

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



Alcaloides en bulbos de *Hippeastrum miniatum* y su actividad inhibitoria de la colinesterasa como agente terapéutico para el Alzheimer

TESIS

**Para optar el grado de maestra en ciencias con mención en
biotecnología molecular**

Autora: Q.F. Kirianova Godoy Bautista

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



Alcaloides en bulbos de *Hippeastrum miniatum* y su actividad
inhibitoria de la colinesterasa como agente terapéutico para el
Alzheimer

TESIS

Aprobada en forma y estilo por:

Dr. Carlos A. Deza Navarrete (Presidente)

Dra. María E. Solís Castro (Secretaria)

PhD. Virna A. Cedeño Escobar (Vocal)

.....
.....
.....

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



Alcaloides en bulbos de *Hippeastrum miniatum* y su actividad
inhibitoria de la colinesterasa como agente terapéutico para el
Alzheimer

**Los suscritos declaramos que la tesis es original en su
contenido y forma**

Q.F. Kirianova Godoy Bautista (Autora)

Ph.D. Eric Louis Mialhe Matonnier (Asesor)

Tumbes, 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
Licenciada
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes - Perú


ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los veintisiete días del mes de febrero del año dos mil veinte, a las 17.15 horas, en EL AULA N° 02 DE LA ESCUELA DE POSGRADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES, se reunieron los miembros del jurado designados con Resolución Directoral N° 045-2019/UNTUMBES-EPG-D; Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete - Presidente; Dra. María Edith Solís Castro - Secretario; Ph.D. Virna Alexia Cedeño Escobar – Vocal y con Resolución Directoral N° 039-2020/UNTUMBES-EPG-D, se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis: Alcaloides de bulbos de *Hippeastrum miniatum* y su actividad inhibitoria de la colinesterasa como agente terapéutico para el Alzheimer, presentada por la estudiante del Programa de Maestría en Ciencias con mención en Biotecnología Molecular Kirianova Godoy Bautista, asesorada por el Ph. D. Eric Louis Mialhe Matonnier.


Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: SOBRESALIENTE, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 18.30 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

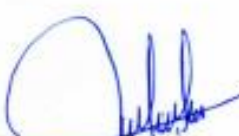
Tumbes, 27 de febrero de 2020.



Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete
Presidente



Dra. María Edith Solís Castro
Secretario



Ph.D. Virna Alexia Cedeño Escobar
Vocal

C.c. Jurado de Proyecto de Tesis (3), Asesor (1), sustentante (1), UI (2)

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, Kirianova Godoy Bautista, declaro que los resultados reportados en esta tesis son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, excepto dónde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro finalmente que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y de mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.



.....
Q.F. Kirianova Godoy Bautista

DEDICATORIA

A la gaviota que busca el vuelo perfecto...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Tumbes y a la empresa INCABIOTEC, por la beca otorgada para estudiar el Programa de Maestría en Biotecnología Molecular y culminar la presente tesis.

A los docentes y al personal del Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Tumbes por su colaboración y apoyo en el uso de equipos de laboratorio para la realización de esta tesis.

A todos los que contribuyeron a la realización de este trabajo de investigación con sus opiniones, palabras y consejos.

RESUMEN

Hippeastrum miniatum, es una especie nativa de la selva peruana usada tradicionalmente como antídoto para la mordedura de serpiente.

Este trabajo parte de la hipótesis de que *H. miniatum* posee alcaloides inhibidores de la acetilcolinesterasa y por tanto, podría ser un reservorio de moléculas activas para el tratamiento del Alzheimer. Para corroborar esta hipótesis, se identificaron los alcaloides de los bulbos de *Hippeastrum miniatum* y se determinó su actividad inhibitoria de la colinesterasa; empleando métodos de alto rendimiento que incluyen docking molecular y técnicas analíticas que integran la cromatografía de capa fina (TLC), bioautografía enzimática y espectrometría de masas en tándem MALDI TOF/TOF.

Mediante éstas técnicas, se han identificado satisfactoriamente 11 alcaloides, destacando galanthamine y (+)-8-O-demethylhomolycorine.

La actividad anticolinesterasa in silico, fue evaluada mediante docking molecular. Este análisis reportó la presencia de 7 alcaloides farmacológicamente importantes, capaces de enlazarse al sitio catalítico y al sitio aniónico periférico (PAS) de la enzima.

La actividad anticolinesterasa in vitro, arrojó un IC₅₀ de 29.67µg/mL. Para identificar los alcaloides responsables de esta actividad, se ha desarrollado por vez primera, la técnica analítica que integra la bioautografía enzimática por TLC con espectrometría de masas en tándem MALDI TOF TOF fuera de línea.

Mediante ésta técnica se determinó que los alcaloides responsables de la inhibición de la acetilcolinesterasa son: pancratinine A, lycorine, clivonidine, galanthamine y (+)-8-O-Demethylhomolycorine.

El docking molecular de (+)-8-O-Demethylhomolycorine con la acetilcolinesterasa, muestra que éste se une al sitio catalítico y al PAS de la enzima, con una energía libre de enlace de -8.79 Kcal/mol. Este alcaloide destaca porque además de poseer actividad dual sobre la acetilcolinesterasa, reportes previos muestran que inhibe a la enzima GSK - 3β, responsable de la hiperfosforilación de la proteína Tau. Por tanto, es una molécula multidiana prometedora para el desarrollo de fármacos más eficaces para el Alzheimer.

Palabras Clave: *Hippeastrum miniatum*, Alzheimer, inhibidor de acetilcolinesterasa, TLC- MALDI TOF/ TOF, bioautografía enzimática.

ABSTRACT

Hippeastrum miniatum is a native species of the Peruvian jungle, traditionally used as an antidote for snake bite.

This work is based on the hypothesis that *H. miniatum* has acetylcholinesterase inhibiting alkaloids and therefore could be a reservoir of active molecules for the treatment of Alzheimer's. To corroborate this hypothesis, the alkaloids of the *Hippeastrum miniatum* bulbs were identified and their cholinesterase inhibitory activity was determined; employing high-throughput methods that include molecular docking and analytical techniques that integrate thin layer chromatography (TLC), enzymatic bioautography, and MALDI TOF / TOF tandem mass spectrometry. Through these techniques, 11 alkaloids have been successfully identified, highlighting galanthamine and (+)-8-O-demethylhomolycorine.

The anticholinesterase activity in silica was evaluated by molecular docking. This analysis reported the presence of 7 pharmacologically important alkaloids, capable of binding to the catalytic site and the peripheral anionic site (PAS) of the enzyme. The anticholinesterase activity in vitro yields an IC₅₀ of 29.67 μg / mL. To identify the alkaloids responsible for this activity, the analytical technique that integrates TLC enzymatic bioautography with offline MALDI TOF TOF tandem mass spectrometry has been developed for the first time. By means of this technique, it was determined that the alkaloids responsible for the inhibition of acetylcholinesterase are: pancratinine A, lycorine, clivonidine, galanthamine y (+)-8-O-Demethylhomolycorine.

Molecular docking of (+)-8-O-Demethylhomolycorine with acetylcholinesterase shows that it binds to the catalytic site and to the PAS of the enzyme, with a free binding energy of 8.79 Kcal / mol. This alkaloid stands out because in addition to having dual activity on acetylcholinesterase, previous reports show that it inhibits the GSK-3β enzyme, responsible for the hyperphosphorylation of the Tau protein. Therefore, it is a promising multi-drug molecule for the development of more effective drugs for Alzheimer's.

KEY WORDS: *Hippeastrum miniatum*, Alzheimer, acetylcholinesterase inhibitor, TLC- MALDI TOF/ TOF, enzymatic bioautography.