



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA
FRACCIÓN ALCALOIDAL DE *Phaedranassa brevifolia*, SOBRE LAS
ENZIMAS ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

**Presentado para optar el grado académico de:
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: JESSICA LISSETTE ROBLES JARAMILLO
TUTORA: Lic. KAREN LISSETH ACOSTA LEÓN, M.Sc.**

**RIOBAMBA-ECUADOR
2019**

© 2019 Jessica Lissette Robles Jaramillo

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de Titulación Tipo: Trabajo Experimental “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA FRACCIÓN ALCALOIDAL DE *Phaedranassa brevifolia*, SOBRE LAS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA”, de responsabilidad de la señorita Jessica Lissette Robles Jaramillo, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Lic. Karen Acosta León M. Sc.

DIRECTOR DEL TRABAJO

DE TITULACIÓN

BqF Diego Vinuesa Tapia

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

El trabajo de grado que presento es original y basado en el proceso de investigación y/o adaptación tecnológica establecido en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. En tal virtud los fundamentos teóricos – científicos son de exclusiva responsabilidad del autor. El patrimonio intelectual le pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Jessica Lissette Robles Jaramillo

180515003-2

DEDICATORIA

A mi virgen de Guadalupe por guiar mi camino, bendecir mi vida y cuidarme durante todos estos años.

A mis padres porque son mi ejemplo de lucha y perseverancia constante., porque nunca dejaron de brindarme su incondicional apoyo, amor y confianza. A ustedes que son el tesoro más preciado que la vida me ha dado.

Jessica

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y la virgen de Guadalupe por nunca abandonarme en cada paso que doy, por darme la fortaleza para siempre salir adelante y cumplir uno de mis sueños más anhelado, permitiéndome compartir esta alegría junto a mi familia.

A mis padres Luis y Ana por ser el pilar fundamental en mi vida, que a través de su amor, paciencia, consejos y buenos valores han sabido guiarme de la mejor manera para culminar mi carrera con éxito. Sin más un infinito gracias por hacerme su prioridad y todo lo que hacen día a día por mí. Los amo.

A mi hermano Diego que siempre me brindo un abrazo sincero en los buenos y malos momentos y nunca permitió que desmayara cuando las cosas se ponían difíciles.

A mi sobrino Josué, aunque tenga dos años de edad, día a día me muestra lo hermoso que es tener un amor puro y sincero.

Agradezco infinitamente a mi madrina Cecilia por siempre estar pendiente de mí a pesar de la distancia y ser cómo mi ángel de la guarda desde antes de nacer.

Un agradecimiento profundo a la Lic. Karen Acosta M.Sc., por saber dirigir de buena manera este trabajo de titulación, por su apoyo y compartir sus conocimientos científicos, así como personales, gracias porque a más de ser una excelente docente y profesional, me ha sabido brindar su amistad y eso siempre lo llevare en mi corazón.

Agradezco infinitamente al BQF. Diego Vinueza M.Sc, por el apoyo y la predisposición para el desarrollo de este trabajo de titulación. Gracias a todos quienes conforman el grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia de la ESPOCH (GIPRONAF) por la entrega y su colaboración.

Al Dr. Jaume Bastida de la Universidad de Barcelona (España) y la Dra. Nora Oleas de la Universidad Tecnológica Indoamérica, por su valioso aporte en esta investigación.

A todos mis amigos que estuvieron conmigo durante estos años y fueron la familia que elegí, gracias por siempre transmitir positivismo e indicarme lo valioso de una amistad.

Jessica

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterasa
AChEI	Inhibidor de Acetilcolinesterasa
ATC	Acetilcolina
BuChE	Butirilcolinesterasa
BTC	Butiriltiocolina yodada
°C	Grados Celsius
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 Drug Administration
g	gramo
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
L	Litro
M	Molar
mg	miligramo
mL	mililitro
min	Minuto
μM	Micro Molar
μL	Micro litro

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1 Enfermedad de Alzheimer	5
1.1.1 Historia.....	5
1.1.2 Descripción	5
1.1.3 Factores de riesgo.....	6
1.1.4 Síntomas.....	6
1.1.5 Hipótesis del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer	7
1.1.6 Tratamiento de Alzheimer.....	8
1.2 Acetilcolinesterasa.....	9
1.3 Butirilcolinesterasa.....	9
1.4 Familia Amaryllidaceae	9
1.4.1 Características generales	9
1.4.2 Phaedranassa	10
1.4.3 Alcaloides de Amaryllidaceae.....	13
1.5 Método Ellman	15

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	17
2.1 Tipo y diseño de investigación.....	17
2.1.1 Unidad de análisis	17
2.1.2 Población de Estudio.....	17
2.1.3 Tamaño de Muestra.....	17
2.2 Lugar de la recolección del material vegetal.....	17

2.2.1	Selección de muestra.....	18
2.3	Lugar de investigación	18
2.4.	Identificación botánica	18
2.5.	Materiales, equipos y reactivos	18
2.5.1.	Material vegetal.....	18
2.5.2.	Equipos y materiales	19
2.5.3.	Reactivos.....	19
2.6.	Técnicas y métodos	20
2.6.1	Preparación del material vegetal	20
2.6.2.	Extracción de alcaloides.....	20
2.6.3.	Identificación de alcaloides por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)	22
2.7.	Preparación de soluciones	23
2.7.1.	Preparación de reactivos	23
2.7.2	Preparación de sustrato	23
2.7.3	Preparación de enzimas.....	23
2.8	Diluciones de galantamina	24
2.9	Diluciones de extracto de alcaloides de <i>Phaedranassa brevifolia</i>	24
2.10	Ensayos de inhibición enzimática de AChE y BuChE.....	24
2.10.1	Cálculo de IC ₅₀	25

CAPÍTULO III

3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1	Obtención del extracto alcaloidal de <i>Phaedranassa brevifolia</i>	26
3.2	Identificación de alcaloides de <i>Phaedranassa brevifolia</i> por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas.....	26
3.3	Porcentaje de inhibición de AChE por el extracto alcaloidal de <i>Phaedranassa brevifolia</i>	29
3.3.1	Primer screening de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>Phaedranassa brevifolia</i>	30
3.4	Porcentaje de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal de <i>Phaedranassa brevifolia</i>	32
3.4.1	Primer screening de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>Phaedranassa brevifolia</i>	32

CONCLUSIONES.....	34
RECOMENDACIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1.	Representación esquemática del sitio activo de la colinesterasa.....	9
Figura 2-1.	Geodistribución de la familia Amaryllidaceae.....	10
Figura 3-1.	Mapa de distribución de <i>Phaedranassa spp</i>	11
	en Ecuador los cuadrados muestra más de una especie	11
Figura 4-1.	Especies de <i>Phaedranassa</i> encontradas en Ecuador	11
Figura 5-1.	Especie <i>Phaedranassa brevifolia</i>	12
Figura 6-1.	Nuevos registros de <i>P. brevifolia</i>	13
Figura 7-1.	Estructura de los 9 tipos de alcaloides de Amaryllidaceae, con la numeración propuesta por Ghosal et al (1985).....	14
Figura 8-1.	Estructura de la galantamina	14
Figura 9-1.	Representación esquemática del principio del método de Ellman	15
Figura 1-3:	Estructura de la 11-hydroxyvittatina.....	27
Figura 2-3:	Estructura de la hamayna.	27
Figura 3-3:	Estructura de pancratinina C.	28
Figura 4-3:	Estructura de la vittatina	28
Figura 5-3:	Estructura de la crinina.	28
Figura 6-3:	Estructura de la hemantamina	29
Figura 7-3:	Estructura de la galantamina.	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2.	Equipos y materiales utilizados en los diferentes procedimientos.....	19
Tabla 2-2.	Reactivos utilizados en las diferentes etapas del procedimiento	19
Tabla 3-2.	Concentraciones del extracto alcaloidal de <i>Phaedranassa</i>	24
	<i>brevifolia</i> empleadas en el ensayo de inhibición de AChE y BuChE	24
Tabla 1-3.	Resultados obtenidos del extracto alcaloidal de <i>Phaedranassa brevifolia</i>	26
Tabla 2-3.	Alcaloides identificados en la especie vegetal <i>Phaedranassa brevifolia</i> por CG-ME	27
Tabla 3-3.	Porcentaje de inhibición de AChE del primer	30
	screening del extracto de <i>Phaedranassa brevifolia</i>	30
Tabla 4-3.	Resultados obtenidos en la actividad inhibitoria del extracto.....	30
	alcaloidal de <i>Phaedranassa brevifolia</i> sobre AChE expresada como IC ₅₀	30
Tabla 5-3.	Porcentaje de inhibición de AChE del primer	32
	screening del extracto de <i>Phaedranassa brevifolia</i>	32
Tabla 6-3.	Porcentaje de inhibición de BuChE del segundo.....	33
	screening del extracto de <i>Phaedranassa brevifolia</i>	33
Tabla 7-3.	Resultados obtenidos de la actividad inhibitoria del extracto.....	33
	alcaloidal de <i>Phaedranassa brevifolia</i> sobre BuChE expresada como IC ₅₀	33

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Recolección de la especie *Phaedranassa brevifolia*, entre Imbabura y Carchi
- ANEXO B:** Preparación del material vegetal
- ANEXO C.** Obtención del extracto crudo
- ANEXO D.** Extracción de alcaloides de *Phaedranassa brevifolia*
- ANEXO E.** Obtención del extracto de alcaloides totales.
- ANEXO F.** Determinación de la actividad inhibitoria enzimática
- ANEXO G.** Curva de inhibición de acetilcolinesterasa de la fracción alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia* empleada en el cálculo del IC_{50} realizado en 3 días consecutivos
- ANEXO H.** Curva de inhibición de butirilcolinesterasa de la fracción alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia* empleada en el cálculo del IC_{50} realizado en 3 días consecutivos.
- ANEXO I.** Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos No. MAE-DNB-CM-2015-0054
- ANEXO J.** Autorización de orden de movilización de especímenes Nro. MAE-CGZ1-DPAI-2018-0016-O.
- ANEXO K.** Guía de movilización de especímenes de flora silvestres

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia*, sobre las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), tomando en cuenta que *Phaedranassa brevifolia* es una especie endémica del Ecuador perteneciente a la familia Amaryllidaceae. A partir del extracto bruto obtenido por maceración del bulbo seco y triturado en metanol, se realizó la extracción de alcaloides mediante un protocolo basado en cambios de pH y uso de solventes orgánicos. La determinación de la actividad inhibitoria fue desarrollada en base a la metodología de Ellman *et al* con modificaciones, empleando galantamina como compuesto de referencia. Se realizaron curvas de inhibición enzimática y a partir de la ecuación de la recta obtenida se calculó el IC₅₀ como media de tres repeticiones individuales, cada una por triplicado. Además se identificaron los alcaloides presentes en la muestra mediante el análisis de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas, lo que permitió evidenciar la existencia de 11 alcaloides, de los cuales existen 4 compuestos no identificados, m/z 303^{*a}; [M=303]^{*b}, m/z 303^{*a}; [M=273]^{*b}, m/z 109 (homolycorina-tipo), m/z 125 (homolycorina-tipo), siendo el de abundancia significativa m/z 303^{*a}; [M=303]^{*b} (33,49%) y 7 identificados, pancratina C, haemantamina, vittatina/crinina, galantamina y el más abundante dentro de este grupo es 11-hydroxivittatina/hamayna (18,80%). Los resultados obtenidos mostraron que el extracto alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia* presentó un IC₅₀ de 3,45±0,29 µg/mL para acetilcolinesterasa y un IC₅₀ de 58,89±0,55 µg/mL para butirilcolinesterasa, en referencia a galantamina que presenta valores de IC₅₀ de 0,30±0,02 µg/mL para AChE y para BuChE un IC₅₀ de 5,00±0,36 µg/mL. Frente a ambas colinesterasas, el extracto alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia* presenta una alta actividad inhibitoria. Finalmente, se recomienda realizar más estudios fitoquímicos y de actividad biológica debido al particular perfil fitoquímico que presenta la especie *Phaedranassa brevifolia*.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FITOQUÍMICA>, <BULBO (*Phaedranassa brevifolia*)>, <ALCALOIDES>, <GALANTAMINA>, <ENFERMEDAD DE ALZHEIMER>, <COLINESTERASA>, <ACTIVIDAD INHIBITORIA >, <AMARYLLIDACEAE>.

SUMMARY

The objective of the present study was to determine the inhibitory activity of the alkaloidal fraction of *Phaedranassa brevifolia*, on the acetylcholinesterase enzymes (ACHE) and butyrylcholinesterase (BuChE), taking into account that *Phaedranassa brevifolia* is an endemic species of Ecuador belonging to the Amaryllidaceae family. From the crude extract obtained by the dry bulb maceration and crushed in methanol, the extraction of alkaloids was carried out by means of a protocol based on pH changes and the use of organic solvents. The determination of the inhibitory activity was developed in based of the Ellman methodology *et al* with modifications, using galantamina as a reference compound. Enzymatic inhibition curves were made and from the equation of the obtained line the IC₅₀ was calculated as an average of three individual repetitions, each one in triplicate. In addition, the alkaloids present in the sample were identified through the analysis of Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry, which allowed to show the existence of 11 alkaloids, of which there are 4 unidentified compounds, m/z 303^{*a}; [M=303]^{*b}, m/z 303^{*a}; [M=273]^{*b}, m/z 109 (homolycorin-type), m/z 125 (homolycorin-type), with significant abundance in m/z 303^{*a}; [M=303]^{*b} (33,49%) and 7 identified, pancratin C, haemantamine, vittatin/crinin, galantamina and the most abundant within this group is 11-hydroxyvittatin / hamayna (18.80%). The obtained results showed that the alkaloidal extract of *Phaedranassa brevifolia* presented an IC₅₀ of 3,45±0,29 µg/mL for acetylcholinesterase and an IC₅₀ of 58,89±0,55 µg/mL for butyrylcholinesterase, in reference to galantamina that presents IC₅₀ values of 0,30±0,02 µg/mL for Ache and for BuChe an IC₅₀ of 5,00±0,36 µg/mL. In front of both colinestrases, the alkaloidal extract of *Phaedranassa brevifolia* shows a high inhibitory activity. Finally, it is recommended to carry out more phytochemical studies and biological activity due to the particular phytochemical profile of the species *Phaedranassa brevifolia*.

Key words: <BIOCHEMISTRY>, <PHYTOCHEMICAL>, <BULB (*Phaedranassa brevifolia*)>, <ALKALOIDS>, <GALANTAMINE>, <ALZHEIMER'S DISEASE>, <CHOLINESTERASE INHIBITORS>, <INHIBITORY ACTIVITY>, <AMARYLLIDACEAE>.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más común relacionada con la edad o envejecimiento, se caracteriza por una neurodegeneración progresiva del sistema nervioso central que eventualmente conduce a una disminución gradual de la función cognitiva y la demencia. (Rudolph E. Tanzi and Sangram S. Sisodia, 2007; Dubois *et al.*, 2016).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la demencia afecta a 50 millones de personas en todo el mundo, de los cuales cerca del 60% viven en países con ingresos bajos y medios. De igual manera la OMS señala que cada año se registran alrededor de 10 millones de nuevos casos. Asimismo, se calcula que la población de 60 años o más, sufre demencia en determinada etapa de su vida en un 5% y 8%. Se prevé que el número de personas con demencia aumente a 82 millones en 2030 y 152 millones en 2050. Otras formas frecuentes son: la demencia por cuerpo de lewy, demencia vascular y un grupo de enfermedades que pueden contribuir a la demencia frontotemporal (Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas, 2018).

En el Ecuador no existen estadísticas puntuales acerca de la población que sufre la EA ya que la pérdida de memoria se considera como normal entre los adultos mayores, debido al existente desconocimiento sobre la prevención y determinación a tiempo de los síntomas de EA ya que no es un proceso normal del envejecimiento (Soria, 2016).

Estudios indican que, en el hospital del IESS de la provincia de Pichincha, en el área de neurología, de cada 15 pacientes, 5 sufren demencia. Esta condición aparece con frecuencia a partir de los 60 años, debido a causas seniles como el Alzheimer en un 80%. Por otro lado, la Universidad Central del Ecuador ha realizado un estudio de prevalencia en la provincia de Pichincha, en el que se analizaron a 402 adultos mayores de los cuales 146 presentaron resultados positivo para el deterioro cognitivo (Espinosa *et al.*, 2014). Sin embargo, en el Ecuador existen aproximadamente en el 2010, 74.000 personas que sufren algún tipo de demencia. En base a este número de personas se realiza diversas proyecciones y se estima que para el 2050 existan 356.000 personas con demencia, por lo tanto el porcentaje de incremento entre los años 2010 y 2050 es de 381%. (Wilson Hinojosa, 2017)

Las terapias aprobadas actualmente son tratamientos sintomáticos que tienen algún efecto sobre la función cognitiva. Las terapias dirigidas al β -amiloide han sido el enfoque para desarrollar un tratamiento de modificaciones de la enfermedad para la EA (Fish *et al.*, 2018), por lo que la FDA somete

a un análisis de acoplamiento a los mejores fármacos seleccionados, para verificar su afinidad de unión contra AChE (Hassan *et al.*, 2018).

La acetilcolinesterasa es un miembro de la proteína α/β hidrolasa, con un papel importante en la neurotransmisión mediada por acetilcolinesterasa; por lo tanto, la mayoría de los tratamientos farmacológicos están enfocados a la inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa jugando un papel fundamental en la neurotransmisión colinérgica en el cerebro reduciendo el metabolismo de acetilcolina (Li *et al.*, 2017; Hassan *et al.*, 2018).

Durante las últimas décadas, las mejores potencias mundiales están a la vanguardia del descubrimiento de fármacos en todas las disciplinas. Mediante las plantas se ha obtenido un número significativo de medicamentos exitosos, así las especies de Amaryllidaceae contienen una serie de fitoconstituyentes importantes que se han distinguido por su actividad biológica y por ende son una alternativa importante en el tratamiento del Alzheimer. (Nair and Staden, 2018).

La familia Amaryllidaceae tiene alrededor de 70 géneros y 1600 especies, siendo consideradas las nuevas fuentes inhibitorias de AChE, principalmente en el reino vegetal (Acosta, 2014). Actualmente, más de 300 alcaloides se han aislado de esta familia y se han podido clasificar en 9 subgrupos principales homogéneos de forma esquelética (Cortes *et al.*, 2015), considerando a la galantamina como uno de los metabolitos más destacados (Elisha *et al.*, 2013) debido a su acción sobre el sistema nervioso central, y su carácter selectivo hacia las enzimas AChE y BUCHE logrando potenciar la función colinérgica central, este Fármaco fue aprobado por la FDA como tratamiento para la EA (Ortiz *et al.*, 2012).

Ecuador es uno de los 17 países megadiversos del mundo, siendo el más rico en biodiversidad de flora y fauna, cuya distribución en el país es amplia ya que existen 36 especies, siendo 15 de estas endémicas del Ecuador (Oleas, Meerow and Francisco-ortega, 2013).

Entre los géneros de Amaryllidaceae se encuentra *Phaedranassa* que presenta 8 especies endémicas del Ecuador (Nora H. Oleas, ALAN W. Meerow, 2012), siendo una de ellas, *Phaedranassa brevifolia* especie en peligro de extinción, debido a que su población se ve afectada por la agricultura y ganadería (Oleas *et al.*, 2014).

Este estudio aporta de manera positiva al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo "CYTED", siendo la línea de investigación "La biodiversidad Iberoamericana como Fuente de Recursos Naturales para una Explotación Sostenible" "BIFRENES", por lo que los resultados obtenidos podrán emplearse como fuente bibliográfica para el desarrollo de nuevas investigaciones.

El objetivo de este trabajo de titulación es determinar la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal del *Phaedranassa brevifolia*, sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, tomando en cuenta que *Phaedranassa brevifolia* es propia del Ecuador ubicada en la provincia de Imbabura y de esta manera contribuir a la investigación en nuestro país y a la búsqueda de posibles mejoras en el tratamiento de la EA.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General:

- Determinar la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

Objetivos Específicos:

- Extraer la fracción alcaloidal del bulbo de *Phaedranassa brevifolia*, mediante procesos basados en cambios de pH y el uso de solventes orgánicos.
- Determinar la actividad inhibitoria media IC₅₀ de la fracción alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia*, a través del método Ellman *et al* con modificaciones.
- Identificar los alcaloides presentes en el extracto obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Enfermedad de Alzheimer

1.1.1 Historia

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita en 1906 por el médico alemán Alois Alzheimer, quien fue patólogo y psiquiatra. Cuando el doctor Alzheimer estudia el cerebro de Augusta una mujer de 51 años que ingresó al Hospital de Frankfurt en 1901, con un cuadro clínico, cuyas manifestaciones fueron: delirio, pérdida de memoria, alucinaciones, desorientación en tiempo y espacio, paranoia, alteraciones de conducta, un grave trastorno de lenguaje y finalmente la muerte. El doctor Alzheimer encuentra que la corteza cerebral es más estrecha de lo normal y que además, existen dos tipos de anomalías, que actualmente se llaman placas amiloideas y nudos neurofibrilares (Singh *et al.*, 2013; Fish *et al.*, 2018).

1.1.2 Descripción

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia y es un trastorno neurodegenerativo multifacético, caracterizado a nivel molecular por plegamiento y agregación de proteínas, estrés oxidativo, anomalías mitocondriales y procesos neuroinflamatorios (Singh *et al.*, 2013). El péptido β -amiloide 1-42 es el componente principal de las placas neuríticas y se asocia con el estrés oxidativo, así como con la disfunción de la neurotransmisión colinérgica (Hassan *et al.*, 2018).

La EA se caracteriza por un inicio gradual y, una progresión de los déficits en más de una área de la cognición, que incluye la memoria episódica, cambios de humor y comportamiento, trastorno del lenguaje y la atención (Singh *et al.*, 2013). Hay más de 35 millones de personas afectadas por enfermedad Alzheimer cada año y ese número se espera duplicarse en veinte años (Hassan *et al.*, 2018).

Existen dos maneras de manifestar la EA las cuales son: enfermedad de Alzheimer esporádica, que se caracteriza por un declive progresivo y severo en la cognición aumentando la muerte de las neuronas y, la enfermedad de Alzheimer Familiar se desarrollan más rápido y es causada por mutaciones en los componentes de la apolipoproteína E4, la presenilina-2 y la sortilina relacionada con el receptor 1 (Singh *et al.*, 2013).

1.1.3 Factores de riesgo

Estos factores incluyen una variedad de cambios cerebrales que inician hasta 20 años antes de que se presenten los síntomas, los científicos consideran que los síntomas de la EA avanzada representa el inicio de esta enfermedad. Al principio el individuo puede funcionar normalmente con estos cambios cerebrales (Association, 2017).

- **Edad:** Este es el mayor factor de riesgo para el Alzheimer, pero esta enfermedad no es parte normal del envejecimiento. La mayoría de las personas diagnosticadas con Alzheimer tiene 65 años y se denomina "inicio más joven".
- **Historia Familiar:** Las personas que tienen un padre o hermano/a con la EA tienen más probabilidad de desarrollar la enfermedad. Las probabilidades aumentan para aquellas personas que presentan más de un pariente de primer grado con esta enfermedad.
- **Apolipoproteína E34:** Los individuos que poseen la forma 34 del gen apolipoproteína E, tiene un mayor riesgo de desarrollar la EA. Existen tres formas comunes de del gen APOE (32, 33, 34). Todos heredamos una forma del gen APOE de cada padre. Aquellos que heredan un gen APOE34 tienen mayor riesgo a desarrollar la EA, a una edad más temprana que aquellos que heredan 32 o 33 del gen APOE.

1.1.4 Síntomas

En promedio una personas puede vivir entre 8 a 20 años, desde la aparición de los síntomas (Espinosa *et al.*, 2014). El síntoma más común de la EA es la pérdida de memoria, a lo que se le asocia alteraciones de otras funciones mentales.

Síntomas asociados a la conducta

- Deambulación errática sin rumbo ni objetivo.
- Conducta desafiante.
- Agresividad física o verbal.
- Tendencia a repetir acciones sin ser capaces de finalizarlas.
- Alteración del sueño y la conducta alimentaria.

Síntomas psicológicos

- Alteraciones de la personalidad, volviéndose irritable, infantil, apática, suspicaz.
- Es común en el 50% de los casos presente depresión.
- Tendencia a presentar cambios bruscos en sentimientos y expresiones emocionales.
- Creencias falsas que se fundamentan en conclusiones incorrectas sobre la realidad.

Los síntomas que se presenta en las fases finales de la EA, tenemos: el deterioro de la musculatura, la cual desencadenara problemas como incontinencia urinaria o fecal (Martinez, 2017).

1.1.5 Hipótesis del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

La patogenia de la EA aún es incierta, pero se ha planteado hipótesis en base a los diversos factores causales (Singh et al., 2013). De esta manera se presentan las siguientes hipótesis:

- **Hipótesis colinérgica**

La pérdida de la función de la memoria es asociada a la degeneración de las neuronas. Peter Davies en 1976 encontró un vínculo entre los síntomas clínicos de la enfermedad y los déficits colinérgicos, fue un hito porque abrió la puerta a la neuroquímica moderna.

En esta hipótesis la deficiencia de acetilcolina en el cerebro se puede dar por la disminución de la producción de neurotransmisores o la actividad amplificada de la acetilcolinesterasa. Esta hipótesis indica que el aumento colinérgico mejorará la cognición en la EA (Singh et al., 2013).

- **Hipótesis amiloide**

La EA es causada por el procesamiento anormal de β -amiloide. En 1984, se descubrió que el bloqueo de construcción del péptido amiloidogénico era una proteína beta amiloide que forma las fibrillas amiloides en las placas neuríticas (Lobbens et al., 2017).

- **Hipótesis tau**

La hipótesis de proteínas tau se enfoca en la aparición de ovillos neurofibrilares que producen la desintegración de los microtúbulos, colapsando el transporte de la neurona. Esto puede conducir a disfunciones en la comunicación bioquímica entre las neuronas y, posteriormente, ocasionan la muerte de las células (Singh *et al.*, 2013)

1.1.6 Tratamiento de Alzheimer

No existe cura para el Alzheimer, debido a que el desarrollo del tratamiento se ha visto obstaculizado por la retrospectiva, de que los tratamientos para síntomas similares en otros trastornos, también, pueden ser eficaz en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Lyketsos and Miller, 2013). Por lo que todo tratamiento es paliativo que permite disminuir el avance de la EA.

- **Tratamiento farmacológico**

Desde la década de 1970, se ha demostrado que el sistema colinérgico tiene un papel importante en la cognición, por tanto, la estrategia de tratamiento para la enfermedad de Alzheimer es aumentar la acetilcolina, a través de la administración de compuestos que inhiben la acetilcolinesterasa, enzima que cataliza su degradación. Actualmente hay tres aprobadas por la FDA inhibidores de la colinesterasa: rivastigmina, donepezilo y galantamina (Lyketsos and Miller, 2013).

Debido a los múltiples efectos secundarios causados por estos fármacos, en la actualidad se estudia otras alternativas, como por ejemplo: la pirazolina, que además de tener una actividad inhibitoria para acetilcolinesterasa, presenta una actividad antioxidante importante (Chigurupati *et al.*, 2016). Sin embargo, los beneficios a largo plazo de la inhibición de colinesterasa son discutibles, aunque algunos estudios afirman la eficacia a largo plazo, otros no muestran una mejora en la tasa de progresión a la EA, comparando con placebos después de 3 años (Lyketsos and Miller, 2013).

- **Tratamiento no farmacológico**

Dentro de este tratamiento tenemos el entrenamiento de la memoria, musicoterapia y ejercicio físico frecuente, ayudando a mantener o mejorar las funciones cognitiva y evitando trastornos de conducta como depresión, insomnio, agresividad, agitación y apatía (Association, 2017).

1.2 Acetilcolinesterasa

El doctor Ludwig Laqueur, inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChE), fue utilizado en el glaucoma en 1876, sin conocer la actividad biológica del fármaco. La acetilcolinesterasa pertenece a la familia de la proteína del pliegue de hidrolasa α/β hidrolasa. Su principal función fisiológica es la rápida hidrólisis de la acetilcolina en la sinapsis y la unión neuromuscular, dando como resultado el impulso nervioso (Singh *et al.*, 2013, p. 168).

La estructura tridimensional fue determinada en el año de 1991, posee dos sitios de unión al sustrato de ligandos separados; además posee un sitio catalítico y un sitio aniónico (Singh *et al.*, 2013, p. 168).

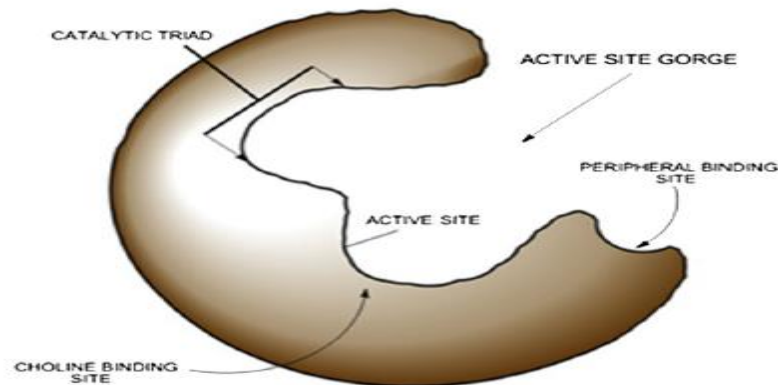


Figura 1-1. Representación esquemática del sitio activo de la colinesterasa
Fuente: (Singh *et al.*, 2013, p. 168).

1.3 Butirilcolinesterasa

La enzima butirilcolinesterasa es una hidrolasa, por tanto, cataliza la hidrólisis de la acetilcolina con menor especificidad que AChE, mientras que muestra su máxima actividad sobre succinilcolina. Es una enzima que se metaboliza en el hígado, cuando existe una alteración hepática, esta enzima disminuye en los hepatocitos afectados (Chigurupati *et al.*, 2016).

1.4 Familia Amaryllidaceae

1.4.1 Características generales

Amaryllidaceae es una familia monocotiledónea ampliamente distribuida, representada por aproximadamente 70 géneros y 1600 especies en todo el mundo (Acosta, 2014). América del Sur (28 género) y Sudáfrica (19 géneros) son las regiones con mayor diversidad. Las Amaryllidaceae ocupan

muchos hábitats diferentes: lugares estacionales secos, charcas efímeras, selvas de sotobosques y ríos (Cedr, Arco-aguilar and Est, 2010).

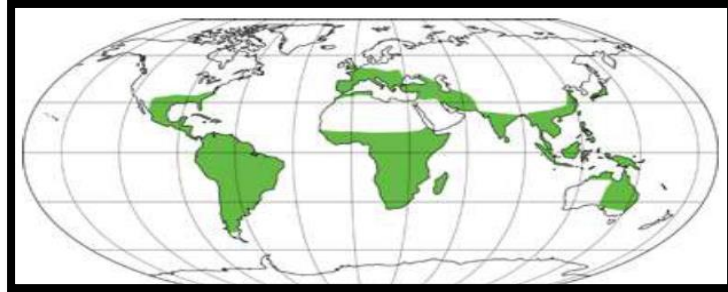


Figura 2-1. Geodistribución de la familia Amaryllidaceae

Fuente: (Cedr, Arco-aguilar and Est, 2010; Acosta, 2014)

Las plantas que pertenecen a la familia Amaryllidaceae son conocidas por producir un grupo exclusivo de alcaloides, aislado de plantas de todos los géneros de esta familia. Desde el aislamiento de licorina de *Narcissus pseudonarcissus* en 1877, más de 500 alcaloides han sido aislados de plantas de esta familia (Cedr, Arco-aguilar and Est, 2010; Ronsted *et al.*, 2012).

Amaryllidaceae está conformada por tres subfamilia de las cuales Amaryllidaceae es las más distintiva, seguido de Agapanthoideae y Allioideae Amaryllidoideae es una subfamilia ampliamente distribuida de 59 géneros y alrededor de 850 especies. (Ronsted *et al.*, 2012).

En Ecuador existen 36 especies de esta familia pertenecientes a varios géneros, dentro de las cuales están: *Phaedranassa brevifolia*, *Phaedranassa dubia*, *Phaedranassa cuencana*, *Phaedranassa tunguraguae*, *Phaedranassa glauciflora*, *Phaedranassa viridiflora*, *Phaedranassa schizantha*, *Eucharis candida*, *Eucharis formosa*, *Eucharis ruthiana*, *Eucharis grandiflora*, *Eucrosia aurantiaca*, *Eucrosia mirabilis*, *Stenomesson auratiacum*, *Crinum amabile* e *Hippeastrum punceum*. Esta familia de plantas se encuentra distribuida entre los 0 y 4000m de altitud, valles secos interandinos, bosques andinos y bosques del litoral (Nora H. Oleas, ALAN W. Meerow, 2012; Oleas *et al.*, 2014).

1.4.2 *Phaedranassa*

Phaedranassa Herbert (1845) comprende 9 especies endémicas del Ecuador por lo que es considerado un género pequeño de la familia Amaryllidaceae. Debido a la distribución restringida y su hábitat amenazado por la agricultura y ganadería, cinco se han declarado en peligro de extinción (Minga *et al.*, 2015).

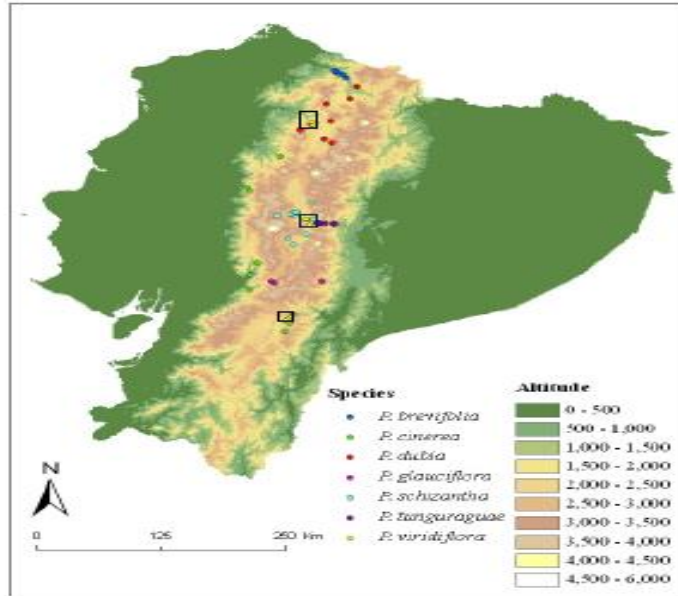


Figura 3-1. Mapa de distribución de *Phaedranassa spp* en Ecuador los cuadrados muestra más de una especie
Fuente: (Oleas, 2011)

Las especies endémicas de *Phaedranassa* en Ecuador son; *P. cinérea*, *P. dubia*, *P. brevifolia*, *P. glauciflora*, *P. schizantha*, *P. tunguraguae*, *P. viridiflora* y *P. cuencana* (Oleas et al., 2014).



Figura 4-1. Especies de *Phaedranassa* encontradas en Ecuador

a) *P. brevifolia*; b) *P. cinérea*; c) *P. dubia*; d) *P. glauciflora*; e) *P. schizantha*; f) *P. tunguraguae*; g) *P. viridiflora*; h) arriba *P. viridiflora*: abajo *P. dubia*.

Fuentes: (Oleas, Meerow and Francisco-ortega, 2013)

El género *Phaedranassa* presenta bulbos cubiertos por túnicas marrones y raíces contráctiles., por lo que son conocidas como "cebolla falsa". o "papa de lobo". Tiene una o dos hojas tercioladas que, por lo general, se encuentran ausentes en floración. Presenta seis pétalos que son de colores rojo, amarillo, rosa o naranja. Desarrolla inflorescencia pseudo umbrela con 6 a 20 flores tubulares. El ovario es inferior y tiene múltiples óvulos. El fruto es una cápsula que posee muchas semillas y son generalmente de forma plana (Nora H. Oleas, ALAN W. Meerow, 2012).

1.4.2.1 *Phaedranassa brevifolia*

Phaedranassa brevifolia fue descubierta por primera vez a partir de un solo espécimen recolectado en 1978 en el norte de Ecuador, en un hábitat clasificado como matorral seco de montano, caracterizado por un bosque seco espinoso. La biología reproductiva de *P. brevifolia* es desconocida, pero el patrón fenológico general de este género es florecer una vez al año antes de la estación húmeda (Oleas *et al.*, 2014; Minga *et al.*, 2015). Las hojas están ausentes antes de la floración, lo que dificulta la detección de la especie en esa época del año. En la floración cada planta es un tallo de 39-56 cm, con cinco o siete flores en forma de embudo. Después de un extenso estudio en 1999, la especie se encontró en un área de menos de cuatro km². Una de las dificultades para encontrar nuevos registros de *P. brevifolia* es el pequeño tamaño de la planta (Oleas *et al.*, 2014).



Figura 5-1. Especie *Phaedranassa brevifolia*

Fuente: (Oleas *et al.*, 2014)

Se conoce cinco poblaciones con menos de cien individuos cada una, localizadas en el valle seco del río Mira entre las provincias de Imbabura y Carchi. Sus poblaciones están siendo afectada por la agricultura y ganadería por lo que esta especie se encuentra en el libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador en peligro de extinción (Oleas *et al.*, 2014).

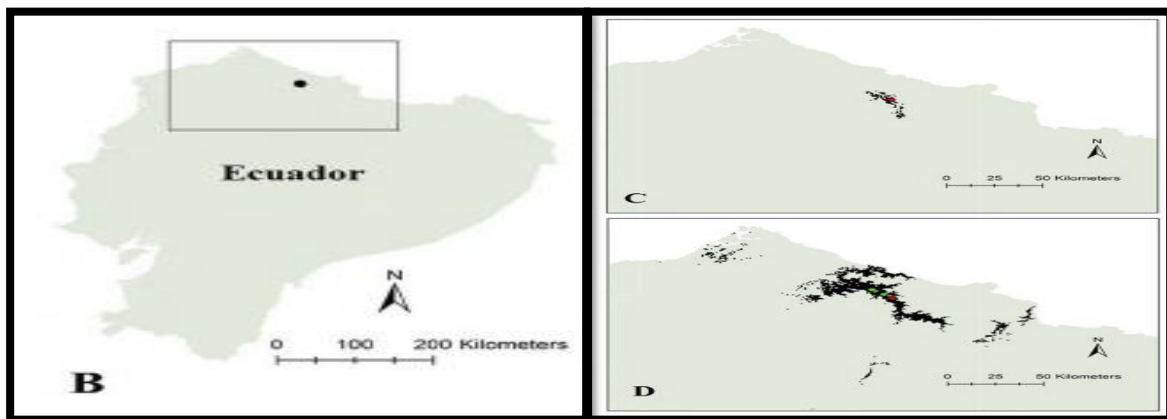


Figura 6-1. Nuevos registros de *P. brevifolia*.

B) mapa del Ecuador que muestra la distribución de *P. brevifolia*, C) modelos de distribución de especies (área negra) y (puntos rojos) registros conocidos anteriormente, D) nuevos registros de las especies (puntos verdes) y modelos de distribución de especies de áreas potencialmente adecuadas estimadas con el conjunto de datos combinados de nuevos y antiguos registros (zona negra).

Fuente: (Oleas *et al.*, 2014)

1.4.3 Alcaloides de Amaryllidaceae

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

Según su estructura los alcaloides de Amaryllidaceae son clasificadas en ocho tipos de esqueleto, para los cuales se representa en: norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, haemantamina, narciclasina, tazettina, montanina y galantamina (Cedr, Arco-aguilar and Est, 2010).

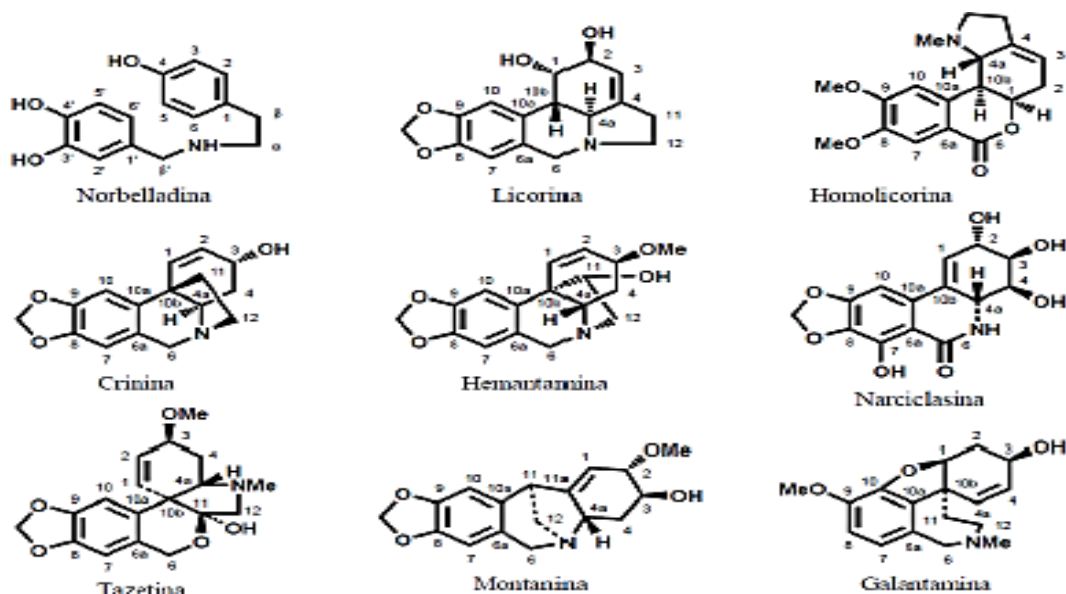


Figura 7-1. Estructura de los 9 tipos de alcaloides de Amaryllidaceae, con la numeración propuesta por Ghosal et al (1985)

Fuente: (Acosta, 2014, p. 2)

La familia Amaryllidaceae es bien conocida por su actividad farmacológica debido a su fuente de alcaloides, un enfoque importante para tratar la enfermedad de Alzheimer implica la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (Ortiz *et al.*, 2012).

Los alcaloides de Amaryllidaceae, presentan diversas actividades biológicas, como: acción antibacteriana, analgésica, antifúngica, antimalaria, antitumoral antiviral, entre otras (Jahn *et al.*, 2012, p. 61). Debido al potencial farmacológico que presentan estos alcaloides, se han realizado durante los últimos años, numerosos estudios a nivel mundial (Ortiz *et al.*, 2017). Los alcaloides de tipo galantamina tienen actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa, haciendo de la galantamina la segunda medicina más usada en el tratamiento de Alzheimer. (Acosta, 2014).

1.4.3.1 Galantamina

Se ha demostrado que los productos de plantas medicinales son fuentes potenciales para el descubrimiento de nuevos fármacos. La galantamina fue aislado por primera vez del bulbo de *Galanthus woronowii* en 1952, demostrando ser un potente inhibidor reversible de AChE usado para tratar la enfermedad de Alzheimer únicamente durante las etapas de leve a moderado (Zhan *et al.*, 2017, p. 3).

La galantamina se emplea como tratamiento de primera línea de la enfermedad de Alzheimer (Ortiz *et al.*, 2012, p. 13474). La FDA hasta la fecha solo aprobado cinco medicamentos para tratar la EA, de los cuales tres de ellos son inhibidores de acetilcolinesterasa, siendo uno galantamina (Zhan *et al.*, 2017, p. 3). En cuanto a su toxicidad, no ha presentado potencial mutagénico ni genotóxico.

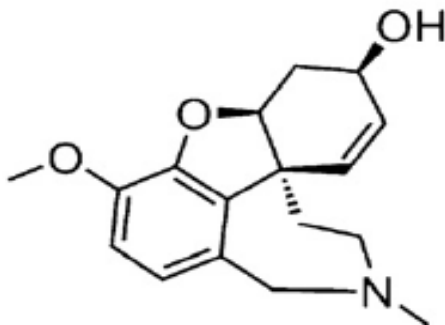


Figura 8-1. Estructura de la galantamina

Fuente: (Jahn *et al.*, 2012, p. 61)

La primera síntesis total de galantamina fue publicada por Borton y sus colaboradores en 1962. Hasta la fecha se ha descrito más de 30 rutas sintéticas; basándose en principalmente en la oxidación biomimética del fenol o en la reacción intermolecular de Herck. Por tal motivo las industrias farmacéuticas necesitan una inversión económica significativa para su aislamiento y purificación (Dong *et al.*, 2017, p. 4719).

En el 2001 Guillou y su equipo de trabajo desarrollaron un esquema para la síntesis de (±)-galantamina obteniendo un rendimiento global de 12%. Sin embargo, han impedido el desarrollo de este método de síntesis a gran escala debido al empleo de reactivos tóxicos y las condiciones extremas para las reacciones, así como la falta de disponibilidad de quipos. Por este motivo, se buscan cambios o alternativas a la estrategia del Guillou que permitan obtener la molécula con la eficiencia terapéutica esperada y con un alto porcentaje de rendimiento (Dong *et al.*, 2017).

1.5 Método Ellman

Es un método fotométrico para determinar la actividad de la acetilcolinesterasa. La actividad de la enzima se mide siguiendo el aumento de color amarillo al reaccionar con el ion ditiobisnitrobenzoato. teniendo lugar la siguiente reacción (Ellman, 1961)

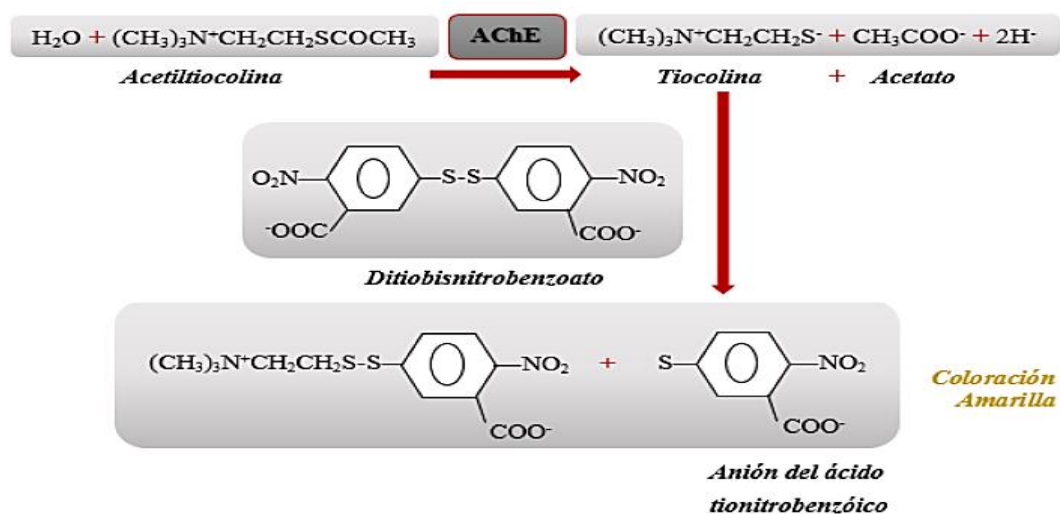


Figura 9-1. Representación esquemática del principio del método de Ellman

Fuente: (Ellman, 1961)

Este método es extremadamente sensible por lo que nos permite emplear concentraciones muy bajas de enzima, no obstante presenta una serie de desventajas, por ejemplo, el color que se detectaba

dependía del remanente del sustrato añadido lo cual podía arrojar resultados falsos si la actividad se veía disminuida (Ellman, 1961).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Tipo y diseño de investigación

El tipo de investigación del presente trabajo de titulación es descriptivo con un diseño experimental basado en la evaluación de la inhibición de dos enzimas, acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto alcaloidal de bulbos de *Phaedranassa brevifolia*.

2.1.1 Unidad de análisis

Extracto alcaloidal del bulbo de *Phaedranassa brevifolia*.

2.1.2 Población de Estudio

Bulbos de *Phaedranassa brevifolia*.

2.1.3 Tamaño de Muestra

Aproximadamente 200 g de la especie vegetal *Phaedranassa brevifolia*, que se obtuvo mediante la realización de un muestreo aleatorio simple.

2.2 Lugar de la recolección del material vegetal

El material vegetal de la especie *Phaedranassa brevifolia* de vida silvestre, se recolectó en el valle seco del río Mira, situado entre las provincias de Imbabura y Carchi. Esta investigación se encuentra 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". Además, el material vegetal se transportó desde la provincia de Imbabura hacia la ESPOCH y la Universidad Tecnológica Indoamérica con la orden de movilización Nro. MAE-CGZ1-DPAI-2018-0016-O.

2.2.1 Selección de muestra

La selección de la muestra se realizó en base a los siguientes criterios:

- Criterios de Inclusión: Especies vegetales en buen estado que presenten sus hojas, tallos, flores y frutos completos y con superficies integra.
- Criterios de Exclusión: Especies vegetales con daños por causa de animales o por factores ambientales como agua o viento, especies en descomposición o recolectadas por acciones mecánicas.

2.3 Lugar de investigación

La presente investigación experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), ubicado en la provincia de Chimborazo, cantón Riobamba, con el Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia (GIPRONAF). De igual manera se contó con la colaboración de la Universidad de Barcelona para la realización de los análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

2.4. Identificación botánica

La identificación fue realizada por la Dra. Nora Oleas, experta en plantas del género *Phaedranassa*, que desempeña sus funciones como botánica en el herbario de la Universidad Indoamérica (Quito – Ecuador).

2.5. Materiales, equipos y reactivos

2.5.1. Material vegetal

Aproximadamente 30 gramos del bulbo seco de *Phaedranassa brevifolia*, fueron acondicionados y reducidos a un tamaño cercano a los 20 gramos.

2.5.2. Equipos y materiales

Tabla 1-2. Equipos y materiales utilizados en los diferentes procedimientos

PROCEDIMIENTO	EQUIPOS	MATERIALES
Preparación del material vegetal	- Estufa con extracción de aire RedLine by Binder - Balanza analítica HDM - Molino Arthur H. Thomas C.O	
Obtención del extracto alcaloidal	-pH-metro -Sorbona -Rotavapor -Sonicador	-Frasco ámbar de 500 mL o 1000 mL -Probeta de 1000 mL y 100 mL -Vaso de precipitación de 500 mL y 250 mL -Balón de rotavapor de 500 mL -Embudo de separación de 500 mL -Vial de vidrio de 5 mL
Preparación de reactivos	-Agitador magnético con sus respectivos magnetos -pH-metro -Sorbona -Agitador vórtex	-Balón de aforo de 100 mL y 500 mL -Probeta de 100 MI -Espátula -Microespátula -Frascos ámbar de 500 mL -Pipeta graduada de 5 mL y 10 mL
Conservación de reactivos	-Congelador -Refrigerador	
Determinación de la actividad inhibitoria de las enzimas colinesterasas	-Lector de microplacas -Computadora -Cronómetro -Centrífuga -Agitador vórtex	-Papel aluminio -Piseta -Bloques de hielo -Rollos de papel tipo toalla- -Microplaca de 96 posillos -Dispensador de líquidos para pipeta multicanal -Puntas azules para micropipeta -Puntas amarillas para micropipeta -Tubos graduados falcon de 2 mL -Tubos de plástico graduados de 40 mL y 4 mL -Tubos eppendorf 5 mL y 0.5 mL -Microespátula -Desecador -Balón de aforo de 50 mL.
Identificación de alcaloides	-Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas	

Realizado por: Jessica Robles, 2018

2.5.3. Reactivos

Tabla 2-2. Reactivos utilizados en las diferentes etapas del procedimiento

ENSAYO	REACTIVO
Obtención del extracto crudo	Metanol CH ₃ -OH
	Ácido sulfúrico H ₂ SO ₄ (2 % V/V)

Extracción de Alcaloides	Éter etílico (C ₂ H ₅) ₂
	Hidróxido de amonio NH ₄ OH (25 % V/V)
	Acetato de etilo C ₄ H ₈ O ₂
	Sulfato de Sodio Anhidro Na ₂ SO ₄
	Goma arábiga
Determinación de la actividad inhibitoria de las enzimas colinesterasas	Ácido clorhídrico HCl 0,5 N
	Hidróxido de sodio NaOH 0,5 N
	Fosfato dipotásico K ₂ HPO ₄ 8 Mm
	Bifosfato de sodio Na ₂ PO ₄ 2,3 mM
	Cloruro de Sodio NaCl 0,15 M
	Fosfato de disodio Na ₂ HPO ₄
	Ácido 5,5,-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) DTNB
	Yoduro de acetiltiocolina ATC
	Yoduro de butirilcolina
	Acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus electricus</i>
	Butirilcolinesterasa de suero de equino
	Galantamina
	Agua desionizada

Realizado por: Jessica Robles, 2018

2.6. Técnicas y métodos

2.6.1 Preparación del material vegetal

Los bulbos de *Phaedranassa brevifolia* fueron limpiados minuciosamente y cortados en fragmentos pequeños de aproximadamente 1,5 cm. A continuación, éstos se dejaron secar en una estufa de extracción de aire durante 48 horas a 60 °C. Posteriormente, en un molino Arthur H. Thomas C.O, se trituró el material vegetal seco.

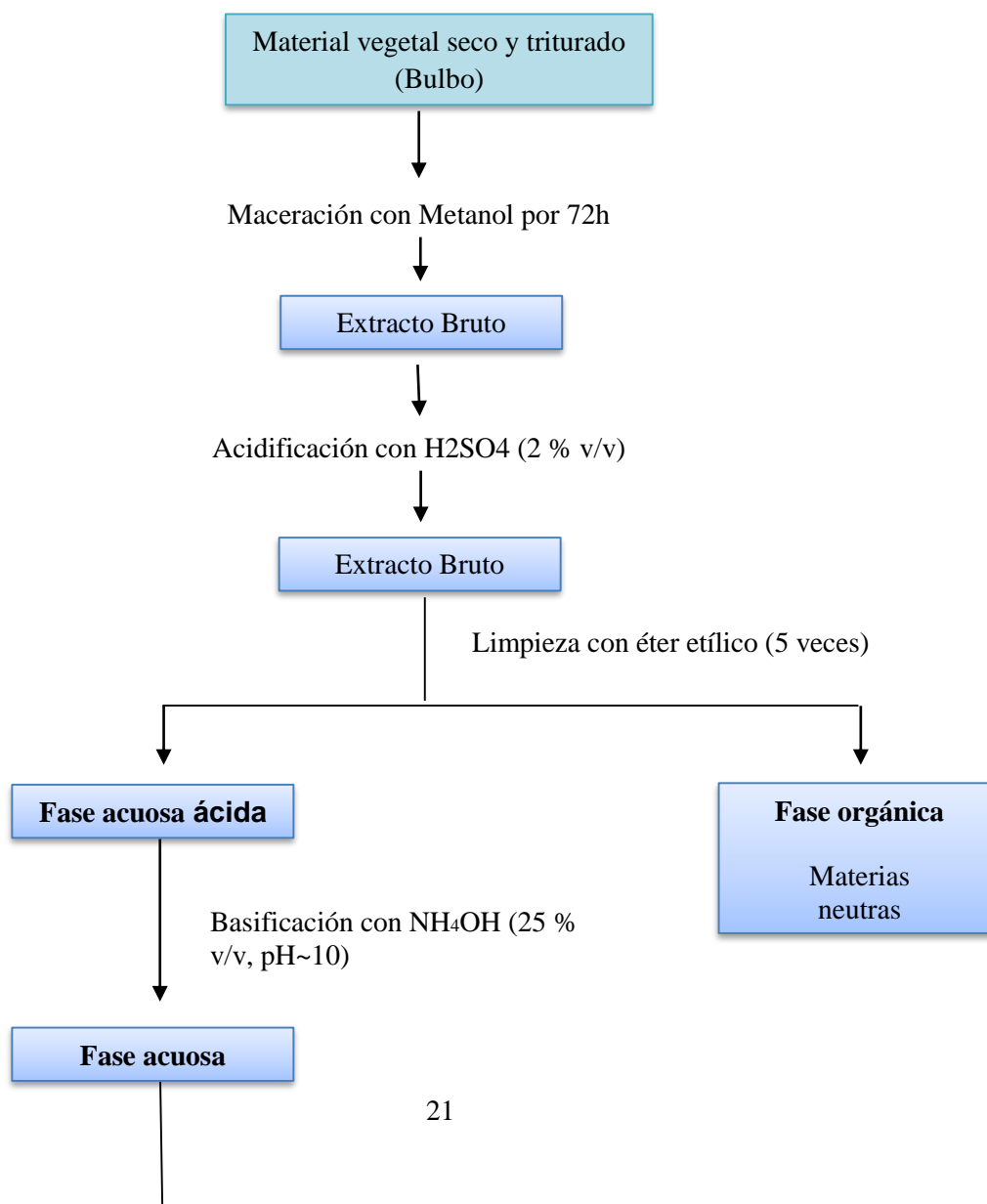
2.6.2. Extracción de alcaloides

En primer lugar, se procedió a realizar la maceración de 20 g de material seco en 800 mL de metanol durante 50 horas. Cabe añadir que el macerado se sometió a procesos de sonicación en intervalos de 1 a 2 horas, diariamente.

Se filtró el extracto metanólico y se evaporó el solvente en un rotavapor a presión reducida entre 0,6 y 0,4 bares y temperatura de 50 °C, consiguiendo de esta manera el extracto crudo.

Se utilizó H₂SO₄ (2 %v/v) para acidificar el extracto crudo y éter etílico para limpiar y desengrasar. En la fase etérea orgánica quedaron disueltos compuestos como ceras, mucílagos, clorofilas que no son de interés en este estudio y una fase acuosa que es rica en alcaloides (Acosta, 2014).

Se basificó la fase acuosa ácida con NH₄OH (25 % v/v) hasta pH de 10. A continuación se utilizó acetato de etilo en 5 repeticiones, para extraer los alcaloides. Posteriormente se añadió sulfato de sodio anhidro y goma arábiga para absorber toda el agua que pudo haber permanecido en el extracto. Finalmente la muestra se filtró y evaporó a presión reducida a una temperatura de 50°C y una presión entre 0,6 y 0,4 bar, consiguiendo así el extracto puro de alcaloides.



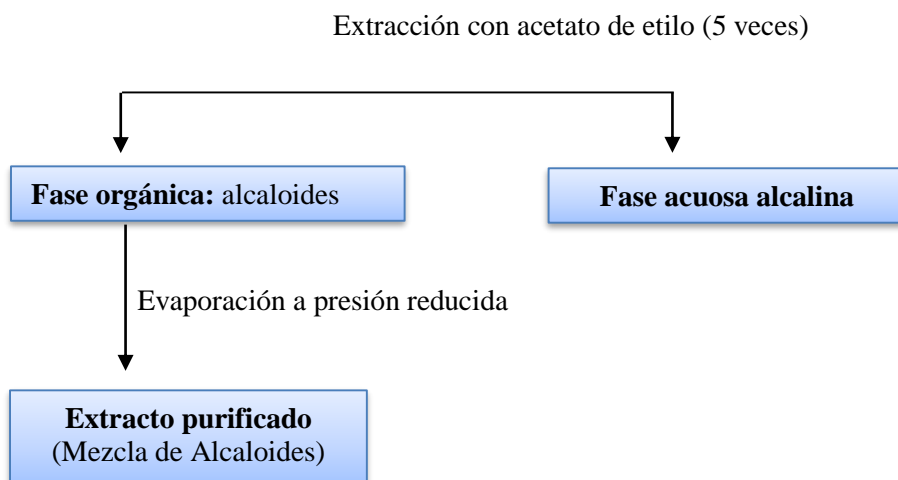


Figura 1-2. Esquema para la obtención de alcaloides de *Phaedranassa brevifolia*
Realizado por: Jessica Robles, 2018

2.6.3. Identificación de alcaloides por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

Para la realización de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se empleó un equipo cromatógrafo de gases Agilent, modelo 6890, acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico, modelo 5975, éste trabaja a 70 eV y en la fuente iónica a 230 °C.

El cromatógrafo presenta una columna SAPIENS-XS-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), además su fase estacionaria fue fenilmetilsilicona al 5 %. La temperatura tuvo cambios 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 se utilizó a una temperatura de 280 °C, con un flujo de helio de 0,8 ml/min, además y se usó el método *splitless*, el cual nos permite un importante incremento de sensibilidad. (Laura *et al.*, 2004).

El alcaloide de referencia fue la codeína. Para analizar los datos se empleó el software AMDIS 2.71 (NIST), este permitió confirmar la pureza de las señales y ejecutar el cálculo de los índices de retención.

2.7. Preparación de soluciones

2.7.1. Preparación de reactivos

- **Solución salina (Na_2HPO_4)**

Para la preparación de solución salina se pesó 7,12 g de fosfato de disódio, ($\text{Na}_2\text{HPO}_4(2\cdot\text{H}_2\text{O})$), en un matraz con agua desionizada, se ajustó el pH a 7,5 con HCl (0,5 N) y se conservó en refrigeración (4 °C).

- **Buffer fosfato salino (PBS)**

Para preparar esta solución se empleó fosfato dipotásico K_2HPO_4 a una concentración de 8 mM, bifosfato de sodio NaH_2PO_4 2,3 mM, cloruro de sodio NaCl 0,15 M y agua de grado farmacéutico. Se ajustó el pH a 7,5 utilizando hidróxido de sodio NaOH 0,5 N.

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

Se preparó a una concentración de 2 mg/mL. Se almacenaron en congelación (-20°C) en tubos eppendorf. Durante un periodo de 3 meses las soluciones son estables.

2.7.2 Preparación de sustrato

El sustrato de AChE se preparó empleando yoduro de ATC a una concentración de 1,7 mg/200µL. Por otro lado, el sustrato de BuChE consistió en yoduro de BTC 1,9 mg/200µL. Los sustratos se conservaron en tubos Eppendorf a una temperatura de -20°C.

Durante el ensayo en un balón de aforo, se agregó DTNB más ATC o BTC según corresponda la prueba y aforar con solución salina. Se cubrió con papel aluminio y conservó a temperatura de 4°C

2.7.3 Preparación de enzimas

- **Acetilcolinesterasa (AChE)**

Se utilizó una concentración de 0.195 U/mL. Se almacenaron en tubos eppendorf en congelación (-20°C).

Butirilcolinesterasa (BuChE)

Se utilizó una concentración de 0,260 U/mL. Se almacenaron en tubos eppendorf en congelación (-20°C).

2.8 Diluciones de galantamina

Se utilizaron las siguientes concentraciones de galantamina: $1 \cdot 10^{-3}$ M, $1 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M, $0,5 \cdot 10^{-5}$ M, $1 \cdot 10^{-6}$ M, $0,5 \cdot 10^{-6}$ M, $1 \cdot 10^{-7}$ M., las cuales se conservaron en refrigeración a 4°C.

2.9 Diluciones de extracto de alcaloides de *Phaedranassa brevifolia*

Partiendo del extracto puro se preparó una solución madre de 3mg/mL. Para la homogenización de la muestra con el solvente y la completa disolución de los alcaloides, se aplicaron baños de ultrasonido en combinación con agitador vórtex.

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

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

Tabla 3-2. Concentraciones del extracto alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia* empleadas en el ensayo de inhibición de AChE y BuChE

Nº dilución	Conc. (µg/mL) del extracto para AChE	Conc. (µg/mL) del extracto para BuChE
1	10	250
2	5	200
3	2,5	150
4	1	100
5	0,5	50
6	0,1	25

Realizado por: Jessica Robles, 2018

Las diluciones se conservaron en refrigeración

2.10 Ensayos de inhibición enzimática de AChE y BuChE

Se empleó el método de Ellman et al. con algunas modificaciones, (Ellman *et al.*, 1961; Ortiz *et al.*, 2016) para ello se colocaron en los pocillos correspondientes a las muestras 50 µL del extracto alcaloidal o

del estándar galantamina disuelto en PBS y 50 µL de AChE o BuChE disueltas en la misma solución, según el ensayo que se estuvo realizando.

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

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

2.10.1 Cálculo de IC₅₀

- **Porcentaje de inhibición**

Se calcula mediante la fórmula:

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

En donde:

M Lectura de absorbancia de muestra

C Lectura de absorbancia de control

BM Lectura de absorbancia de blanco muestra

BC Lectura de absorbancia de blanco control

Se obtuvo una curva empleando los promedios de los porcentajes de inhibición (eje de ordenadas) calculados, y la concentración de los extractos empleados (eje de abscisas). Esto generó una línea de tendencia logarítmica con su respectiva ecuación, de la cual se procedió a calcular el IC₅₀, cuyo valor representa la concentración del extracto alcaloidal a la cual existe un 50 % de inhibición de las enzimas.

El IC₅₀ es el resultado ± desviación estándar de tres repeticiones individuales.

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente capítulo contiene los resultados de la identificación y la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia*, obtenidos a partir de los métodos mencionados en el capítulo anterior.

3.1 Obtención del extracto alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia*

La extracción de alcaloides se basó en el cambio de pH y el uso de solventes orgánicos. Partiendo de 11 g de bulbos secos y triturados de *Phaedranassa brevifolia*, se obtuvieron 5,2 mg de extracto alcaloidal, lo cual presentó un rendimiento de 0,049 %.

Tabla1-3. Resultados obtenidos del extracto alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia*

Material Vegetal	Peso inicial de muestra seca (g)	Volumen de metanol (mL)	Extracto rico en alcaloides (mg)	% Rendimiento de alcaloides
Bulbo de <i>Phaedranassa brevifolia</i>	11	600	5,2	0,049 % $\frac{\text{Rendimiento real}}{\text{Rendimiento teórico}} \times 100$ (PONCE, 2010)

Realizado por: Jessica Robles, 2018

El rendimiento obtenido al ser comparado con otras especies como es el caso de *P. glauciflora* y *P. tunguraguae*, teniendo un rendimiento de 0,15 % y 0,3 % respectivamente (Baldeón, 2018; Montero, 2018), nos muestra que el rendimiento de *Phaedranassa brevifolia* es inferior, Joaquín Azcón et al, en el capítulo 13 de "fotosíntesis, factores ambientales y cambio climático", mencionan que este resultado puede ser por algunos factores entre ellos tenemos: factores ambientales ya que la especie es recolectada de un valle seco, el ecosistema que presenta la especie ya que habita en un bosque seco espinoso y finalmente la recolección de la especie ya que fue recolectada cuando no se encontraba en floración. (Azcón J et al, 2013).

3.2 Identificación de alcaloides de *Phaedranassa brevifolia* por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas

Se obtuvieron los resultados tras haber realizado la identificación de alcaloides de *Phaedranassa brevifolia* por CG-EM.

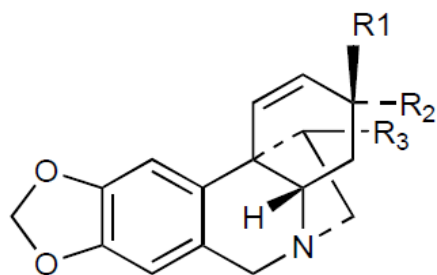
Tabla2-3. Alcaloides identificados en la especie vegetal *Phaedranassa brevifolia* por CG-ME

Alcaloides	Tiempo de Retención (RT)	Índice de Retención (RI)	% de abundancia Total
Galantamina	22,223	2386,3	>0,1
codeína*	22,922	2386,3	29,80
Vittatina/crinina	23,480	2469,3	3,93
m/z 303 ^{*a} ; [M=303] ^{*b}	23,808	2491,3	33,49
m/z 303 ^{*a} ; [M=273] ^{*b}	23,904	2497,8	<0,1
Pancratina C	25,168	2582,4	5,39
haemantamina	25,849	2628,1	<0,1
11-hydroxivittatina/hamayna	26,961	2702,7	18,80
m/z 109 (homolycorina-tipo)	28,285	2791,4	6,25
m/z 125 (homolycorina-tipo)	29,406	2866,6	<0,1

Fuente: Universidad de Barcelona
Realizado por: Jessica Robles, 2018

Se encontraron un total de 11 alcaloides del extracto purificado de *Phaedranassa brevifolia*, de los cuales se identificaron 7 y 4 no fueron identificados, siendo la molécula con m/z 303^{*a}; [M=303]^{*b} la más abundante con 33,49 %. Por ello, es importante la identificación de las moléculas no identificadas mediante resonancia magnética nuclear, para confirmar su identidad.

De igual manera, de los 7 identificados uno de ellos abarca el mayor porcentaje, siendo 11-hydroxivittatina/hamayna, con el 18,80 %. Según el análisis con espectrometría de masas no se puede afirmar con seguridad de cuál de los dos se trata, ya que estamos delante de un caso de epímeros, en los cuales la posición del grupo (OH) varía (ver figura 1-3 y 2.3). Para confirmar la identidad se tendría que recurrir al método de Dicroísmo Circular (Bastida *et al.*, 2002).



11-hydroxyvittatine: $\bar{R}_1=OH$, $\bar{R}_2=H$, $\bar{R}_3=OH$

Figura 1-3: Estructura de la 11-hydroxyvittatina

Fuente: (Cedr, Arco-aguilar and Est, 2010)

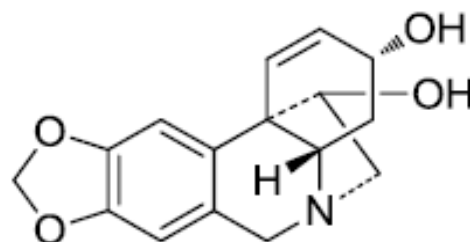


Figura 2-3: Estructura de la hamayna.

Fuente: (Cedr, Arco-aguilar and Est, 2010).

La 11-hidroxivittatina se aisló de *Brunsvigia grandiflora*, este es el primer informe sobre aislamiento de este alcaloide de Amaryllidaceae de Sudáfrica (Masi *et al.*, 2018), al igual que el alcaloide vittatina se ha reportado actividad antibacteriana (Ortiz *et al.*, 2012). Del mismo modo hamayna se aisló de *Crinum macowanii* perteneciente a la familia de Amaryllidaceae (Adekanmi, Fouche and Steenkamp, 2012), presentando actividad antiplasmodial y citotóxica (Campbell *et al.*, 2000).

A continuación, se encontró m/z 109 (tipo homolicorina) con un 6,25 %, seguido de pancratina C, que representa un 5,39 %, la cual ha sido encontrada en *Hippeastrum argentimun* (Ortiz, 2016). Por el momento aún no se ha determinado la actividad biológica que puede presentar este alcaloide.

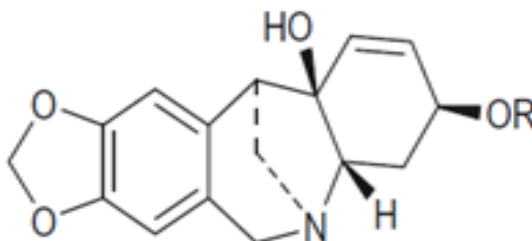


Figura 3-3: Estructura de pancratina C.

Fuente: (Cedr, Arco-aguilar and Est, 2010).

En porcentaje minoritario (<5 %) se encuentra vittatina/crinina con 3,93 %, referente al caso mencionado anteriormente (11-hidroxivittatina/hamayna), de igual manera no se pudo determinar cuál de los dos alcaloides puede tratarse según el análisis de espectrometría de masas, ya que estamos delante de un caso de epímeros, en los cuales la posición del grupo (OH) varía (ver figura 4-3 y 5-3). Para confirmar la identidad se tendría que recurrir al método de Dicroísmo Circular (Bastida *et al.*, 2002).

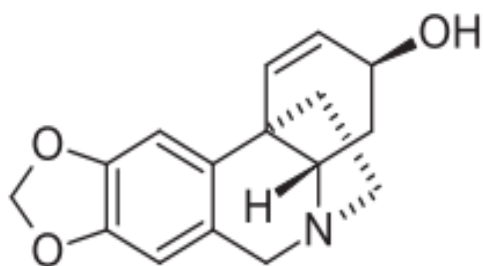


Figura 4-3: Estructura de la vittatina

Fuente: (Jahn *et al.*, 2012)

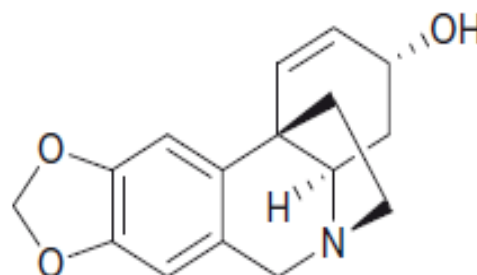


Figura 5-3: Estructura de la crinina.

Fuente: (Jahn *et al.*, 2012).

La vittatina ha mostrado actividad citotóxica debido a estudios adicionales de células Jurkat (leucemia de células T agudas), por tanto es un agente de apoptosis, y antibacteriana (Ortiz *et al.*, 2012; Nair and Staden, 2018). De la misma manera estudios ha descrito efectos apoptóticos de crinina en carcinoma de mama y células de leucemia (Nair and Staden, 2018).

De la misma manera se identificaron otros alcaloides minoritarios. Dentro de estos, se encuentra haemantamina con <0,1 % y galantamina >0,1 %. Aunque el extracto de *Phaedranassa brevifolia* contiene un mínimo porcentaje de galantamina, este alcaloide presenta un efecto inhibitorio reversibles de AChE y BuChE debido a sus efectos colinérgicos centrales (Elisha *et al.*, 2013), así mismo se sabe que exhiben numerosas actividades prometedoras como antibacteriales, antivirales o efectos antiinflamatorios (Jahn *et al.*, 2012).

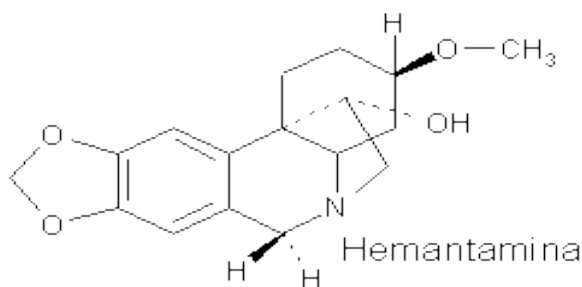


Figura 6-3: Estructura de la hemantamina

Fuente: (Jahn *et al.*, 2012)

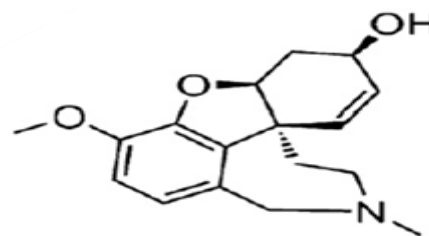


Figura 7-3: Estructura de la galantamina.

Fuente: (Ortiz *et al.*, 2017).

No se encontraron estudios fitoquímicos de *Phaedranassa brevifolia*. En comparación con el perfil de alcaloides estudiados de otras especies como: *Phaedranassa schizantha*, *Phaedranassa cinerea*, *Phaedranassa dubia*, *Phaedranassa glauciflora* y *Phaedranassa tunguraguae*, a excepción de las dos primeras especies, el resto presentan licorina como el alcaloide más representativo en porcentajes de: 54,10 %, 75,01 % y 46,97 % respectivamente (Inca, 2017; Baldeón, 2018; Montero, 2018). Por otra parte el alcaloide más representativo de *Phaedranassa schizantha* fue la haemantamina con el 20,50 % y de *Phaedranassa cinérea* es galantamina con 10,24 % (Vinueza, 2014; Salazar, 2017).

3.3 Porcentaje de inhibición de AChE por el extracto alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia*.

3.3.1 Primer screening de inhibición de AChE por parte del extracto alcaloidal de *P. brevifolia*

Esta es la primera fase, se realiza el screening determinando seis concentraciones, obteniendo el porcentaje de inhibición que se muestran a continuación en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3. Porcentaje de inhibición de AChE del primer screening del extracto de *Phaedranassa brevifolia*

Concentraciones del extracto alcaloidal ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% de inhibición de AChE
1	35,46 \pm 0,78
10	65,47 \pm 1,02
50	77,15 \pm 2,57
100	93,69 \pm 0,82
150	98,29 \pm 1,56
200	99,74 \pm 0,77

Realizado por: Jessica Robles, 201

Los valores obtenidos del primer screening, mostraron que el IC₅₀ se encuentra en las concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (35,46 \pm 0,78) y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (65,47 \pm 1,02), por tanto, se definieron las concentraciones finales a usarse para el cálculo del IC₅₀: 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabla 4-3. Resultados obtenidos en la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia* sobre AChE expresada como IC₅₀

Compuesto	IC ₅₀ $\mu\text{g}/\text{mL}$ (AChE)	Acetilcolinesterasa (AChE)
<i>Phaedranassa brevifolia</i>		3,45 \pm 0,29 R ² = 0,96
Galantamina*		0,30 \pm 0,02 R ² = 0,99

El resultado es el promedio de 3 repeticiones

Realizado por: Jessica Robles, 2018

Se evaluó la actividad inhibitoria de *P. brevifolia* sobre la enzima acetilcolinesterasa. Este resultado fue la repetición por triplicado en 3 días consecutivos, monitoreando en simultáneo la galantamina como el compuesto de referencia y el extracto alcaloidal al mismo tiempo. Con el resultado obtenido se calculó el IC₅₀. (Ikematsu *et al.*, 2017).

El cálculo del IC₅₀ se realizó a partir de la ecuación de la recta que surge de la gráfica bidimensional entre concentraciones (eje de abscisas) y el promedio del porcentaje de inhibición (eje de ordenadas), obteniéndose los resultados mencionados en la Tabla 5-3.

El extracto de *P. brevifolia* presenta una actividad inhibitoria sobre la enzima de acetilcolinesterasa con un IC₅₀ de 3,45±0,29 µg/mL. En comparación al compuesto de referencia que es la galantamina con un IC₅₀ de 0,30±0,02 µg/mL, lo cual presenta una alta actividad inhibitoria media.

No existen estudios previos sobre la especie *P. brevifolia* pero en investigaciones realizadas sobre otras especies del mismo género se reporta que *Phaedranassa cinerea* presentó un IC₅₀ de 37,60 ± 0,09 µg/mL (Salazar, 2017), *Phaedranassa dubia* con un IC₅₀ de 25,48 ± 0,39 µg/mL (Inca, 2017), *Phaedranassa glauciflora* con un IC₅₀ de 39,94 ± 5,09 µg/mL (Baldeón, 2018) y *Phaedranassa tunguraguae* con un IC₅₀ de 11,12 ± 1,87 µg/mL (Montero, 2018), permitiendo evidenciar que *Phaedranassa brevifolia* presenta una actividad inhibitoria alta frente AChE en comparación a otras especies del mismo género. Cabe destacar estos estudios puesto que las especies mencionadas son endémica del Ecuador.

No obstante, si se compara dicha actividad con especies de otros géneros de Amaryllidaceae como algunas encontradas en Argentina, *Habranthus jamesonii* SJ, *Rhodophiala mendocina* NQN, que presentan un IC₅₀ 2,0 ± 0,11 µg/mL y 2,0 ± 0,20 µg/mL respectivamente (Ortiz *et al.*, 2012), se puede observar claramente que estas poseen una actividad inhibitoria mayor a la obtenida por *P. brevifolia*.

Al comparar este resultado con el perfil de alcaloides identificados en CG-ME, se vuelve evidente la presencia de galantamina con un porcentaje mayor a 0,1, mismo que no resulta tan representativo. Por otra parte, el compuesto aún no identificado m/z 303*^a; [M=303]*^b, es el más abundante con 33,49%, de modo tal que se asume la posibilidad de que sea un alcaloide distinto a galantamina pero con alta actividad inhibitoria para acetilcolinesterasa.

Dentro de los alcaloides identificados crinina es considerada un neuroprotector, como lo determinó en el estudio "Actividad neuroprotectora e inhibitoria de la acetilcolinesterasa de cinco especies de Amaryllidaceae"(Cortes *et al.*, 2015), el cual presenta un uso potencia en el tratamiento previo de Alzheimer, mas no en inhibición de acetilcolinesterasa ya que presenta un IC₅₀ de 461 ± 14.

Por otro lado, se encuentra al alcaloide hamayna que presenta un IC₅₀ de 553 ± 3, el cual al igual que crinina nos indica que no presenta inhibición sobre acetilcolinesterasa (Ikematsu *et al.*, 2017).

Por tanto, se podría comparar con estudios donde galantamina no es el componente principal para la inhibición de acetilcolinesterasa. Así se encontró que: el estudio de Cortes *et al*, se reveló que el extracto alcaloidal de *Zephyranthes carinata*, presenta los alcaloides 3-epimacronina y licoramina, que son de interés para la inhibición de acetilcolinesterasa con un IC₅₀ de 5,97±0,24 µg/mL. Esto indica que a pesar que el grupo de galantamina es conocido por su potencial utilidad en el tratamiento de Alzheimer, también otros alcaloides pueden ser selectivos para esta enfermedad(Cortes *et al.*, 2014), por lo tanto, relacionando el resultado obtenido de *Phaedranassa brevifolia* con esta investigación se puede deducir que el compuesto en estudio podría ser el responsable de la actividad inhibitoria encontrada..

3.4 Porcentaje de inhibición de BuChE por el extracto alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia*.

3.4.1 Primer screening de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia*

Se seleccionaron cuatro concentraciones iniciales, 1, 10, 50, 100 µg/mL, para definir posteriores concentraciones para el ensayo de inhibición de BuChE. Por consiguiente, se presenta los porcentajes de inhibición.

Tabla 5-3. Porcentaje de inhibición de BuChE del primer screening del extracto de *Phaedranassa brevifolia*.

Concentraciones del extracto (µg/mL)	del alcaloidal	% de inhibición de BuChE
1		-21,78±2,01
10		-9,98±0,55
50		12,29±1,38
100		30,90±1,69

Realizado por: Jessica Robles, 2018

Los resultados presentados en la Tabla 5-3 indican que el valor del IC₅₀ del extracto alcaloidal es superior a los 100 µg/mL, por tanto se modifican las concentraciones para un segundo screening, que se muestran a continuación en la Tabla7-3.

Tabla 6-3. Porcentaje de inhibición de BuChE del segundo screening del extracto de *Phaedranassa brevifolia*.

Concentraciones del extracto (µg/mL)	del alcaloidal	% de inhibición de BuChE
5		-19,52±0,79
10		-9,33±0,52
25		-10,19±1,58
50		2,42±0,29
100		23,32±1,37
150		36,26±0,52

Realizado por: Jessica Robles, 2018

Los valores obtenidos del segundo screening, mostraron que el IC₅₀ se encuentre por encima de los 150 µg/mL, ya que siendo la máxima concentración tenemos un porcentaje de 36 % y el objetivo es obtener una inhibición del 50 %, por tanto se definieron las concentraciones definitivas, a emplearse en ensayos posteriores, 250, 200, 150, 100, 50, 25 µg/mL.

Tabla 7-3. Resultados obtenidos de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia* sobre BuChE expresada como IC₅₀

Compuesto	IC ₅₀ µg/mL (BuChE)	Butirilcolinesterasa
<i>Phaedranassa brevifolia</i>		58,89±0,55 R ² = 0,97
Galantamina*		5,00±0,36 R ² = 0,96

El resultado es el promedio de 3 repeticiones

Realizado por: Jessica Robles, 2018

Se evaluó la actividad inhibitoria de *Phaedranassa brevifolia* sobre la enzima butirilcolinesterasa. Este resultado surgió de la repetición por triplicado en 3 días consecutivos, monitoreando en simultáneo galantamina, como el compuesto de referencia, y el extracto alcaloidal. Con el resultado obtenido se calculó el IC₅₀, de igual manera que se realizó con AChE.(Ikematsu *et al.*, 2017).

El extracto de *Phaedranassa brevifolia* presenta una actividad inhibitoria sobre la enzima butirilcolinesterasa con un IC_{50} de $58,89 \pm 0,55 \mu\text{g/mL}$, que en comparación al compuesto de referencia galantamina que tiene un IC_{50} de $5,00 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$; es por esto que se considera activo para BuChE, como lo fue para AChE. Como se mencionó en el apartado anterior, este resultado puede atribuirse al compuesto aún no identificado m/z 303^{*a}; $[M=303]$ ^{*b}, ya que el porcentaje de galantamina no resulta muy representativo.

Es importante tomar en cuenta que el género *Phaedranassa* solo se ha estudiado en Ecuador por el momento, siendo las únicas especies vegetales con las que se puede comparar, ya que se aplicó el mismo método modificado de Ellman et al, por consiguiente el estudio de, *Phaedranassa cinérea* presentó un IC_{50} de $108,50 \pm 8,98 \mu\text{g/mL}$ (Salazar, 2017), *Phaedranassa dubia* con un IC_{50} de $114,96 \pm 4,94 \mu\text{g/mL}$ (Inca, 2017), *Phaedranassa glauciflora* con un IC_{50} de $323,62 \pm 3,51 \mu\text{g/mL}$ (Baldeón, 2018) y *Phaedranassa tunguraguae* con un IC_{50} de $64,49 \pm 1,34 \mu\text{g/mL}$ (Montero, 2018), permitiendo evidenciar que *Phaedranassa*, cuenta con destacable actividad inhibitoria frente BuChE, en unos casos y en otros, baja actividad.

Como se puede apreciar los resultados de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de *P. brevifolia* es mucho mayor para AChE. En ese sentido, se ha demostrado en varios estudios que los alcaloides de la familia Amaryllidaceae inhiben bastante bien AChE y en menor medida BuChE, ya que muestran mayor selectividad por la primera enzima (Ortiz, 2016).

Por otra parte, existen estudios de otro género de Amaryllidaceae, con actividad inhibitoria significativa frente butirilcolinesterasa como *Galanthus cilicicus* con un IC_{50} de $8,14 \mu\text{g/mL}$ (Kaya et al., 2017) y *Narcissus poeticus* con un IC_{50} de $23,0 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$ (Bastida et al., 2002), valores muy cercanos al rango de galantamina entre 14 y 22 $\mu\text{g/mL}$ (Ortiz, 2016).

CONCLUSIONES

- Se efectuó la extracción de alcaloides del bulbo de la especie *Phaedranassa brevifolia* siguiendo un protocolo que se basó en cambios de pH y el uso de solventes orgánicos, obteniendo un rendimiento de extracción de 0,049 %.
- La identificación del perfil alcaloidal por CG-EM determinó la presencia de 4 moléculas aun no identificadas, resultando el compuesto aún no identificado m/z 303^{*a}; [M=303]^{*b}, como el más abundante (33,49 %) y 7 alcaloides conocidos, pancratina C, haemantamina, vittatina/crinina, galantamina y 11-hydroxivittatina/hamayna, siendo éste el más representativo con 18,80% de abundancia.
- El extracto alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia* presentó una actividad inhibitoria alta frente a AChE y BuChE, expresados en un IC_{50} de $3,45 \pm 0,29$ $\mu\text{g/mL}$ y IC_{50} e $58,89 \pm 0,55$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Galantamina mostró una mayor actividad, cuyos valores fueron de IC_{50} de $0,30 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$ para acetilcolinesterasa e IC_{50} de $5,00 \pm 0,36$ $\mu\text{g/mL}$ para butirilcolinesterasa.

RECOMENDACIONES

Se recomienda llevar a cabo investigaciones sobre las cuatro moléculas no identificadas, con el fin de determinar su identidad, ya que una de ellas presenta un alto porcentaje (33,49 %).

Por otro lado, se conoce que *Phaedranassa brevifolia* se encuentra en el libro rojo de especies en peligro de extinción, por lo que se recomienda la iniciación de estudios, en conjunto con carreras afines a la temática, acerca de la micropropagación, conservación y cuidado del hábitat de la especie mencionada.

Puesto que los alcaloides identificados presentan una actividad antitumoral, se recomienda a posterioridad, la ejecución de análisis exhaustivos de dichos alcaloides, con los que se pudiera, obtener nuevos fármacos destinados a tratar el cáncer de mama y leucemia.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, K. *Identificación de Alcaloides de Stenomesson aurantiacum (Kunth) Herb.* Universitat de Barcelona, España. Available at: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1541/1/T-SENESCYT-00674.pdf>.
- Adekanmi, E., Fouche, G. and Steenkamp, V. 'Cytotoxicity and acetylcholinesterase inhibitory activity of an isolated crinine alkaloid from *Boophaea disticha* (Amaryllidaceae)', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier, 143(2), pp. 572–578. doi: 10.1016/j.jep.2012.07.011.
- Association, A. 'Alzheimer's disease facts and figures', 6, pp. 158–194. doi: 10.1016/j.jalz.2010.01.009.
- azcón, J *et al* Fotosíntesis, factores ambientales y cambio climático cap 13. at <http://biblio3.url.edu.gt/Publi/Libros/2013/FisioVegetal/13.pdf>
- Baldeón, V. *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DE *Phaedranassa glauciflora* SOBRE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA.* Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador.
- Bastida, J. *et al.* 'Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts', 71, pp. 2521–2529.
- Campbell, W. E. *et al.* 'Bioactive alkaloids from *Brunsvigia radulosa*', *Elsevier*, 53, pp. 587–591.
- Cedr, J. C., Arco-aguilar, M. Del and Est, A. 'Chemistry and Biology of *Pancreatium* Alkaloids', in, pp. 1–37. doi: 10.1016/S1099-4831(10)06801-X.
- Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas 'FEBRERO', *biomed*, 25(2). Available at: <http://files.sld.cu/bmn/files/2018/02/biomed-febrero-2018.pdf>.
- Chigurupati, S. *et al.* 'Identification of novel acetylcholinesterase inhibitors: Indolopyrazoline derivatives and molecular docking studies', *Bioorganic Chemistry*. Elsevier Inc., 67, pp. 9–17. doi: 10.1016/j.bioorg.2016.05.002.
- Cortes, N. *et al.* 'Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities

- with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.jpba.2014.09.022.
- Cortes, N. *et al.* 'Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study', *Life Sciences*. Elsevier Inc., 122, pp. 42–50. doi: 10.1016/j.lfs.2014.12.011.
- Dong, B. *et al.* 'Short and efficient synthesis of Guillou's Galanthamine intermediate', *Tetrahedron*. Elsevier Ltd, 73(32), pp. 4719–4722. doi: 10.1016/j.tet.2017.06.019.
- Dubois, B. *et al.* *Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria, Alzheimer's and Dementia*. doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.002.
- Elisha, I. L. *et al.* 'Acetylcholinesterase inhibitory effects of the bulb of *Ammocharis coranica* (Amaryllidaceae) and its active constituent lycorine', *South African Journal of Botany*. South African Association of Botanists, 85, pp. 44–47. doi: 10.1016/j.sajb.2012.11.008.
- Ellman, K. 'A New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity', *elsevier*, 7, pp. 88–95.
- Espinosa, P. S. *et al.* 'Factores de riesgo y prevalencia de la demencia y enfermedad de Alzheimer en Pichincha – Ecuador (Estudio FARYPDEA)', (April 2012). Available at: https://www.researchgate.net/publication/256293953_FACTORES_DE_RIESGO_Y_PREVALENCIA_DE_LA_DEMENCIA_Y_ENFERMEDAD_DE_ALZHEIMER_EN_PICHINCHA-ECUADOR_ESTUDIO_FARYPDEA.
- Fish, P. V *et al.* 'New Approaches for the Treatment of Alzheimer Disease', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.11.034.
- Hassan, M. *et al.* 'Biomedicine & Pharmacotherapy The exploration of novel Alzheimer ' s therapeutic agents from the pool of FDA approved medicines using drug repositioning , enzyme inhibition and kinetic mechanism approaches', *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Elsevier, 109(November 2018), pp. 2513–2526. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.115.
- Ikematsu, H. *et al.* 'In vitro neuraminidase inhibitory concentration (IC 50) of four neuraminidase inhibitors in the Japanese 2015 e 16 season : Comparison with the 2010 e 11 to 2014 e 15 seasons', *Journal of Infection and Chemotherapy*. Elsevier Taiwan LLC. doi: 10.1016/j.jiac.2017.06.001.

- Inca, S. *DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE Phaedranassa dubia*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador.
- Jahn, S. *et al.* 'Analytica Chimica Acta Metabolic studies of the Amaryllidaceous alkaloids galantamine and lycorine based on electrochemical simulation in addition to in vivo and in vitro models', *Elsevier*. Elsevier B.V., 756, pp. 60–72. doi: 10.1016/j.aca.2012.10.042.
- Kaya, G. I. *et al.* 'South African Journal of Botany Chemical characterization and biological activity of an endemic Amaryllidaceae species: Galanthus cilicicus', *South African Journal of Botany*. South African Association of Botanists, 108(1341), pp. 256–260. doi: 10.1016/j.sajb.2016.11.008.
- Laura, B. *et al.* 'Cromatografía de gases', p. 43.
- Li, Y. *et al.* 'Aurone Mannich base derivatives as promising multifunctional agents with acetylcholinesterase inhibition, anti- β -amyloid aggregation and neuroprotective properties for the treatment of Alzheimer's disease', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Ltd, 126(2017), pp. 762–775. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.12.009.
- Lobbens, E. S. *et al.* 'Screening of plants used in the European traditional medicine to treat memory disorders for acetylcholinesterase inhibitory activity and anti amyloidogenic activity', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier. doi: 10.1016/j.jep.2017.02.020.
- Lyketsos, C. G. and Miller, D. S. 'Addressing the Alzheimer's disease crisis through better understanding, treatment, and eventual prevention of associated neuropsychiatric syndromes', *Alzheimer's and Dementia*. The Alzheimer's Association, 8(1), pp. 60–64. doi: 10.1016/j.jalz.2011.11.001.
- Martinez, P. 'Alzheimer una enfermedad compartida', *Know Alzheimer*, 2, pp. 22–31. Available at: <https://knowalzheimer.com/wp>.
- Masi, M. *et al.* 'South African Journal of Botany Alkaloids isolated from indigenous South African Amaryllidaceae : Crinum buphanoides (Welw . ex Baker), Crinum graminicola (I . Verd .), Cyrtanthus mackenii (Hook . f) and Brunsvigia grandiflora (Lindl)', *South African Journal of Botany*. South African Association of Botanists, 118, pp. 188–191. doi: 10.1016/j.sajb.2018.07.021.

- Minga, D. *et al.* 'A new species of *Phaedranassa* (Amaryllidaceae) from Ecuador', *Phytotaxa*, 192(1), pp. 50–53. doi: 10.11646/phytotaxa.192.1.6.
- Montero, E. *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DE Phaedranassa tunguraguae*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador.
- Nair, J. J. and Staden, J. Van 'South African Journal of Botany Caspase-inducing effects of lycorane and crinane alkaloids of the Amaryllidaceae', *South African Journal of Botany*. South African Association of Botanists. doi: 10.1016/j.sajb.2018.05.016.
- Nora H. Oleas, ALAN W. Meerow, and J. F.-O. 'Population Dynamics of the Endangered Plant , *Phaedranassa tunguraguae* , from the Tropical Andean Hotspot', 103(4), pp. 557–569. doi: 10.1093/jhered/ess020.
- Oleas, N. *Landscape Genetics of Phaedranassa Herb. (Amaryllidaceae) in Ecuador*. Florida International University. doi: 10.25148/etd.FI11080201.
- Oleas, N. H. *et al.* 'Using species distribution models as a tool to discover new populations of *Phaedranassa brevifolia* Meerow , 1987 (Liliopsida : Amaryllidaceae) in Northern Ecuador', 10(3), pp. 689–691. doi: 10.15560/10.3.689.
- Oleas, N. H., Meerow, A. W. and Francisco-ortega, J.) *Molecular Markers and Conservation of Plant Species in the Latin-America : The Case of Phaedranassa viridiflora (Amaryllidaceae)*. Department of Biological Sciences, Florida International University, 11200 SW 8th St., Miami, FL. doi: 10.1007/s12229-013-9125-8.
- Ortiz, J. E. *et al.* 'Wild Argentinian Amaryllidaceae, a New Renewable Source of the Acetylcholinesterase Inhibitor Galanthamine and Other Alkaloids', *Science Direct*, pp. 13473–13482. doi: 10.3390/molecules171113473.
- Ortiz, J. E. 'Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and Their Cholinesterase- Inhibitory Activities: An in Vitro and in Silico Study', *Journal of Natural Products*, 79, pp. 1241–1248. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00785.
- Ortiz, J. E. *et al.* 'Cholinesterase-inhibitory effect and in silico analysis of alkaloids from bulbs of *Hieronymiella* species', *Phytomedicine*. Elsevier GmbH, pp. 1–25. doi: 10.1016/j.phymed.2017.12.020.

- PONCE, C. N. S. “CUANTIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES DE *Berberis* CUANTIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES DE *hallii* “Carrasquilla” SECTOR LA JOSEFINA SAN ISIDRO JOSEFINA SAN ISIDRO DEL CANTÓN GUANO PROVINCIA DE CHIMBORAZO. Available at: <http://dspace.espoeh.edu.ec/bitstream/123456789/695/1/56T00225.pdf>.
- Ronsted, N. *et al.* ‘Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of amaryllidaceae’, *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), pp. 24–29. doi: 10.1186/1471-2148-12-182.
- Rudolph E. Tanzi and Sangram S. Sisodia (ed.) *ALZHEIMER’S DISEASE Advances in Genetics, Molecular and Cellular Biology*. Chicago: Springer.
- Salazar, C. *DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Phaedranassa cinerea**. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador.
- Singh, M. *et al.* ‘Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection’, *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 70, pp. 165–188. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.050.
- Soria, M. C. H. T. M. del C. H. *Campaña Mercadeo Social. Enfermedad de Alzheimer*. doi: Doi 10.1016/S0168-9274(97)00017-2.
- Vinueza, Á. *TAMIZAJE FITOQUÍMICO E IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES DE *Phaedranassa schizantha Baker**. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador.
- Wilson Hinojosa, M. A. N. *Momentos que perduran, recuerda al Alzheimer*. Universidad San Francisco de Quito. Available at: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6531/1/131584.pdf>.
- Zhan, G. *et al.* ‘Amaryllidaceae alkaloids with new framework types from *Zephyranthes candida* as potent acetylcholinesterase inhibitors’, *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 127, pp. 771–780. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.10.057.

ANEXOS

ANEXO A: Recolección de la especie *Phaedranassa brevifolia*, entre Imbabura y Carchi



Especie vegetal recolecta en etapa de crecimiento

ANEXO B: Preparación del material vegetal



Limpieza minuciosa y cortados en fragmentos pequeños del bulbo para proceder a secar.

ANEXO C. Obtención del extracto crudo



Sonicación y filtrado del extracto crudo de *Phaedranassa brevifolia*.

ANEXO D. Extracción de alcaloides de *Phaedranassa brevifolia*



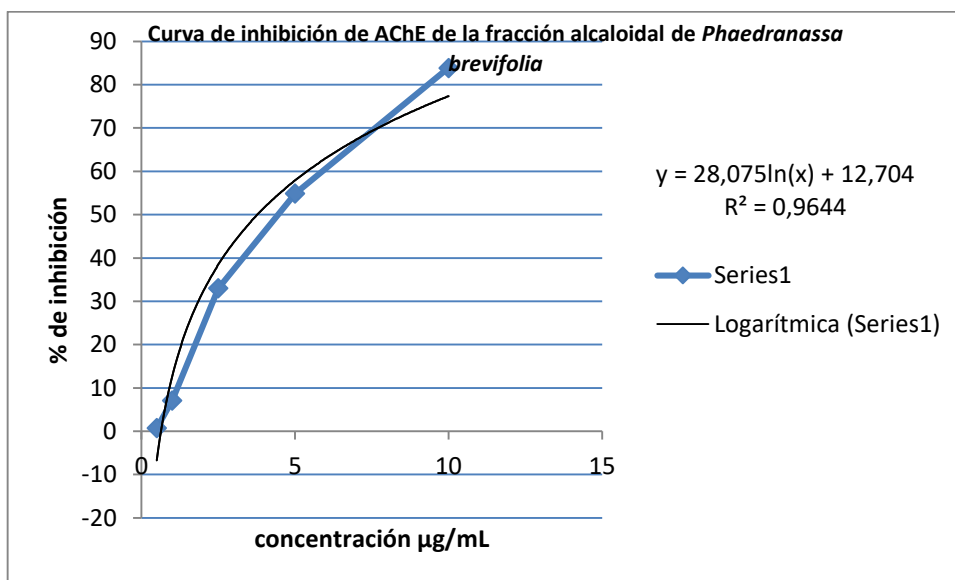
ANEXO E. Obtención del extracto de alcaloides totales.



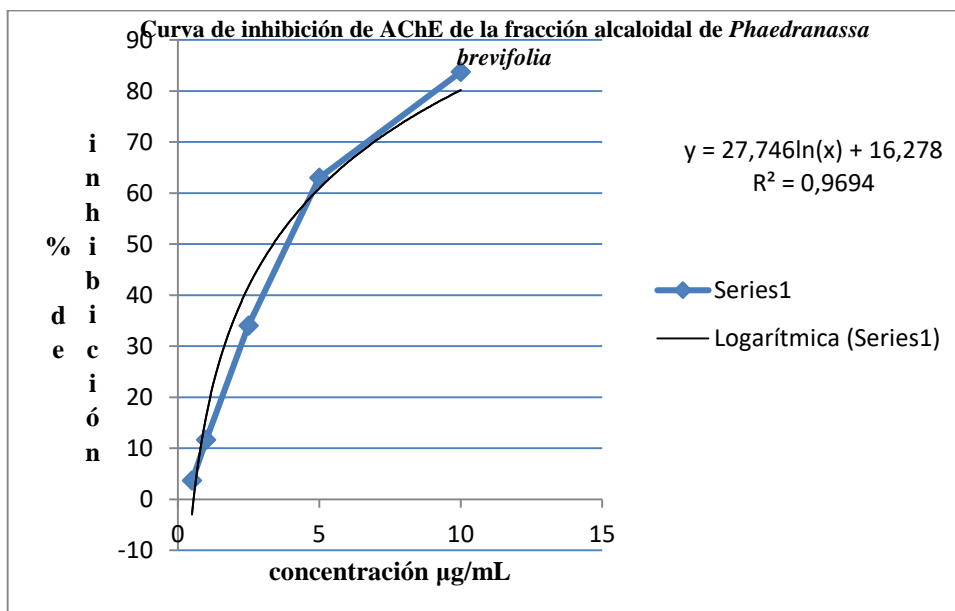
ANEXO F. Determinación de la actividad inhibitoria enzimática



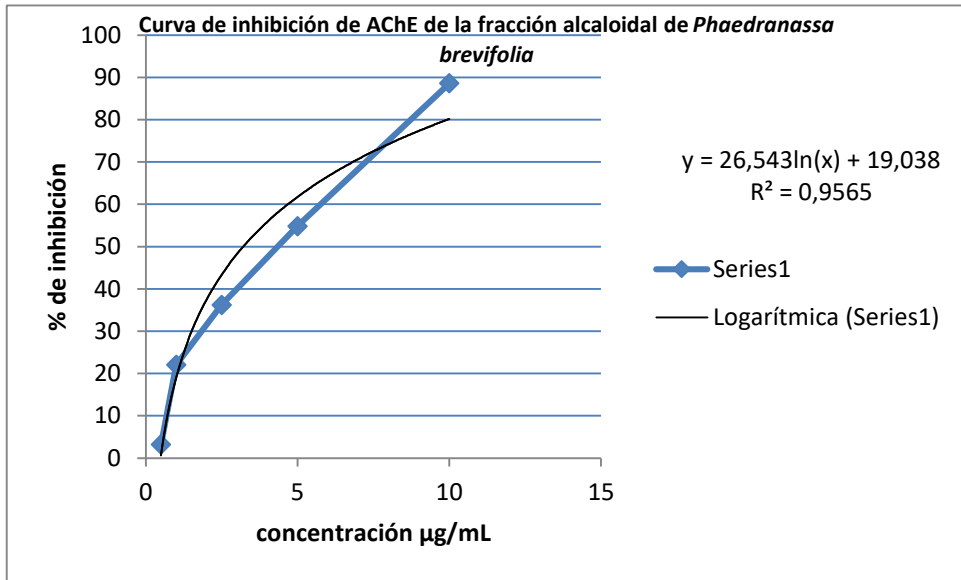
ANEXO G. Curva de inhibición de acetilcolinesterasa de la fracción alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia* empleada en el cálculo del IC₅₀ realizado en 3 días consecutivos



Gráfica1. Ensayo de inhibición de AChE de la fracción alcaloidal (primer día)

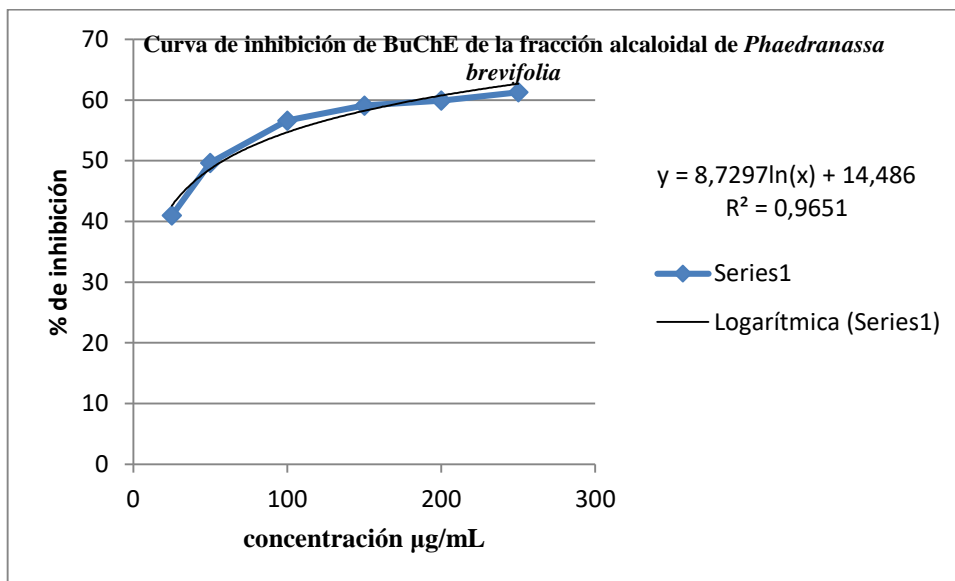


Gráfica2. Ensayo de inhibición de AChE de la fracción alcaloidal (segundo día)

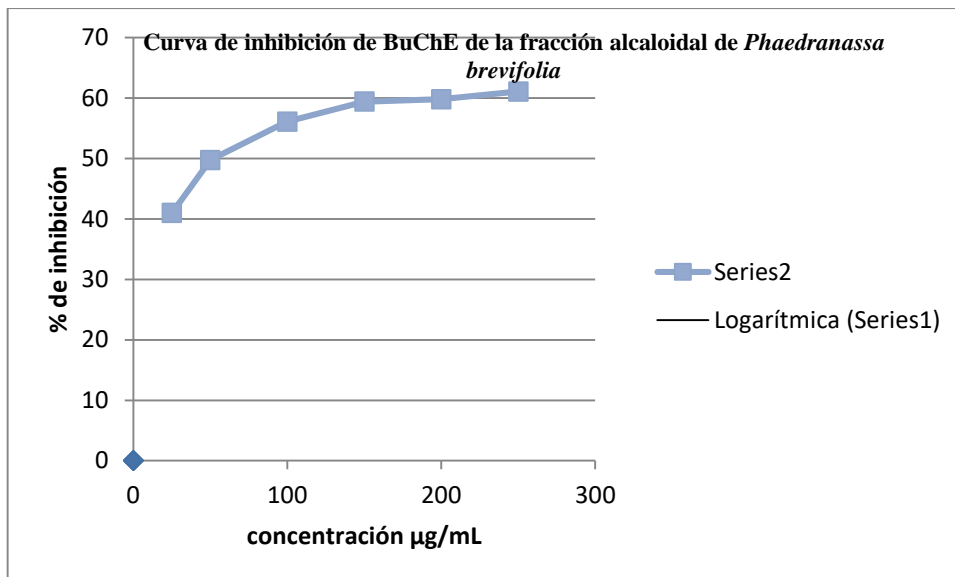


Gráfica3. Ensayo de inhibición de AChE de la fracción alcaloidal (tercer día)

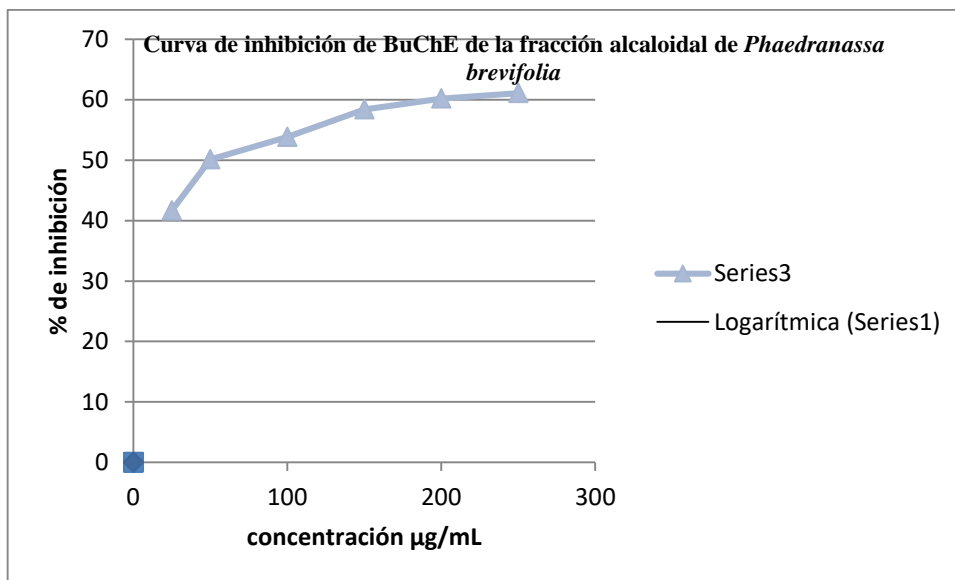
ANEXO H. Curva de inhibición de butirilcolinesterasa de la fracción alcaloidal de *Phaedranassa brevifolia* empleada en el cálculo del IC₅₀ realizado en 3 días consecutivos.



Gráfica4. Ensayo de inhibición de BuChE de la fracción alcaloidal (primer día)







Gráfica5. Ensayo de inhibición de BuChE de la fracción alcaloidal (segundo día)



Gráfica6. Ensayo de inhibición de BuChE de la fracción alcaloidal (tercer día)

ANEXO I. Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos No. MAE-DNB-CM-2015-0054

  
REGISTRO 6039 FOLIO 303
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, <i>sumak kawsay</i> . 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/ER/EN
Calle Madrid 1159 y Andalucía Código Postal: (170517) Quito – Ecuador. Teléfono: 593-2 398-7600

ANEXO J. Autorización de orden de movilización de especímenes Nro. MAE-CGZI-DPAI-2018-0016-O.

 **Ministerio del Ambiente**

 **GOBIERNO NACIONAL DE LA REPUBLICA DEL ECUADOR**

Oficio Nro. MAE-CGZI-DPAI-2018-0016-O
Ibarra, 08 de enero de 2018

Asunto: AUTORIZACIÓN DE ORDEN DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES

Licenciada
Karen Lisseth Acosta León
Usuario
En su Despacho

De mi consideración:

Reciba un cordial saludo de quienes trabajamos en la Dirección Provincial del Ambiente de Imbabura, a la vez le deseamos éxitos en sus labores diarias.

En respuesta a lo solicitado esta Dirección le hace llegar la autorización para que traslade los especímenes de flora del Contrato Marco MAE-DNB-CM-2015-0054.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,



Mgs. Julio César Merán de la Torre
COORDINADOR GENERAL ZONAL - ZONA 1 DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE IMBABURA

Referencias:
- MAE-CGZI-DPAI-2018-0003-E

Anexos:
- notificación_00030863532001514908982.pdf
- guía_de_movilización_de_especímenes_de_flora0515556001515122854.doc

ip/m

Papel reciclado

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE IMBABURA
Av. Mariposa Avenida 2084 y Monumento Sáenz, frente a la Estación de Bomberos La Florida
Ibarra - Ecuador
Teléfonos: (08) 4 262245 - 2622611 - 2622696
www.ambiente.gub.ec

1/1

ANEXO K. Guía de movilización de especímenes de flora silvestres



**GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA SILVESTRES
ENERO-2018-002**

Fecha de emisión: 04 de Enero de 2018 a las 10H30
 Fecha de movilización: 13 de Enero de 2018. Válido hasta: 11 de Enero de 2018

La Dirección Provincial Ambiental de Imbabura, de acuerdo a Normativas Ambientales vigentes, Autoriza a: Karen Lisseth Acosta León, Investigadora ESPOCH, del Contrato Marco MAE-DNB-CM-2015-0054, la movilización de especímenes de Flora, desde el cantón Cotacachi, provincia de Imbabura, hacia: la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (Riobamba), de acuerdo a la siguiente lista

Datos de las especies				ESTADO	CANTIDAD
CÓDIGO	FAMILIA	ESPECIE	DESCRIPCIÓN DEL ESPECIMEN O PARTE CONSTITUTIVA		
	Amaryllidaceae	Freziera bracteata	Individuo incluye bulbos		3
TOTAL					3

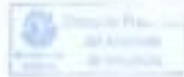
Datos de la persona que moviliza

Nombres y Apellidos	Nacionalidad	Documento de Identidad/Pasaporte	Permiso de Investigación	Centros de Manejo o Tenencia de Vida Silvestre
Karen Lisseth Acosta León	Ecuatoriana	1003089016	Nro. MAE-DNB-CM-2015-0054	Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (Riobamba) y Herbario de la Universidad Tecnológica Indóamerica (Quito) cuya patente es: 006-2017-FLO-DPAI-MA.

Nota: 1 espécimen será depositado en el Herbario de la Universidad Tecnológica Indóamerica (Quito) cuya patente es: 006-2017-FLO-DPAI-MA.

Datos para la movilización e identificación del conductor

Institución responsable	Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (Riobamba)
Movilización vía (terrestre/aérea)	Terrestre
Vehículo	Transporte público
Placa	
Conductor	Karen Lisseth Acosta León
Cedula de Identidad	1003089016



M.Sc. Julio César Morán de la Torre
 DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE IMBABURA

Karen Lisseth Acosta León
 INVESTIGADOR