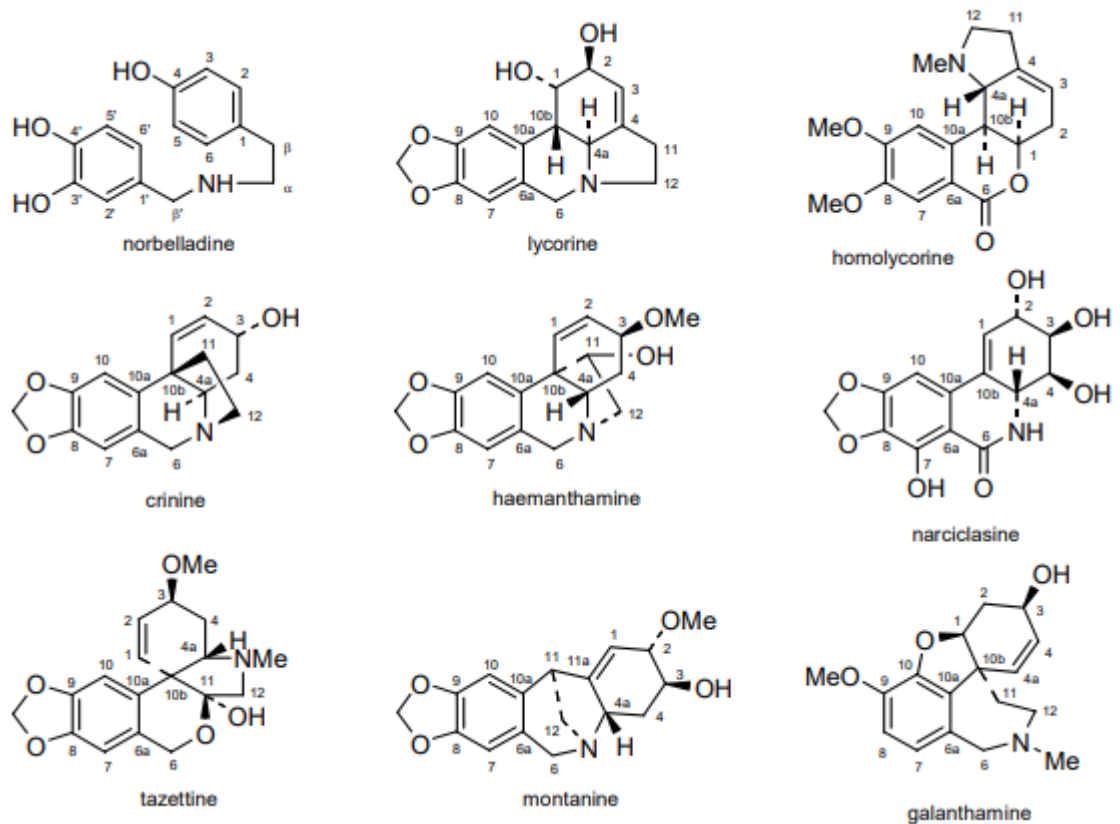


Figura 1-1. Tipos de alcaloides de Amaryllidaceae

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

1.2 Género *Eucharis*

Eucharis género que pertenece a la familia Amaryllidaceae, mayormente conocidos como lirios amazónicos, grupo monofilético formada por 17 especies de bulbos. Este género de plantas presenta las siguientes características:

- Hojas pecioladas con estriación cuticular distintiva, de 20-55 cm y 10-20 cm, de largo y ancho respectivamente.
- Semilla turgente con testa lustrosa de color negro.
- Bulbos globosos o pseudoglobosos compuesto por escamas concéntricas y modificadas, de crecimiento simpodial, tamaño de 2 a 6 cm de diámetro.
- Pseudotallo permanece debajo de la superficie, por lo que su longitud depende más de la profundidad del bulbo en el sustrato.
- Flores blancas, actinomorfas, hermafroditas y muy vistosas, de 3 a 7 cm de largo (Meerow, 1989, pp. 136-146).

1.2.1 Distribución geográfica

Las diferentes especies de *Eucharis* se encuentran distribuidas desde Guatemala hasta Bolivia, principalmente su centro de distribución es la cuenca occidental del Amazonas, por esta razón son conocidas como lirios amazónicos, en los que se incluyen Napo, Pastaza y Huallaga, y en las laderas inferiores adyacentes de la cordillera oriental de los Andes. Estas especies crecen en bosques de 50 a 1800 m de altitud en suelos altamente fértiles (Meerow, 1989, pp. 136-137).



Figura 2-1. Distribución general de *Eucharis*, *Caliphuria* y *Urceolina* en Centro y Sudamérica

Fuente: (Meerow, 1989, p. 160).

1.2.2 Especies

Este género está formado por 17 especies distintas, distribuidas mayoritariamente en el Amazonas, en Ecuador se encuentran 5 de estas especies: *Eucharis amazónica linden*, *Eucharis astrophiala*, *Eucharis candida*, *Eucharis grandiflora* y *Eucharis moorei* (Meerow, 1989, pp. 174-209). En 2015 se habla de una nueva especie descubierta en Ecuador, *Eucharis ruthiana*, que se relaciona a *E. moorei*,

con algunas diferencias en cuanto a las hojas, pétalos, número de flores, olor, entre otras características (Meerow et al., 2015, p. 8).

1.2.2.1 *Eucharis astrophiala*

Planta endémica de Ecuador, con un rango de distribución de 400 km² en bosque litoral húmedo hasta bosque andino bajo de 0 a 1500 m, no existe registros dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) es una especie en peligro de extinción, se encuentra en la zona más baja de la Reserva Ecológica Los Ilinizas, ha podido ser recolectada de la Reserva Privada ENDESA y de la Reserva Río Canandé. Está considerada como especie en Peligro por una extensión de presencia menor a 5000 km², se desconoce las amenazas específicas a las que está expuesta la especie (León et al., 2011, p. 88).



Figura 3-1. Distribución geográfica de *Eucharis astrophiala* en Ecuador

Fuente: (León Yáñez et al., 2011, p. 88).

1.3 Enfermedad de Alzheimer

1.3.1 Generalidades

La EA se conoce como un tipo de demencia que provoca el deterioro de la capacidad cognitiva de las personas que la padecen. Es un trastorno neurológico, caracterizado por la pérdida gradual de la memoria y la capacidad de retener nueva información, trastornos de conducta y un déficit para poder cumplir con sus actividades diarias (Enamorados et al., 2017, pp. 7-16).

Es una demencia progresiva, que como síntoma principal es la pérdida de memoria, conforme la enfermedad avanza el paciente empeora progresivamente, mostrando problemas perceptivos, del lenguaje y emocionales (Romano et al., 2007, pp. 9-12).

La etiología de la EA en la actualidad no se ha logrado definir con claridad, debido a que se considera que la enfermedad se puede presentar a causa de múltiples factores, siendo la edad el factor principal de riesgo que es común en los individuos que presentan la EA (Aranda y Calabria, 2019, p. 20).

Una manera en la que se suele clasificar a la EA es de acuerdo a la edad del paciente, es decir, a qué edad aparecen los primeros síntomas de la enfermedad, en base a este parámetro se clasifica en:

- Al presentarse antes de los 65 años, se denomina EA de inicio precoz.
- Al presentarse después de los 65 años, se conoce como EA de inicio tardío.

En ambos casos, la EA se puede dar de forma hereditaria o esporádica, hereditaria cuando existen antecedentes familiares de la enfermedad, y esporádica cuando el individuo no presenta antecedentes familiares y se desconoce su origen (Romano et al., 2007, pp. 9-10).

1.3.2 Hipótesis colinérgica

En 1976, Peter Davis descubrió que existe una correlación entre los síntomas clínicos de la EA y bajos niveles de colina en el cerebro de las personas que padecían la enfermedad, es decir, la pérdida de la memoria se asocia a la degeneración que sufren las neuronas por una deficiencia del neurotransmisor, acetilcolina; que puede deberse a la reducción de la producción de acetilcolina o por un aumento en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (Singh et al., 2013, p. 166).

Los niveles del neurotransmisor disminuidos provocan un deterioro de la neurotransmisión colinérgica que como resultado produce la pérdida de las capacidades intelectuales. La hipótesis implica que al darse un aumento colinérgico a nivel cerebral podría mejorar la cognición en la EA, es decir tratar los síntomas con inhibidores de colinesterasas (Singh et al., 2013, p. 166).

1.3.3 Signos y síntomas

El síntoma principal de la enfermedad es la pérdida de la memoria, y uno de los signos tempranos que presentan las personas que padecen la enfermedad, suele ser la dificultad de recordar eventos o conversaciones recientes. Conforme avance la enfermedad, se manifiestan más síntomas y la pérdida de memoria empeora (Mayo Clinic, 2019).

Los cambios cerebrales que ocurren en esta enfermedad, se dan sobre: la memoria, el pensamiento y el razonamiento, disminución de la capacidad de tomar decisiones, cambios en la personalidad y conducta, y la pérdida de realizar actividades cotidianas (Mayo Clinic, 2019).

1.3.4 Etapas de la Enfermedad de Alzheimer

La EA avanza en tres etapas una leve, moderada y grave; y debido a que la enfermedad afecta a las personas de diferente forma, pueden atravesar estas etapas y los síntomas de distintas maneras.

1.3.4.1 EA leve

Es la etapa inicial de la enfermedad donde la persona aún puede desenvolverse por su cuenta; y se empiezan a observar los primeros síntomas de la enfermedad, en la que el individuo sufre breves episodios de pérdida de memoria. En esta etapa los familiares y personas cercanas al individuo, son los primeros en notar cambios en su memoria, como la dificultad que tiene en recordar palabras, lugares, entre otras cosas (Alzheimer's Association, 2018b).

1.3.4.2 EA moderada

Es la etapa más prolongada de la enfermedad y dura algunos años, el individuo ya no puede realizar tareas solo y requiere de un nivel mayor de atención por parte de su familia o personas capacitadas para cuidarlo. En esta etapa el daño que sufren las células nerviosas del cerebro dificulta que el individuo exprese pensamientos, lo que provoca su frustración, enojo y cambios en su personalidad y el comportamiento (Alzheimer's Association, 2018b).

1.3.4.3 EA grave

En esta etapa el individuo pierde totalmente la capacidad para desenvolverse en su entorno, como tener una conversación y controlar sus movimientos, ya no es capaz de realizar sus tareas diarias sin ayuda, por lo que requiere de atención todo el tiempo. La memoria y las habilidades cognitivas del individuo empeoran cada vez más con el paso del tiempo y se vuelven más vulnerables (Alzheimer's Association, 2018b).

1.3.5 Diagnóstico

Para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer no existe una prueba específica por lo que, para poder diagnosticarla, hay que obtener una evaluación física, psiquiátrica y neurológica completa; se realizan los siguientes exámenes:

- Examen médico detallado
- Pruebas neuropsicológicas
- Pruebas de sangre completa

- Electrocardiograma
- Electroencefalograma
- Tomografía computarizada

Para confirmar este diagnóstico, necesariamente se debe realizar el examen de tejido de cerebro, que se realiza post mortem (Romano et al., 2007, pp. 9.12).

1.3.6 Tratamiento

La EA no tiene cura simplemente se tratan los síntomas, por medio de tratamiento farmacológico y no farmacológico, este último consiste en cambiar su estilo de vida como aumentar la actividad física, que su alimentación sea la adecuada y más saludable. El tratamiento farmacológico tiene varios puntos de acción, están los inhibidores de colinesterasa, inhibidores de glutamato y una combinación de los medicamentos antes mencionados (BrightFocus Foundation, 2019).

1.3.6.1 Inhibidores de colinesterasa

Estos medicamentos regulan y controlan los síntomas de la enfermedad, retardan la degradación metabólica de la acetilcolina además de proporcionar una fuente adicional de este compuesto, debido a que es el encargado de la comunicación entre las neuronas, son efectivos en pacientes en la fase leve y moderada (BrightFocus Foundation, 2019). Los medicamentos que se encuentran en este grupo son:

- Galantamina y Rivastigmina, aprobadas en 2001 y 2000 por la FDA, previene la descomposición de acetilcolina y butirilcolina.
- Donepezil aprobada en 1996 por la FDA para la EA leve y EA moderada, y en el 2006 aprobada para tratar los síntomas graves de la EA.
- Tacrina aprobada en 1993 por la FDA para la EA leve y EA moderada, aunque esté disponible no se comercializa por los graves efectos secundarios que produce.

1.3.6.2 Inhibidores de glutamato

Estos medicamentos regulan al glutamato para que no destruyan las células del cerebro, debido a que este químico se libera en grandes cantidades por EA, en condiciones normales el glutamato se involucra en el aprendizaje y la memoria, pero al liberarse en exceso se adhiere a receptores N-metil-D-aspartato, produciendo una aceleración en el daño celular. La memantina es el único medicamento aprobado por la FDA en el 2003 para la EA moderada y EA grave (BrightFocus Foundation, 2019).

1.3.6.3 Combinación de medicamentos

Existe un medicamento aprobado por la FDA en el año 2014, que combina un inhibidor de colinesterasa y un inhibidor de glutamato, y es eficaz en la etapa moderada y grave de la EA. Namzaric es una combinación de memantina y donepezil, las cápsulas del medicamento pueden abrirse fácilmente para rociar en los alimentos de pacientes que tienen dificultad para tragar (BrightFocus Foundation, 2019).

1.4 Enzimas Colinesterasas

1.4.1 Generalidades

Las enzimas colinesterasas, son una familia de enzimas definidas como un grupo de esterasas de serina, que hidrolizan ésteres de colina, como la acetilcolina. Se encuentran en organismos unicelulares, plantas, invertebrados y vertebrados (Enamorados et al., 2017, p. 8).

1.4.2 Acetilcolinesterasa

La enzima acetilcolinesterasa (AChE), proteína tetramérica, tiene como centro activo un grupo hidroxilo que realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonilo de la acetilcolina, dando como producto la acetilación de la serina y la liberación del acetato y la colina. Es la enzima responsable de regular la transición del impulso nervioso en la sinapsis colinérgica, puesto que elimina el neurotransmisor (acetilcolina) terminando con el impulso nervioso (Enamorados et al., 2017, p. 8).

La acetilcolina, es un neurotransmisor del sistema nervioso central y periférico, que se involucra en la mediación motora, funciones autonómicas y en el mecanismo de eventos cognitivos como la memoria, por la degradación de este neurotransmisor se suelen presentar diversas enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer (Enamorados et al., 2017, p. 9).

1.4.2.1 Inhibidores de acetilcolinesterasa

Los inhibidores de acetilcolinesterasa se usan para el tratamiento sintomatológico de la enfermedad de Alzheimer, puesto que contrarrestan el deterioro de la actividad colinérgica en el cerebro, estabilizando la cantidad de acetilcolina en la sinapsis de la corteza cerebral. Al inhibir la acetilcolinesterasa, se va a dar una regulación del sistema permitiendo que se dé el impulso nervioso. Los inhibidores aprobados por la FDA que se utilizan en el tratamiento de la enfermedad son: galantamina, donepezilo, rivastigmina y tacrina (Enamorados et al., 2017, pp. 11-12).

1.4.3 Butirilcolinesterasa

La butirilcolinesterasa (BuChE), es un tipo de colinesterasa plasmática, o también conocida como pseudocolinesterasa, que también hidroliza la acetilcolina, aunque no de forma específica como en el caso de la acetilcolinesterasa (Jiménez Caballero, 2011, pp. 245-247). La BuChE es más abundante en áreas que afectan de forma temprana en las demencias como la límbica, por este motivo son de gran utilidad medicamentos que tienen una acción sobre ambas enzimas. Esta enzima evita que se forme la placa amiloide o que las placas inertes no se transformen en dañinas, en la enfermedad de Alzheimer (Alpízar y Morales, 2003).

1.5 Cáncer

Constituye enfermedades que se originan cuando se da una proliferación desmedida de células, excediendo su cantidad normal en cualquier parte del cuerpo, lo que provoca un funcionamiento incorrecto del organismo. Existen diferentes tipos de cáncer, esto va a depender del lugar en el que se origine esta anomalía (American Cancer Society, 2019).

1.5.1 Tumor

Las células normalmente se dividen y mueren en un tiempo determinado, en este caso, las células cancerosas o tumorales no mueren y continúan dividiéndose sin límite alguno, al darse una multiplicación excesiva de células anormales, estas pueden formar masas, conocidos como tumores, que pueden destruir y sustituir tejidos normales en su proceso de crecimiento. Estos tumores pueden ser malignos o benignos (Puente y Velasco, 2019).

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

La cromatografía de gases es un método analítico que permite identificar por separado los compuestos que se encuentran en una muestra de alta complejidad, una vez que estos compuestos son separados pueden ser cuantificados, el fundamento del método es identificar cada compuesto de acuerdo a el tiempo en el que son retenidos en la columna cromatográfica (Gutiérrez y Droguet, 2002, p. 36).

La espectrometría de masas puede identificar casi sin errores componentes puros, pero para poder identificarlos deben estar previamente separados, por esta razón, se usa un equipo de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, para que en primer lugar el cromatógrafo separe los componentes de la mezcla y luego puedan ser identificados por el espectrómetro de masas (Gutiérrez y Droguet, 2002, pp. 36-38).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Localización del estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH). La Universidad de Barcelona (España) colaboró con la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación de alcaloides.

2.2 Recolección de la especie vegetal

El bulbo de *Eucharis astrophiala* fue recolectado a una altura de 520 m en la provincia de Esmeraldas.

2.3 Identificación botánica

La identificación de *Eucharis astrophiala* la realizó la Doctora Nora Oleas, botánica responsable del Herbario de la Universidad Tecnológica Indoamérica localizada en la ciudad de Quito-Ecuador.

2.4 Equipos, materiales y reactivos

2.4.1 Equipo

Tabla 1-2: Equipos necesarios para la investigación de acuerdo al procedimiento

| Equipo | Procedimiento |
|------------------------------------|--|
| Estufa de secado Redline by Binder | Secado del bulbo de <i>Eucharis astrophiala</i> Reducción del volumen de los alcaloides |
| Molino Arthur H. Thomas C.O. | Reducción del tamaño de la especie vegetal |
| Balanza analítica HDM | Pesaje |
| Sonicador | Obtención del extracto crudo |
| Rotavapor Heating Bath B-300 Base | Concentración de extractos |
| Sorbona | Obtención del extracto alcaloidal |
| Baño de ultrasonido Branson 3510 | Desplazamiento de reacciones en homogeneidad |
| Refrigerador | Conservación de reactivos |
| pHmetro Fisher Scientific | Regulación del pH para extraer alcaloides |

| | |
|---|------------------------------|
| Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM) | Identificación de alcaloides |
|---|------------------------------|

Realizado por: Heredia, Thalia, 2020.

2.4.2 Materiales

Tabla 2-2: Materiales necesarios para la investigación de acuerdo al procedimiento

| Materiales | Procedimiento |
|--------------------------------------|--------------------------|
| Frasco de vidrio ámbar 500 – 1000 ml | Preparación de reactivos |
| Pipeta graduada 1 – 5 ml | |
| Pipeta volumétrica 10 ml | |
| Balón de aforo 10 – 100 ml | |
| Probeta 100 ml | |
| Espátula | |
| Frasco de vidrio ámbar 1000 ml | Extracción de alcaloides |
| Frasco de vidrio tipo vial 10 ml | |
| Probeta 100 ml | |
| Embudo simple | |
| Embudo de separación 500 ml | |
| Trípode | |
| Balón esmerilado 250 – 1000 ml | |
| Vaso de precipitación 250 – 500 ml | |
| Desecador | |
| Papel filtro | |
| Papel aluminio | |

Realizado por: Heredia, Thalia, 2020.

2.4.3 Reactivos

Tabla 3-2: Reactivos necesarios para la investigación

| Reactivo | Procedimiento |
|----------------------------|--|
| Agua destilada | Preparación de reactivos Lavado de materiales |
| Metanol CH ₃ OH | Obtención del extracto crudo |

| | |
|---|-------------------------------------|
| Ácido sulfúrico 2% H ₂ SO ₄ | Extracción de alcaloides |
| Éter etílico (C ₂ H ₅) ₂ O | |
| Acetato de etilo C ₄ H ₈ O ₂ | |
| Hidróxido de amonio 25% NH ₄ OH | |
| Sulfato de sodio anhidro Na ₂ SO ₄ | |
| Goma arábiga | |
| <u>Metanol</u> | <u>Identificación de alcaloides</u> |

Realizado por: Heredia, Thalia, 2020.

2.5 Acondicionamiento de la especie vegetal

Se utilizó el bulbo de la especie vegetal *Eucharis astrophiala*, que fue limpiado y cortado en pequeños trozos aproximadamente de 2 cm, con la finalidad que el secado sea total y más rápido, posterior a eso se colocó los trozos de la especie vegetal en la estufa de secado Redline by Binder, con temperatura de 50°C durante 48 horas. Una vez concluido el tiempo, la especie vegetal seca fue triturada en el molino de cuchillas giratorias de la marca H. Thomas C.O., que redujo el tamaño de la muestra (Acosta et al., 2014, p. 179).

2.6 Preparación del extracto alcaloidal

Una vez que se cumplió con el acondicionamiento de la especie vegetal, se pesaron 2,016 g para macerar con 80 ml de metanol, y se dejó en reposo durante 72 horas, con baños de ultrasonido de 1 o 2 horas. Después de concluido el tiempo de maceración, se filtró y evaporó el solvente a presión reducida por medio del rotavapor a 50°C, obteniendo el extracto crudo (Acosta et al., 2014, p. 179).

El extracto bruto fue sometido a acidificación con H₂SO₄ al 2%, para limpiar el extracto se utilizó éter etílico, y se separaron dos fases, la fase orgánica, que es la fase que retiene los alcaloides, y la fase acuosa ácida, que posteriormente fue basificada con NH₄OH al 25% hasta un pH aproximado de 10 (Acosta et al., 2014, p. 179).

Para extraer los alcaloides, se utilizó acetato de etilo, obteniéndose dos fases, la fase acuosa alcalina y la fase orgánica, la última fase es la que contiene los alcaloides. Al final de la extracción fue necesario usar goma arábiga y sulfato de sodio anhidro, para eliminar los restantes de agua, posteriormente se filtró y se llevó al rotavapor para evaporar el solvente, y obtener el extracto purificado (Acosta et al., 2014, p. 179), como se detalla en la siguiente figura:

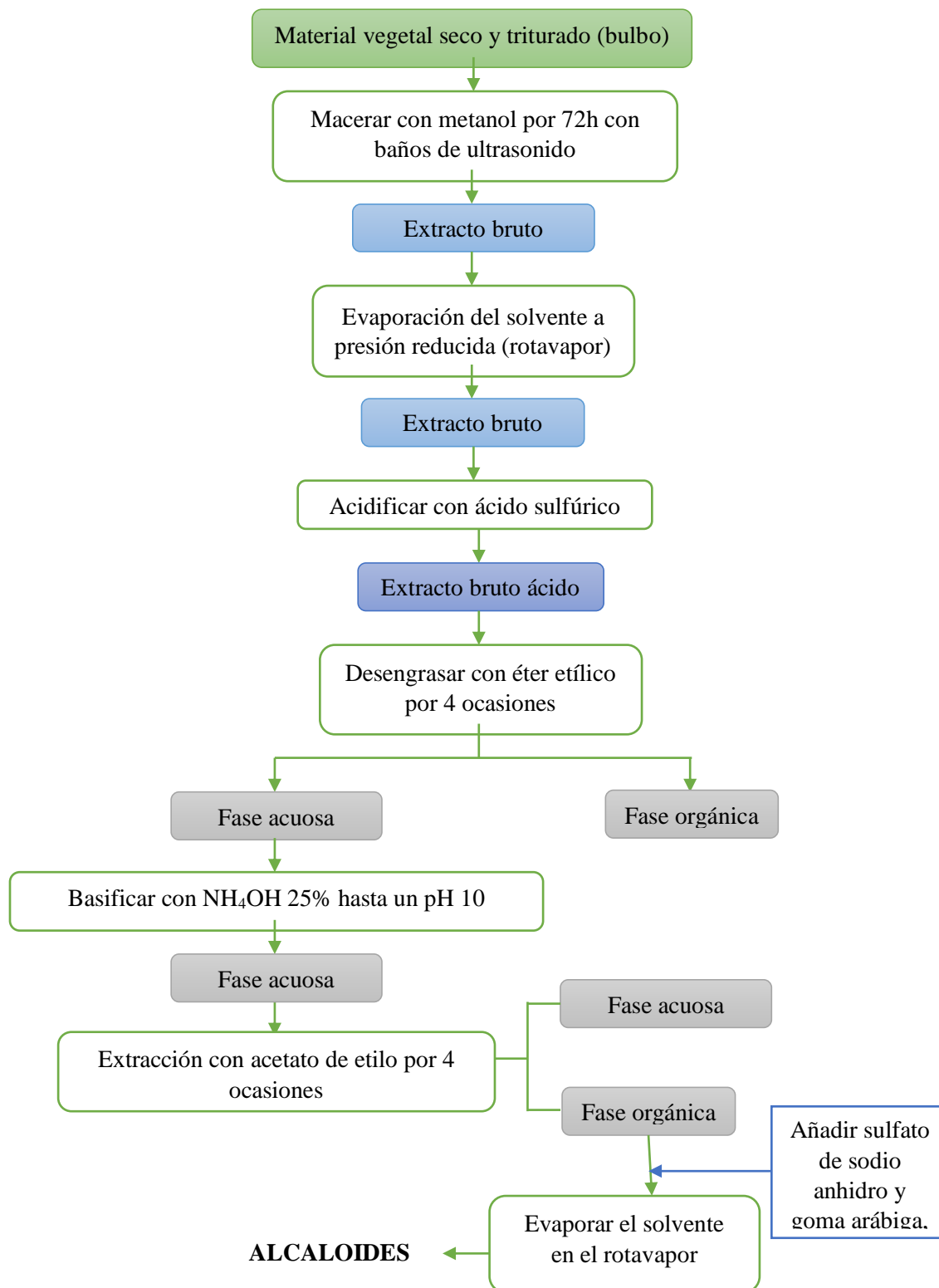


Figura 1-2. Esquema de la extracción de alcaloides del bulbo de *Eucharis astrophiala*

Fuente: (Acosta et al., 2014).

Realizado por: Heredia, Thalia, 2020.

2.7 Identificación de alcaloides del bulbo de *Eucharis astrophiala* por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas

Luego de obtener el extracto puro de alcaloides del bulbo de *Eucharis astrophiala*, se envió la muestra a la Universidad de Barcelona para realizar la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, en la que se empleó un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 6890 y un espectrómetro de masas modelo 5975 de impacto electrónico que trabaja a 70 eV en una temperatura de 230°C (Acosta et al., 2014, p. 179).

El cromatógrafo de gases está compuesto por una columna SAPIENS-X5-MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) y una fase estacionaria fenilmetilsilicona al 5% (Acosta et al., 2014, p. 179).

Utilizando el programa de temperatura de la siguiente forma:

- Aumento inicial de temperatura de 55 a 100°C (60°C/min).
- A 100°C durante 2 min.
- Aumento de temperatura de 100°C a 180°C (15°C/min).
- A 180°C durante 1 min.
- Aumento de temperatura de 180°C a 300°C (5°C/min)

Durante este proceso la temperatura del inyector era de 280°C, con flujo de Helio (He) de 0,8 ml/min, utilizando el método Splitless. El alcaloide estándar fue la codeína. Para verificar la pureza de los análisis el cálculo de índice de retención en los datos espectrales, se utilizó el software ADMIS 2.71 (NIST) (Acosta et al., 2014, p. 179).

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se dan a conocer los resultados de la extracción e identificación de los alcaloides presentes en el bulbo de *Eucharis astrophiala*, obtenidos a partir de los métodos que fueron descritos anteriormente. Además de la determinación del potencial farmacológico de los alcaloides mediante bibliografía.

3.1 Extracción de la fracción alcaloidal de *Eucharis astrophiala*

Los alcaloides presentan un carácter básico y en las plantas forman sales con ácidos orgánicos o como combinaciones solubles de otras sustancias, logrando disolverse muy bien en soluciones acuosas o hidroalcohólicas; por esta razón se considera que el metanol es el solvente adecuado para obtener el extracto crudo (Arango, 2008, pp. 9-11). A partir de este extracto, con el cambio de solventes y de pH, fue posible obtener el extracto puro en alcaloides.

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

| Material vegetal | Peso inicial de muestra seca (g) | Volumen de metanol (ml) | Extracto rico en alcaloides (mg) | % Rendimiento |
|--------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------------------------|---------------|
| Bulbo de <i>Eucharis astrophiala</i> | 2,016 | 80 | 18,35 | 0,918 |

Realizado por: Heredia, Thalia, 2020.

Eucharis astrophiala, es una especie vegetal endémica de Ecuador que no se ha investigado a profundidad, por lo que no existe información bibliográfica que permita realizar una comparación con los resultados obtenidos.

En Colombia, grupos de investigación han estudiado los bulbos de dos especies del género *Eucharis*, que corresponden a *Eucharis bonplandii* y *Eucharis caucana*, que presentan un rendimiento de extracción de 0,60% y 0,17% respectivamente (Cortes et al., 2018, p. 218). En el caso de Ecuador, se realizó un estudio en la especie *Eucharis formosa* con un rendimiento de 0,079% (Chamorro, 2019, p. 38).

Del género *Eucharis*, se observa que la especie con mayor rendimiento fue *Eucharis astrophiala*, con un rendimiento de 0.918%, y al compararle con otras especies de la familia Amaryllidaceae endémicas de Ecuador también es mayor, tales como: *Phaedranassa viridiflora* 0,15% (Erazo, 2019, p. 48), *Phaedranassa cuencana* 0,137% (Jaramillo, 2019, p. 44), *Phaedranassa tunguraguae* 0,15% (Montero, 2018, p. 32), *Phaedranassa glauciflora* 0,3% (Baldeon, 2018, p. 23), *Eucrosia mirabilis* 0,25% (Carillo, 2018, p. 33), *Phaedranassa dubia* 0,2% (Inca, 2017, p. 35), y *Phaedranassa cinerea* 0,11% (Salazar, 2017, p. 42).

3.2 Identificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas los alcaloides que contiene el bulbo del extracto alcaloidal de *Eucharis astrophiala*

En la Tabla 5-3, se detalla los alcaloides que se identificaron mediante CG-EM al analizar 2,016g de bulbo seco de *Eucharis astrophiala*, del que se obtuvieron 425,18 mg de extracto crudo y 18,35 mg de extracto rico en alcaloides. El ensayo se ejecutó en las siguientes condiciones, una inyección de 2,0 mg/ml de metanol: cloroformo en relación 1:1 y Split 1:5; y 0,5 µg /ml de codeína como patrón interno.

Tabla 2-3: Alcaloides presentes en el bulbo de *Eucharis astrophiala*, obtenidos por CG-EM.

| Alcaloide | Rt | RI | µg gal/100 mg PS |
|---------------------------------|--------|--------|------------------|
| Galantamina | 22,257 | 2386,1 | 10,551 |
| Codeína | 22,943 | 2430,8 | - |
| Desconocido (3-O-Metilmacowina) | 23,145 | 2444,4 | 0,694 |
| Narwedina | 23,473 | 2466,3 | 0,740 |
| Hemantamina | 25,924 | 2630,6 | 36,910 |
| 11-Hidroxivitatina/Hamaina | 27,021 | 2704,2 | 3,027 |
| Licorina | 27,627 | 2744,8 | 47,225 |
| Pseudolicorina | 28,562 | 2807,5 | 0,853 |

Interpretación de la tabla: Tiempo de retención (Rt), Índice de retención (RI), Peso Seco (PS).

Fuente: Universidad de Barcelona

Realizado por: Heredia, Thalia, 2020.

Se utilizó la codeína como patrón interno y el equipo detectó 7 alcaloides en el extracto alcaloidal de *Eucharis astrophiala*, los cuales son galantamina, narwedina, hemantamina, licorina, pseudolicorina, y 11-hidroxivitatina/hamaina. Además, se determinó la presencia de un alcaloide desconocido, que

posiblemente se trate de 3-O-metilmacowina, aunque para confirmar su identidad se deben realizar más estudios como Resonancia Magnética Nuclear.

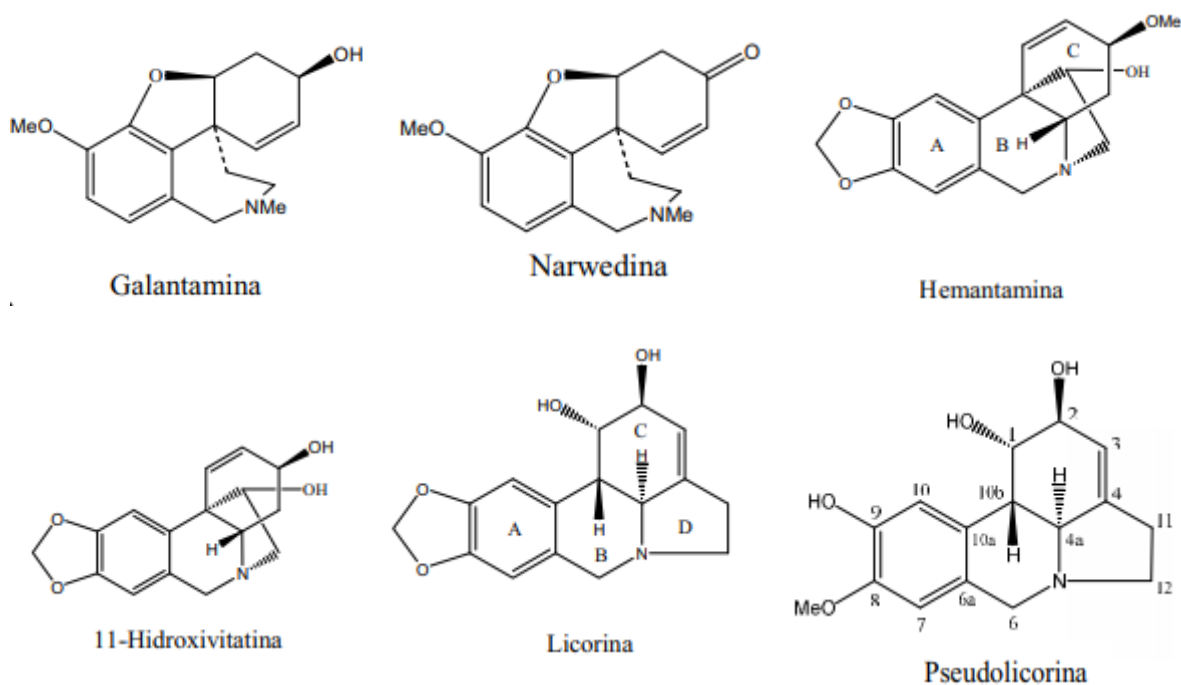


Figura 1-3. Estructura de los alcaloides identificados por CG-EM en el bulbo de *Eucharis astrophiala*

Fuente: (Osorio, 2008, pp. 9-24).

En la figura 5-3 se observan 6 de las estructuras de alcaloides de *Eucharis astrophiala*, que se identificaron por CG-EM, la estructura del alcaloide desconocido que posiblemente se trate de 3-O-Metilmacowina no se ha podido encontrar en bibliografía, es un alcaloide de tipo crinina, es decir presenta el esqueleto 5,10b-etanofenantridina con una sustitución de un grupo metilo en el carbono 3, como en el caso de 3-O-Metil-epimacowina, por lo que se puede asumir que la estructura es similar.

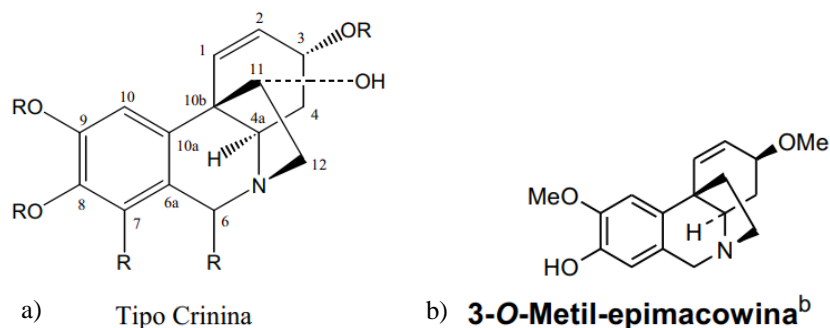


Figura 2-3. a) Esqueleto de tipo crinina – b) Estructura del alcaloide 3-O-Metil-macowina

Fuente: (Paulo De Andrade, 2014, p. 105).

En el extracto alcaloidal del bulbo de *Eucharis asrophiala*, el alcaloide licorina en comparación con el resto de alcaloides, se presenta en mayor porcentaje con un total de 47,225%, seguido de hemantamina con 36,910%, galantamina con 10,551% y 11-Hidroxivitatina/Hamaina con 3,027%; mientras que pseudolicorina (0,853%), narwedina (0,740%) y el alcaloide desconocido (0,694%) se encuentran en el extracto en un porcentaje menor a 1.

La narwedina se origina en la ruta biosintética de la galantamina, es un intermediario que tras algunas reacciones químicas forma la galantamina, sin ser un precursor directo, que por medio de una reacción catalizada hipotéticamente por una oxido-reductasa reversible ambos alcaloides pueden existir en equilibrio (Osorio, 2008, p. 24).

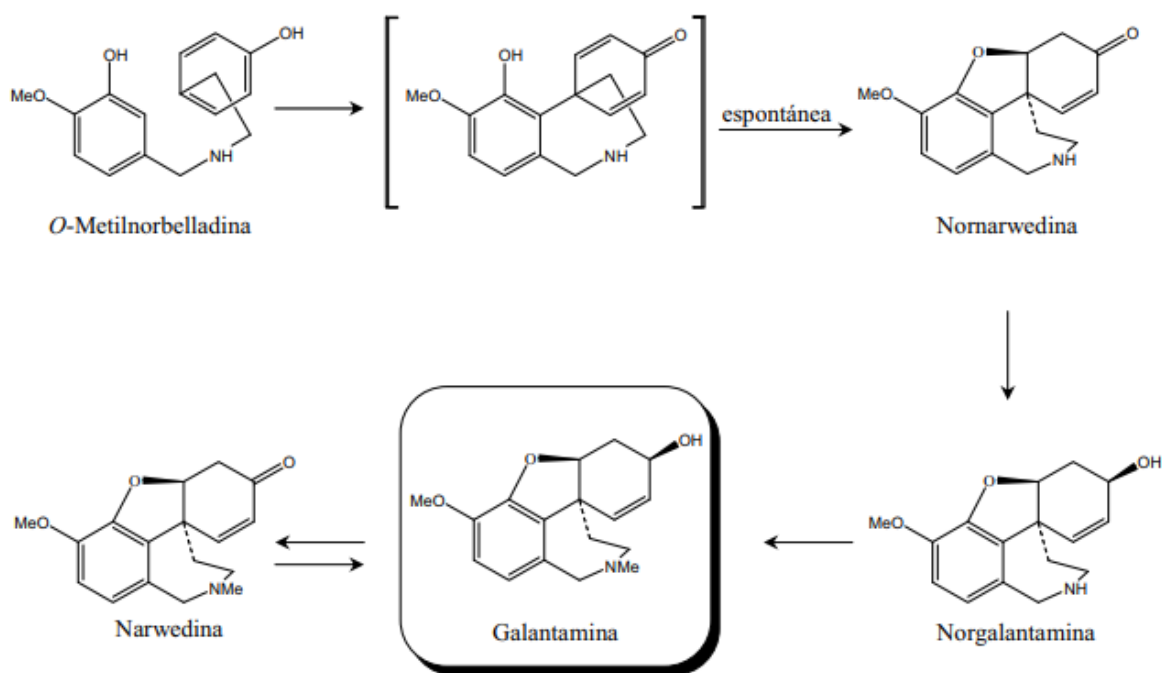


Figura 3-3. Biosíntesis de galantamina

Fuente: (Eichhorn et al., 1998, p. 1043).

En la lectura por CG-EM del compuesto con $R_t = 27,021$ y $RI = 2704,2$, el alcaloide podría ser la 11-hidroxivitatina y hamaina, por dicho motivo sería necesario un estudio complementario de dicroísmo circular que determine cuál de los dos isómeros está presente en la muestra.

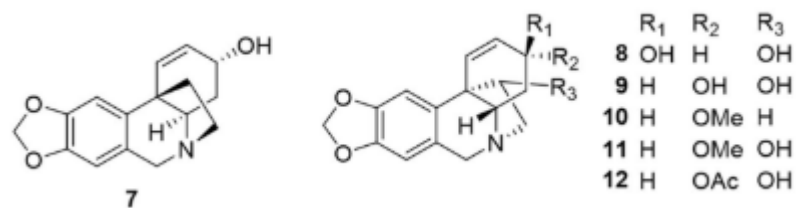


Figura 4-3. Estructura de 11-hidroxivitatina (7) y hamaina (8)

Fuente: (Endo et al., 2019, p. 649).

Los alcaloides de las especies vegetales de Amaryllidaceae tienen como precursor base la norbelladina que, al sufrir diferentes reacciones químicas como acoplamientos fenólicos oxidativos, se van modificando y transformando, lo que da lugar a los alcaloides de tipo licorina/homolicorina (acoplamiento orto-para), crinina/hemantamina/montanina/tazetina/narciclasina (acoplamiento para-para) y galantamina (acoplamiento para-orto) (Osorio, 2008, p. 18).

Debido a que los alcaloides provienen de un mismo precursor, se puede observar que las estructuras son similares, pero con diferentes sustituciones y posiciones con respecto al anillo fenólico, lo que les proporciona una característica distinta, tanto física como química, a cada alcaloide.

Como ya se mencionó anteriormente, no existe un estudio previo de esta especie vegetal con el que se pueda realizar un análisis comparativo, sin embargo, existen estudios en otras especies del género *Eucharis*, como: *E. formosa*, *E. bonplandii*, *E. amazónica* y *E. grandiflora*.

En *Eucharis formosa*, se identificaron 6 alcaloides: licorina con un total de 62,21%, 11-hidroxivitatina/hamaina con 13,16%, hemantamina con 7,63%, galantamina con 6,36%, O-metilmaritidina e incartina con un porcentaje menor a 0,1%. Por último, un compuesto que no pudo ser identificado con m/z 288^a; [M=289]^b, con un porcentaje menor a 0,1% (Chamorro, 2019, pp. 39-40).

Además, se le realizó un estudio de actividad inhibitoria frente a enzimas colinesterasas, obteniéndose como resultado que el extracto alcaloidal del bulbo de *E. formosa*, presenta actividad alta para AChE y actividad media para BuChE, en comparación con galantamina (Chamorro, 2019, p. 48).

En *Eucharis bonplandii*, se identificaron 9 alcaloides: anhidrolicorina, dihidrolicorina, N-oxido-galantamina, 8-o-demetilmaritidina, sanguinina, galantamina, narwedina, licorina y metilpseudolicorina. El extracto alcaloidal del bulbo de *E. bonplandii* presentó una actividad inhibitoria alta frente a AChE, en comparación con galantamina (Cortes et al., 2018, pp. 220-223).

En *Eucharis amazónica*, los alcaloides identificados fueron: licorina, 7-metioxioxoassonina, trisferidina, ismina, tazetina, 3-epimacronina, 6-O-metilpretazetina, galantamina, 3-O-metilgalantamina, hemantamina, vitatina, 3-O-metilmaritidina y apohemantamina (Cabezas et al., 2007, p. 239).

En *Eucharis grandiflora*, se identificaron alcaloides como: licorina, 2-O-acetillicorina, trisferidina, ismina, tazetina, 3-epimacronina, 3-O-demiltazetina, galantamina, sanguinina, hamaina, 3-O-metilmaritidina, 11-hidroxivitatina y 1,2-dihidroxivitatina (Cabezas et al., 2007, p. 239).

Al comparar las cuatro especies del género *Eucharis*, los alcaloides que presentan en común son licorina, galantamina, 11-hidroxivitatina, hamaina y hemantamina. Además, *E. astrophiala* y *E. bonplandii*, presentaron en común el alcaloide narwedina.

3.3 Determinación del potencial farmacológico de los alcaloides presentes en el extracto alcaloidal del bulbo de *Eucharis astrophiala*

La familia Amaryllidaceae está conformada por 85 géneros y 1100 especies aproximadamente que, con el paso de los años, se han investigado algunas de estas, una de las primeras fue *Narcissus pseudonarcissus*, que dio resultados favorables, al aislar el alcaloide licorina, responsable de algunas de sus actividades farmacológicas; lo que llevo a investigar más especies vegetales, para identificar y aislar alcaloides de interés farmacológico (Fan-Chiang et al., 2016, p. 5640).

3.3.1 Inhibidores de enzimas colinesterasas

Una de las propiedades biológicas es la inhibición de enzimas colinesterasas como AChE y BuChE, importante en el tratamiento de la EA que, de acuerdo a la hipótesis colinérgica de cómo se desarrolla la enfermedad, menciona que existe este daño a nivel cerebral por la degradación de acetilcolina causado por AChE en la sinapsis colinérgica, el alcaloide de Amaryllidaceae que se comercializa actualmente es la galantamina (Ding et al., 2017, p. 83).

Se demostró que la galantamina inhibe estas enzimas, estimula los receptores nicotínicos pre y postsinápticos, y aumenta la liberación de neurotransmisores promoviendo la función neuronal directamente, además protege a las neuronas que sufran apoptosis por toxicidad del β -amiloide, por lo que es un candidato prometedor para tratar enfermedades nerviosas, esquizofrenia y otros tipos de demencia (Ding et al., 2017, p. 84-85).

Los alcaloides de tipo licorina y galantamina presenta esta propiedad farmacológica; y de los alcaloides de la especie *Eucharis astrophiala* de este tipo son la licorina, pseudolicorina, galantamina

y narwedina, no existen estudios que demuestren que la narwedina sea un inhibidor de colinesterasas, pero se puede deducir que también es un inhibidor debido a que es un precursor de la biosíntesis de galantamina y ambas estructuras son similares, sin embargo si sería importante desarrollar un estudio que compruebe tal hipótesis (Paulo De Andrade, 2014, p. 14).

3.3.2 Actividad antitumoral

Una de las propiedades farmacológicas más estudiadas en los alcaloides de estas especies vegetales, es la actividad antitumoral que se puede detectar en todos los tipos de alcaloides, por interrumpir la biosíntesis de proteínas eucariotas, sin embargo, solo los alcaloides de tipo licorina, hemantamina y fenantridona se usan para este tipo de investigaciones (Paulo De Andrade, 2014, p. 34).

En este grupo están los alcaloides licorina, pseudolicorina y hemantamina. La licorina inhibe las células del melanoma murino BL6, suprime el crecimiento celular y reduce la supervivencia celular al detener la fase G2/M en la leucemia, carcinoma pulmonar de Lewis, ascitis murina, además induce la apoptosis de células tumorales (Paulo De Andrade, 2014, p. 34).

La hemantamina demuestra actividad citostática frente a las células tumorales, como en el caso de la leucemia viral de Rauscher, linfoma Molt 4, cáncer de próstata humano, hepatoma humano, melanoma BL6 y linfoma L5178 en el ratón, el farmacóforo responsable de esto, es el puente alfa-C2 y un sustituyente en el carbono 11 (Ding et al., 2017, p. 88).

Pseudolicorina al igual que la licorina es activo contra algunas células tumorales, pero ambos difieren en el sitio de acción al momento de inhibir la síntesis de proteínas de las células tumorales en la etapa que se da la formación del enlace peptídico, y presenta perfiles citotóxicos (Bastida et al., 2011, 65-100 p, p. 84).

Además, los alcaloides licorina y hemantamina, demostraron que sirven de base para la producción de más compuestos que puedan combatir con cánceres que sean resistentes a la apoptosis, como glioblastoma, melanoma, cáncer metastásico y cáncer pulmonar de células no pequeñas (Ding et al., 2017, p. 88).

Otro alcaloide que se puede incluir en este grupo es la hamaina, debido a que es un alcaloide del tipo hemantamina, es decir presenta una estructura similar a dicho alcaloide, por lo que tendría el mismo grupo farmacóforo que al unirse al sitio de acción correspondiente, tenga la actividad antitumoral antes mencionada.

3.3.3 Propiedad antimicrobiana

Los alcaloides de Amaryllidaceae tienen una amplia actividad frente a los diferentes grupos de microorganismos, en este grupo se incluyen los alcaloides licorina, pseudolicorina, 11-hidroxitatina, galantamina y hemantamina, identificados en el extracto alcaloidal de la especie vegetal (Ding et al., 2017, p. 89).

Con actividad antibacteriana, 11-hidroxitatina, efectivo para *Staphylococcus aureus* Gram-positivo; y con actividad antifúngica, licorina y 11-hidroxitatina, frente a *Candida albicans*, siendo el alcaloide licorina que presenta mayor actividad (Ding et al., 2017, p. 90).

Licorina y pseudolicorina presentan actividad antiviral, ejerciendo un efecto en el ADN y ARN-viral, son eficaces en pruebas con flavivirus y bunyavirus, de forma teórica contra virus de la fiebre de Punta Toro y del Valle del Rift con baja selectividad. Además, licorina actúa como anti-SARS-CoV, poliomeilitis, coxsackie y herpes tipo 1 (Ding et al., 2017, p. 90).

Los alcaloides que muestran una respuesta óptima frente a *Plasmodium falciparum* son licorina y crinina, tanto en la cepa D10 y FAC8, sensible y resistente a cloroquina respectivamente; licorina, hemantamina y galantamina muestran actividad antipalúdica, siendo los dos primeros alcaloides con mayor potencia, que podría darse gracias a la parte metilendioxibenceno y el nitrógeno terciario sin metilo de la molécula de ambos alcaloides (Ding et al., 2017, p. 91).

Pseudolicorina y hemantamina, también presentan actividad en ensayos in vitro a *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *Trypanosoma cruzi* (Ding et al., 2017, p. 92).

3.3.4 Actividad antiinflamatoria

Los alcaloides que tienen actividad antiinflamatoria son licorina y crinina. La licorina al inhibir la inducción de la apoptosis por calprotectina, una sustancia derivada de los neutrófilos, apunta que tiene una actividad moduladora en la reacción antiinflamatoria; al igual que, inhibe el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la producción de macrófagos murinos estimulados con lipopolisacárido, lo que le otorga la propiedad antiinflamatoria, ya que son mediadores de la inflamación (Ding et al., 2017, p. 92).

En el caso de la crinina, presenta una actividad antiinflamatoria leve por medio de la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), actuando selectivamente en la isoforma COX-1, evitando la síntesis de prostaglandinas, causantes del dolor, inflamación y desarrollo de neoplasias (Ding et al., 2017, p. 92).

3.3.5 Otras actividades

La narwedina, ha sido estudiada como un estimulador respiratorio, actúa aumentando la amplitud y disminuyendo la frecuencia de las contracciones cardiacas, dicho esto, se habla de un alcaloide que puede ser valioso en cirugías, al reducir la pérdida de sangre durante las mismas. Además, es un inhibidor de la acción de narcóticos e hipnóticos; y aumenta el efecto analgésico de la morfina, y el efecto farmacológico de alcaloides como la cafeína, el carbazol, la arecolina y la nicotina (Bastida et al., 2011, p. 92).

La galantamina se conoce por los efectos narcóticos que posee como inducir el “sueño lúcido” y la “experiencia fuera del cuerpo”, a más de su aplicación como agente nootrópico. La licorina posee una fuerte actividad analgésica y una actividad hepatoprotectora significativa (Ding et al., 2017, p. 92).

CONCLUSIONES

- Se extrajo la fracción alcaloidal del bulbo de *Eucharis astrophiala* por el método de extracción del uso de solventes orgánicos y cambios de pH, con un rendimiento de 0,918 %.
- Se identificaron 7 alcaloides en el extracto alcaloidal del bulbo de *Eucharis astrophiala*, por medio de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, estos fueron licorina (47,225%) en mayor proporción, seguido de hemantamina (36,910%), galantamina (10,551%), 11-hidroxitatina/hamaina (3,027%), pseudolicorina (0,853%), narwedina (0,740) y un alcaloide desconocido que podría ser 3-O-metilmacowina (0,694%).
- Se pueden asociar una variedad de aplicaciones farmacológicas con los alcaloides identificados en el bulbo de *Eucharis astrophiala* mediante una revisión bibliográfica, estos alcaloides presentan actividad inhibitoria frente a enzimas colinesterasas, antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatoria, entre otras actividades.

RECOMENDACIONES

- Es necesario que se investigue a más profundidad la especie *Eucharis astrophiala*, debido a que posee una buena cantidad de alcaloides con diversas propiedades farmacológicas.
- Se recomienda realizar un estudio sobre la inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, en comparación con galantamina, fármaco utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- La mayor parte de especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae se encuentran en peligro de extinción, se debería desarrollar programas de reforestación de estas especies, ya que como se ha demostrado poseen una gran variedad de propiedades farmacológicas debido a su perfil de alcaloides.

GLOSARIO

EA Enfermedad de Alzheimer

AChE Acetilcolinesterasa

SNC Sistema Nervioso Central

IACHe Inhibidor de Acetilcolinesterasa

FDA Food Drug Administration

BIFRENES Biodiversidad Iberoamericana como Fuentes de Recursos Naturales para su Explotación Sostenible

CYTED Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo

SNAP Sistema Nacional de Áreas Protegidas

BuChE Butirilcolinesterasa

CG-EM Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

He Helio

Rt Tiempo de retención

IR Índice de Refracción

TNF- α Factor de necrosis tumoral

COX Ciclooxygenasas

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, Karen; et al. "Identification of the alkaloids of *Stenomesson aurantiacum* (Kunth) herb an amaryllidaceae species from the ecuadorian andes". *Pharmacologyonline* [en línea], 2014, (España) 3, pp. 178-183. [Consulta: 29 enero 2020]. DOI 10.1155/2013/468909. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1541/1/T-SENESCYT-00674.pdf>.

ALPÍZAR, Carlos; & MORALES, Catalina. "La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa". *Acta Médica Costarricense* [en línea], 2003, 45(2). [Consulta: 21 enero 2020]. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022003000200005.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. *¿Qué es el Alzheimer?* [en línea]. 2018a. [Consulta: 15 enero 2020]. Disponible en: https://www.alz.org/alzheimer-demencia/que-es-la-enfermedad-de-alzheimer?utm_source=google&utm_medium=search&utm_campaign=google_grants&utm_content=espanol&gclid=EAIaIQobChMI0L6zluSA5wIV1Y7ICh3y0wkIEAAYASAAEgKIq_D_BwE.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. *Etapas* [en línea]. 2018b. [Consulta: 30 julio 2020]. Disponible en: <https://www.alz.org/alzheimer-demencia/etapas?lang=es-MX#:~:text=La enfermedad de Alzheimer generalmente,Alzheimer de una forma distinta>.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *¿Qué es el cáncer?* [en línea]. 2019. [Consulta: 7 enero 2021]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>.

ARANDA, Mónica; & CALABRIA, Alejandro. "Impacto económico-social de la enfermedad de Alzheimer". *Neurología Argentina* [en línea], 2019, 11(1), pp. 19-26. [Consulta: 6 julio 2020]. DOI 10.1016/j.neuarg.2018.11.001. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-argentina-301-articulo-impacto-economico-social-enfermedad-alzheimer-S1853002818300831>.

ARANGO, Gabriel. *Alcaloides Y Compuestos Nitrogenados*. Medellín-Colombia, 2008, pp. 1-84.

BALDEON, Viviana. 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, Ciencias, Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador. 2018.

pp. 1-63. [Consulta: 5 enero 2021]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8819/1/56T00759.pdf>.

BASTIDA, Jaume; et al. *Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids* [en línea]. Barcelona-España: Recent Advances in Pharmaceutical Sciences, 2011. [Consulta: 31 julio 2020]. ISBN 9788178955285. Disponible en: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/21374>. 65-100 p.

BERGOÑÓN, Salvador. "Aislamiento y caracterización química de alcaloides del tipo Amaryllidaceae. Producción de galantamina por cultivos « in vitro» de *Narcissus confusus*". *Universidad de Barcelona*, 1994, pp. 147-292.

BORES, Gina; et al. "Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine". *Pharmacology and Experimental Therapeutics* [en línea], 1996, 277(2), pp. 728-738. [Consulta: 6 febrero 2021]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/14572113_Pharmacological_evaluation_of_novel_Alzheimer's_disease_therapeutics_Acetylcholinesterase_inhibitors_related_to_galanthamine.

BRIGHTFOCUS FOUNDATION. *Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.* [en línea]. 2019. [Consulta: 21 enero 2020]. Disponible en: <https://www.brightfocus.org/espanol/la-enfermedad-de-alzheimer-y-la-demencia/tratamientos-de-la-enfermedad-de-alzheimer>.

CABEZAS, Fabio; et al. "Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphurria subdentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de Amaryllidaceae". *Scientia Et Technica*, 2007, 13(33), pp. 237-241.

CARILLO, Douglas. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Eucrosia mirabilis* [en línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ciencias, Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador. 2018. pp. 1-85. [Consulta: 5 enero 2021]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8842/1/56T00773.pdf>.

CHAMORRO, Raúl. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA FRACCIÓN ALCALOIDAL *Eucharis formosa* SOBRE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA [en línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ciencias, Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador. 2018. pp. 1-63. [Consulta: 11 noviembre 2020]. Disponible en:

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/13260/1/56T00899.pdf>.

CORTES, Natalie; et al. "Alkaloids of Amaryllidaceae as Inhibitors of Cholinesterases (AChEs and BChEs): An Integrated Bioguided Study". *Phytochemical Analysis* [en línea], 2018, 29(2), pp. 217-227. [Consulta: 3 febrero 2021]. ISSN 10991565. DOI 10.1002/pca.2736. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29044771/>.

DING, Yan; et al. "Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review". *Journal of Asian Natural Products Research* [en línea], 2017, 19(1), pp. 53-100. [Consulta: 15 enero 2020]. ISSN 14772213. DOI 10.1080/10286020.2016.1198332. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/10286020.2016.1198332>.

EICHHORN, Jörg; et al. "Biosynthesis of the amaryllidaceae alkaloid galanthamine". *Phytochemistry* [en línea], 1998, 49(4), pp. 1037-1047. [Consulta: 6 enero 2021]. ISSN 00319422. DOI 10.1016/S0031-9422(97)01024-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942297010248>.

ENAMORADOS, Yulaisi; 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, 48(4), pp. 7-16. [Consulta: 20 enero 2020]. ISSN 1870-0195. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57956617002.pdf>.

ENDO, Yuta; et al. "Two new alkaloids from *Crinum asiaticum* var. japonicum". *Journal of Natural Medicines* [en línea], 2019, 73(3), pp. 648-652. [Consulta: 6 enero 2021]. ISSN 18610293. DOI 10.1007/s11418-019-01304-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01304-9>.

ERAZO, Cinthia. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Phaedranassa viridiflora* SOBRE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA [en línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ciencias, Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador. 2019. pp. 1-82. [Consulta: 18 junio 2020]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/13442/1/56T00902.PDF>.

FAN-CHIANG, Tai Ting; et al. "Synthesis of phenanthridine skeletal Amaryllidaceae alkaloids". *Tetrahedron* [en línea], 2016, 72(36), pp. 5640-5645. [Consulta: 21 enero 2020]. ISSN 14645416. DOI 10.1016/j.tet.2016.07.065. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2016.07.065>.

GUTIÉRREZ, M Carmen; & DROGUET, Marta. "La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor". *Boletín Intexter del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial* [en línea], 2002, 122, pp. 35-41. [Consulta: 31 julio 2020]. ISSN 11316756. Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf>.

INCA, Silvia. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Phaedranassa dubia* [en línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ciencias, Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador. 2017. pp. 1-81. [Consulta: 18 junio 2020]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7927/1/56T00742.pdf>.

JARAMILLO, Tatiana. Determinación de la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de *Phaedranassa cuencana*, sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa [en línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ciencias, Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador. 2019. pp. 1-67. [Consulta: 22 enero 2020]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/10629/1/56T00858.PDF>.

JIMÉNEZ CABALLERO, PE. "Alteración de la actividad de la butirilcolinesterasa en pacientes con enfermedad de Alzheimer tratados con inhibidores de la acetilcolinesterasa". *Neurología* [en línea], 2011, 26(4), pp. 245-247. [Consulta: 21 enero 2020]. ISSN 02134853. DOI 10.1016/j.nrl.2010.09.026. Disponible en: [file:///C:/Users/WinUser/Downloads/S0213485310002707%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/WinUser/Downloads/S0213485310002707%20(1).pdf).

LEÓN, Susana; et al. *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador* [en línea]. Segunda ed. Quito-Ecuador: Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2011. ISBN 978-9942-03-393-2. [Consulta: 29 octubre 2020]. Disponible en: <https://www.casadellibro.com/libro-la-gestion-comunal-de-recursos-economia-y-poder-en-las-sociedades-locales-de-espana-y-america-latina/9788474262803/528143>. 499 p.

LÓPEZ, Susana; et al. "Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts". *Life Sciences* [en línea], 2002, 71(21), pp. 2521-2529. [Consulta: 20 enero 2020]. ISSN 00243205. DOI 10.1016/S0024-3205(02)02034-9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320502020349>.

MAYO CLINIC. *Enfermedad de Alzheimer* [en línea]. 2019. [Consulta: 20 enero 2020]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/alzheimers-disease/symptoms-causes/syc-20350447>.

MEEROW, Alan. "Systematics of the Amazon Lilies , *Eucharis* and *Caliphruria* (Amaryllidaceae)". *Annals of the Missouri Botanical Garden* [en línea], 1989, 76(1), pp. 136-220. [Consulta: 29 octubre 2020]. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/2399347?seq=1>.

MEEROW, Alan W; et al. "Two new species of endemic ecuadorean Amaryllidaceae (Asparagales, Amaryllidaceae, Amarylloideae, Eucharideae)". *PhytoKeys* [en línea], 2015, 48(1), pp. 1-9. [Consulta: 29 octubre 2020]. ISSN 13142003. DOI 10.3897/phytokeys.48.4399. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25931969/>.

MONTERO, Evelin. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DE *Phaedranassa tunguraguae*” [en línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ciencias, Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador. 2018. pp. 1-73. [Consulta: 6 noviembre 2019]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/8826/1/56T00762.pdf>.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. *Medicamentos para la enfermedad de Alzheimer* [en línea]. 2018. [Consulta: 22 enero 2020]. Disponible en: <https://www.nia.nih.gov/health/medicamentos-enfermedad-alzheimer>.

OMS. *Demencia* [en línea]. 2019. [Consulta: 18 junio 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.

ORTIZ, Dayrin; et al. "Actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa por extractos de 18 especies vegetales nativas de Guatemala usadas en el tratamiento de afecciones nerviosas". *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia* [en línea], 2013, 22(1), pp. 17-25. [Consulta: 20 enero 2020]. Disponible en: <http://www.revistasguatemala.usac.edu.gt/index.php/qyf/article/view/176>.

OSORIO, Edison. 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) (Doctoral). Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia. Barcelona-España. 2008, pp. 1-217. [Consulta: 6 enero 2021]. Disponible en:

https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/2618/EJOD_TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

PAULO DE ANDRADE, Jean. Estudio de la composición alcaloídica de *Narcissus broussonetii* y de tres especies brasileñas del género *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) [en línea] (Trabajo de titulación) (Doctoral). Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia. Barcelona-España. 2014, pp. 1-171. [Consulta: 6 noviembre 2019]. Disponible en: http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/55988/1/JPdA_TESIS.pdf.

PUENTE, Javier; & VELASCO, Guillermo. *¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla?* [en línea]. 2019. [Consulta: 7 enero 2021]. Disponible en: <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla?showall=1>.

ROMANO, Martín Fidel; et al. "Enfermedad de alzheimer". *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina* [en línea], 2007, 175, pp. 9-12. [Consulta: 1 noviembre 2019]. Disponible en: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/37218372/3_175.pdf?response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DENFERMEDAD_DE_ALZHEIMER.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20191101%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_requ.

SALAZAR, Cristina. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Phaedranassa cinerea* [en línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ciencias, Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador. 2017. pp. 1-83. [Consulta: 15 enero 2020]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/7939>.

SINGH, Manjinder; et al. "Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection". *European Journal of Medicinal Chemistry* [en línea], 2013, 70, pp. 165-188. [Consulta: 18 junio 2020]. ISSN 17683254. DOI 10.1016/j.ejmech.2013.09.050. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.050>.

ANEXOS

ANEXO A: Especie *Eucharis astrophiala*



ANEXO B: Acondicionamiento de la especie vegetal

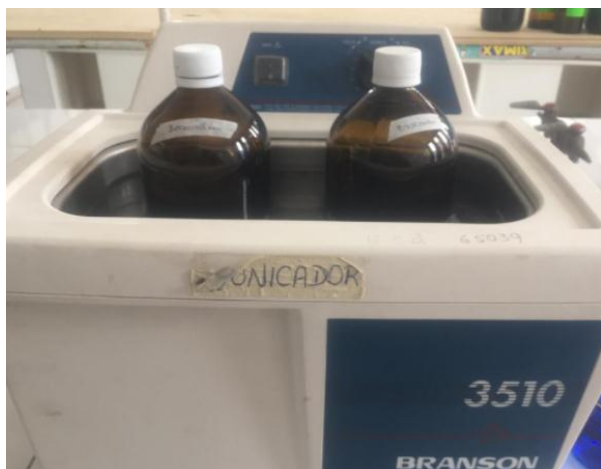


Pesaje del bulbo seco de *Eucharis astrophiala*



Trituración de la muestra vegetal

ANEXO C: Obtención del extracto crudo de *Eucharis astrophiala*



Sonicación por intervalos de tiempo

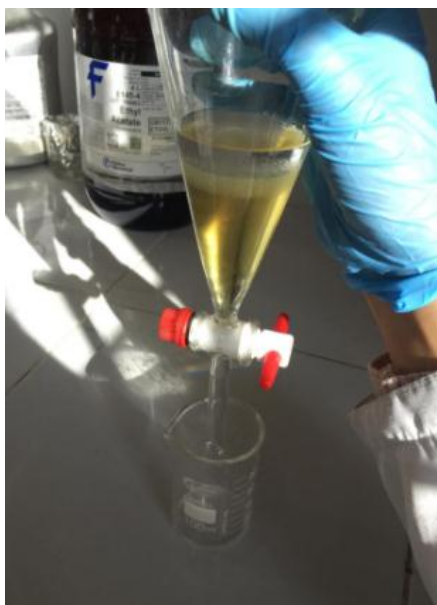


Filtrado del extracto crudo



Concentración del extracto en el rotavapor

ANEXO D: Extracción de los alcaloides de *Eucharis astrophiala*



Limpieza y desengrasado del extracto bruto ácido



Evaporación del solvente con el rotavapor



Extracto puro de alcaloides

Anexo E: Contrato marco “Estudio de la biodiversidad en el Ecuador, ecología, conservación y su potencial uso sostenible”



CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DENOMINADO: “ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE” CELEBRADO ENTRE EL MINISTERIO DEL AMBIENTE, A TRAVÉS DE LA SUBSECRETARÍA DE PATRIMONIO NATURAL Y LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

MAE-DNB-CM-2018-0086

COMPARECIENTES:

A la suscripción del presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos del Programa de Investigación Científica Denominado: “ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE” comparecen, por una parte el MINISTERIO DEL AMBIENTE, a través de la Subsecretaría de Patrimonio Natural, legalmente representado por el LCDO. LÓPEZ MORA ALFREDO DANILO, en su calidad de Subsecretario de Patrimonio Natural, conforme se desprende de la Acción de Personal Nro. 0945 de 02 de mayo de 2018, delegado de la máxima autoridad mediante 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 ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, debidamente representada por el Ing. BYRON ERNESTO VACA BARRAHONA PhD., en su calidad de Rector, conforme consta del certificado emitido por el Ab. Carlos de la Cadena, Secretario General, documento que se agrega como habilitante y a quien en adelante se denomina “ESPOCH”.

Las partes convienen en celebrar, el presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos respecto de la solicitud del programa de investigación científica denominado “ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE” contenido y estipulado en las siguientes cláusulas:

PRIMERA. ANTECEDENTES.-

1. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 3 numeral 7 establece que son deberes primordiales del Estado “(...)7. Proteger el patrimonio natural y cultural del país. (...)” y 83 numerales 6 y 13 establece como deberes y responsabilidades de los ecuatorianos y los ecuatorianas “(...) 6. Respetar los derechos de la naturaleza, preservar un ambiente sano y utilizar los recursos naturales de modo racional, sustentable y sostenible (...) 13. Conservar el patrimonio cultural y natural del país, y cuidar y mantener los bienes públicos (...)”;
2. El artículo 14 de la Norma Suprema determina que: “...Se reconoce el derecho de la



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: 24 / 02 /2021

| |
|---|
| INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S) |
| Nombres – Apellidos: Thalia Lizet Heredia Miranda |
| INFORMACIÓN INSTITUCIONAL |
| Facultad: Ciencias |
| Carrera: Bioquímica y Farmacia |
| Título a optar: Bioquímica Farmacéutica |
| f. Analista de Biblioteca responsable: Lic. Luis Caminos Vargas Mgs. |



Firmado electrónicamente por:
**LUIS ALBERTO
CAMINOS
VARGAS**



0643-DBRAI-UPT-2021