



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Actividad hipoglucemiante y anticolinesterásica de 15 extractos  
obtenidos de actinomicetos marinos**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTORA:** Mendieta Herrera, Martha Julia

**DIRECTOR:** Cartuche Flores, Luis Emilio, M. Sc.

**LOJA-ECUADOR**

**2016**



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

Septiembre, 2016

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister.

Luis Emilio Cartuche Flores

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **“Actividad hipoglucemiante y anticolinesterásica de 15 extractos obtenidos de actinomicetos marinos”** realizado por **Mendieta Herrera, Martha Julia**; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, noviembre de 2016

(f) \_\_\_\_\_

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo **Mendieta Herrera Martha Julia**, declaro ser la autora del presente trabajo de titulación: **Actividad hipoglucemiante y anticolinesterásica de 15 extractos obtenidos de actinomicetos marinos**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Luis Emilio Cartuche Flores director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

(f) \_\_\_\_\_

Autora: Mendieta Herrera Martha Julia

Cédula: **1103749394**

## DEDICATORIA

*A mi Dios, al Rey de Reyes, a mi creador, al Pastor que ha guiado cada uno de mis días. Por ser quien me ha dado salud, sabiduría y un amor incondicional que me ha permitido luchar en la vida para desenvolverme como tu hija fiel, amorosa y temerosa de ti.*

*A mi papi, Vicente Mendieta Ludeña, mi héroe y razón de vivir. Por ser mi apoyo en todo, por darme el regalo de poder educarme, por ser paciente y amarme a pesar de mis falencias como hija. El logro de este esfuerzo es para ti papito porque me has sabido enseñar todo en esta vida y no me alcanzara la vida para demostrarte mi gratitud porque todo lo que soy es gracias a ti.*

*Por siempre serás mi ejemplo y el molde en el cual quiero que mi vida gire, a Dios le agradezco por haberme dado el regalo de tenerte a ti como padre.... El mejor papá del mundo... ¡Te amo!.*

*A mi madre, Beatriz, que desde el cielo ha guiado mis pasos y ha sido mi inspiración para afrontar todo lo que he vivido en esta etapa de mi vida.*

*A mis ñaños Diego, Krupskaya, Vanessa y Gabriela por ayudarme en todo lo que siempre necesite, por amarme y cuidarme.*

*Hermosa familia.... Este logro, es para ustedes... ¡Los amo!..*

Yuly

## **AGRADECIMIENTO**

*A Dios por darme la vida y por ser mi guía a cada momento, por regalarme la sabiduría, la paciencia y la inteligencia.*

*A mi papi, Vicente Mendieta Ludeña por ser mi mayor inspiración, mi héroe y mi orgullo, por ser siempre mi apoyo y por todo lo que hizo para sacarme adelante y hacer de mí una mejor persona.*

*A mi ñaño Diego y mis ñañas Kuka, Vane y Gaby; a mis cuñados Joha y Juan Iván; a mis sobrinos Dariana, Mathias, Damián, Renata, Valentina y Katalina por sus palabras de aliento y sus múltiples muestras de afecto que lograron siempre hacerme feliz y tener la fuerza para continuar cada día.*

*Infinitas gracias a mis amigas Michelle, Fabiana, Lizett que desde que las conocí empezó un viaje de experiencias universitarias que perduran para siempre, y de manera especial un agradecimiento a Cynthia por brindarme su amistad y por haber pasado junto a mi inolvidables vivencias que hicieron felices cada uno de mis días dentro y fuera de la universidad, gracias ñaña porque ser una compañera, una colega y una amiga para toda la vida.*

*De manera especial un agradecimiento al Magister Luis Emilio Cartuche por confiar en mis capacidades y permitirse ser mi guía y mi maestro para lograr desarrollar este trabajo.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ixx
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	5
MARCO TEÓRICO .....	5
1.1. Actinomicetos. ....	6
1.1.1. Generalidades.....	6
1.1.2. Condiciones de crecimiento.....	6
1.1.3. Género Streptomyces.....	7
1.1.4. Género Micromonospora.....	8
1.2. Diabetes. ....	8
1.2.1. Diabetes mellitus tipo II. ....	9
1.3. Enfermedades neurodegenerativas. ....	10
1.3.1. Alzheimer .....	10
1.4. Inhibición enzimática.....	11
1.4.1. Tipos de inhibición.....	11
1.4.2. Inhibición competitiva. ....	12
1.4.2. Inhibición no competitiva. ....	13
1.4.3. Inhibición incompetitiva. ....	13
1.4.5. Inhibición alostérica.....	14
1.4.6. Inhibición parcial.....	14
1.4.7. Inhibición de unión fuerte.....	14
1.4.8. Inhibición dependiente del tiempo. ....	15
1.5. Ensayos de actividad hipoglucemiante. ....	16

1.5.1. Alfa amilasa.....	16
1.5.2. Alfa glucosidasa. ....	17
1.6. Ensayos de actividad anticolinesterásica. ....	17
1.6.1. Acetilcolinesterasa.....	17
1.7. Inhibidores enzimáticos comerciales.....	18
CAPÍTULO II.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.1. Microorganismos de estudio. ....	21
2.2. Reactivación de las cepas. ....	21
2.3. Escalado del cultivo en medio A1 y obtención de extractos. ....	21
2.4. Ensayos enzimáticos. ....	22
2.4.1. Preparación de las muestras. ....	22
2.4.2. Ensayo de inhibición frente a alfa amilasa.....	22
2.4.3. Ensayo de inhibición frente a $\alpha$ -glucosidasa.....	23
2.4.4. Ensayo de inhibición frente acetilcolinesterasa.....	23
CAPÍTULO III.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
3.1. Obtención de los extractos.....	26
3.2. Actividad inhibitoria frente a $\alpha$ -amilasa.....	27
3.3. Actividad inhibitoria frente a $\alpha$ -glucosidasa. ....	28
3.4. Actividad inhibitoria frente a acetilcolinesterasa. ....	30
CONCLUSIONES .....	33
RECOMENDACIONES.....	34
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	35
ANEXOS.....	42
ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO PARA ACTINOMICETOS SUPLEMENTADOS CON AGUA DE MAR ARTIFICIAL. ....	43
ANEXO 2. DESARROLLO DEL MÉTODO FRENTE A $\alpha$ -AMILASA. ....	45
ANEXO 3. DESARROLLO DEL MÉTODO FRENTE A $\alpha$ -GLUCOSIDASA. ....	46
ANEXO 4. DESARROLLO DEL MÉTODO FRENTE A ACETILCOLINESTERASA. ....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características fisicoquímicas de los extractos crudos. ....	26
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de inhibición de los 15 extractos crudos frente al sistema de alfa-amilasa. ....	27
<b>Tabla 3.</b> $CI_{50}$ y porcentaje de inhibición de los 15 extractos crudos frente al sistema de alfa-glucosidasa. ....	29
<b>Tabla 4.</b> $CI_{50}$ y porcentaje de inhibición de los 15 extractos crudos frente al sistema de acetilcolinesterasa. ....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cadenas de esporas de <i>Streptomyces</i> sp.: A) Forma de las cadenas de esporas (1250X); B) Número de esporas (5000X). .....	8
<b>Figura 2.</b> Ejemplos de inhibición competitiva, donde el sustrato (S) y el inhibidor (I) son eventos que se excluyen mutuamente. (a) modelo clásico para la inhibición competitiva en la que el I y S compiten por la misma región del sitio activo. (b) I no se une al sitio activo, pero impide estéricamente que S se vincule. (c) Los sitios de unión para S e I se solapan. (d) S e I comparten una unión común en la enzima. (e) I al unirse da lugar a un cambio conformacional que impide que el S se una (y viceversa).....	12
<b>Figura 3.</b> Ejemplos de inhibición no competitiva donde el inhibidor (I) se une a un sitio diferente del sitio de unión del Sustrato (S) y del Centro Catalítico (c) del sitio activo. (a) En este modelo, la unión de S induce un cambio conformacional para alinear el centro catalítico cerca de S para la catálisis. Sin embargo, cuando I se une en un lugar separado, el cambio de conformación no se produce y la actividad de la enzima se inhibe. (B) En este modelo, el I puede obstaculizar estéricamente la unión y liberación de S. Sin embargo, I y S pueden ocupar la enzima al mismo tiempo.....	13
<b>Figura 4.</b> Un ejemplo de inhibición incompetitiva donde el inhibidor (I) sólo se une en presencia de sustrato (S).....	14
<b>Figura 5.</b> Ilustraciones de la inhibición dependiente del tiempo. (a) Este gráfico muestra la disminución de la velocidad inicial (producto formado vs tiempo), inhibidor de equilibrio rápido y un inhibidor dependiente del tiempo. Esta última produce una curva de progreso no lineal consistente con un valor $k_{on}$ lento. (b) Esta gráfica representa la recuperación de la actividad enzimática (producto formado vs tiempo) después de la dilución del complejo enzima- inhibidor con el sustrato. La dilución de un complejo de inhibidor de equilibrio rápido recobra toda la actividad inmediatamente después de la dilución. La dilución de los complejos con inhibidores dependientes del tiempo se recupera la actividad enzimática más lentamente, indicativo de un compuesto con un valor de $k_{off}$ lento. La dilución de los complejos de inhibidor irreversible mantiene el complejo enzima-inhibidor después de la dilución. ....	15
<b>Figura 6.</b> Inhibición competitiva del tipo reversible de PBLC-07. Se muestra únicamente los porcentajes de inhibición a los 5 y 15 minutos de la concentración de 0,2 mg/mL para indicar la disminución del efecto inhibitorio.....	30
<b>Figura 7.</b> Inhibición competitiva del tipo reversible, dependiente del tiempo de MJG-05. Se muestra únicamente los porcentajes de inhibición a los 5 y 15 minutos de la concentración de 0,4 mg/mL para indicar el aumento del efecto inhibitorio.....	31

## RESUMEN

Los actinomicetos provenientes de ambientes marinos se han convertido en una fuente rica en sustancias bioactivas, entre ellas los inhibidores enzimáticos. En este estudio se determinó la actividad hipoglucemiante y anticolinesterásica de quince extractos de actinomicetos marinos obtenidos a partir de Acetato de etilo. Ninguna de las quince cepas logró un porcentaje de inhibición superior al 50% frente a  $\alpha$ -amilasa; mientras que para  $\alpha$ -glucosidasa las cepas PBLC-02, PBCL-05 y MJG-20 obtuvieron una actividad inhibitoria fuerte con valores de  $CI_{50}$  de 84,41  $\mu\text{g/mL}$ , 56,51  $\mu\text{g/mL}$  y 64,78  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. En cuanto a acetilcolinesterasa las cepas PBLC-07 y MJH-08 a los cinco minutos mostraron valores de  $CI_{50}$  de 45,38  $\mu\text{g/mL}$  y 81,01  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Este efecto inhibitorio disminuyó a los 15 minutos, donde se observó valores de  $CI_{50}$  de 165,48  $\mu\text{g/mL}$  y 281,72  $\mu\text{g/mL}$ . En el caso de la cepa MJG-05, a los 5 minutos el valor calculado de  $CI_{50}$  fue de 332,18  $\mu\text{g/mL}$  y a los 15 minutos incremento a un valor de  $CI_{50}$  de 99,15  $\mu\text{g/mL}$ .

**Palabras claves:** *Actinomicetos,  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa, acetilcolinesterasa, inhibición,  $CI_{50}$ .*

## ABSTRACT

Actinomycetes from marine environments have become a rich source of bioactive substances, including enzyme inhibitors. In this study, the hypoglycemic and anticholinesterase activity of fifteen extracts of marine actinomycetes obtained from ethyl acetate were determined. None of the fifteen strains achieved a percentage of inhibition greater than 50% against  $\alpha$ -amylase; whereas for  $\beta$ -glucosidase the PBLC-02, PBCL-05 and MJG-20 strains obtained strong inhibitory activity with  $IC_{50}$  values of 84.41  $\mu$ g/mL, 56.51  $\mu$ g/mL and 64.78  $\mu$ g/mL respectively. As for acetylcholinesterase, the PBLC-07 and MJH-08 strains at five minutes showed  $IC_{50}$  values of 45.38  $\mu$ g/mL and 81.01  $\mu$ g/mL, respectively. This inhibitory effect decreased at 15 minutes, where  $IC_{50}$  values of 165.48  $\mu$ g/mL and 281.72  $\mu$ g/mL were observed. In the case of strain MJG-05, at 5 minutes the calculated  $IC_{50}$  value was 332.18  $\mu$ g/mL and at 15 minutes increment at an  $IC_{50}$  value of 99.15  $\mu$ g/mL.

**Key words:** *Actinomycetes,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, acetylcholinesterase, inhibition,  $IC_{50}$ .*

## INTRODUCCIÓN

Los actinomicetos son bacterias Gram-positivas que se caracterizan por formar filamentos ramificados denominadas hifas semejantes a los hongos, son saprofitas y sus células son procariotas. En las placas de agar se observan como colonias secas y no cremosas debido a que no producen mucopolisacáridos. Dentro de sus características particulares presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado “geosmina”. Los actinomicetos son abundantes en el ambiente, lagos, ríos, suelo y estiércol de animales (Dávila, Gallegos, Francisco, Ochoa, & Flores, 2013).

Los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora* son miembros del orden Actinomycetales que son ampliamente reconocidas por su potencial biotecnológico (Aponte, León, Rojas, Montero, & Loayza, 2015). Nuevas moléculas inhibitoras de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa han sido aisladas a partir de actinomicetos como el ftalato de dibutilo (Lee, 2000); o el Geranilfenaziodiol, un nuevo compuesto aislado del género *Streptomyces*, que posee una fuerte actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa humana (Ohlendorf, Schulz, Erhard, Nagel, & Imhoff, 2012), los cuales dan cuenta del gran aporte que dan estos microorganismos para el descubrimiento de nuevos fármacos utilizados para aliviar la sintomatología de la Diabetes Mellitus tipo II y la Enfermedad del Alzheimer.

El presente trabajo, se encuentra dividido en tres capítulos. En el primer capítulo se contempla el marco teórico que contiene toda la información científica para el desarrollo de la investigación. En el segundo capítulo se describen los materiales y métodos, donde se explica con claridad cada una de las metodologías que se siguió para conseguir los resultados deseados. Con  $\alpha$ -amilasa se siguió protocolos establecidos por Xiao, Storms, & Tsang (2006); mientras que para el ensayo con  $\alpha$ -glucosidasa el método descrito por Tao, Zhang, Cheng, & Wang (2013) fue el utilizado. Finalmente, con el método de Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone (1961) y con modificaciones de Rhee, Van De Meent, Ingkaninan, & Verpoorte (2001) se logró realizar el ensayo de actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa.

En función de lo descrito con anterioridad, la investigación se enfocó a contribuir al descubrimiento de sustancias potencialmente activas con interés en el tratamiento de la Diabetes y Alzheimer, a través del estudio de la inhibición de los sistemas enzimáticos de  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa y acetilcolinesterasa, a partir de extractos obtenidos de actinomicetos marinos. Los tres ensayos se realizaron con concentraciones conocidas

de cada extracto, con el fin de determinar parámetros de relevancia como el porcentaje de inhibición o la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) para identificar a aquellos microorganismos que resulten prometedores para posteriores estudios fitoquímicos.

Del presente estudio se desprende que, del conjunto de microorganismos evaluados, 6 cepas resultaron obtener la actividad inhibitoria más alta frente a los sistemas de  $\alpha$ -glucosidasa y acetilcolinesterasa, con valores inferiores a los 100  $\mu\text{g/mL}$ . De las 6 cepas evaluadas, 4 pertenecen al género *Streptomyces*, una cepa pertenece al género *Micromonospora* y una cepa aún se debe determinar su clasificación taxonómica.

## **CAPÍTULO I**

### **MARCO TEÓRICO**

## **1.1. Actinomicetos.**

### **1.1.1. Generalidades.**

Los actinomicetos son bacterias Gram-positivas generalmente aerobias que forman filamentos ramificados denominados hifas semejantes a los hongos. Son quimioautótrofos y realizan respiración aeróbica o en algunos casos fermentativa; son saprófitos y no ácido resistente. Estas bacterias son abundantes y cosmopolitas, por lo que las podemos encontrar en diversidad de ambientes como lagos, ríos, suelo y estiércol de animales (Dávila et al., 2013). El género *Streptomyces* ha sido el grupo de microorganismos más estudiado entre los Actinomicetos, sin embargo, otros géneros tales como *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Rhodococcus* y *Actinoplanes*, también han sido de gran interés por ser reportados como productores de nuevas sustancias bioactivas (Uzcátegui Negrón, Serrano, & Panizo, 2014).

Dentro de sus características particulares presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado “geosmina”. No producen mucopolisacáridos, de ahí que se observen en placas de agar como colonias secas y no cremosas (Dávila et al., 2013). Los actinomicetos son conocidos por ser productores de sustancias biológicamente activas como antibioticos, vitaminas y enzimas; además son una fuente diversa de metabolitos antimicrobianos (Franco et al., 2010).

### **1.1.2. Condiciones de crecimiento.**

Estos microorganismos se caracterizan por requerir nutrientes especiales para conseguir un crecimiento y un rendimiento aceptable. Algunos de los actinomicetos patógenos como *Actinomyces bovis*, *A. israelii*, *Corynebacterium*, etc. A menudo presentan un crecimiento lento y requieren caldos o medios como el de infusión cerebro-corazón y ser incubados en atmosferas especiales, tales como CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> (5:95 v/v). Sin embargo, existen gran variedad de actinomicetos saprófitos que viven en suelos y hábitats naturales que son capaces de crecer sin mayores requerimientos especiales y en medios menos complejos, para lo cual se desarrollaron formulaciones como agar de Conn, medio Krainsky y agar Kuster-Williams. Los miembros del género *Streptomyces*, que se caracterizan por abundante esporulación, son fácilmente aislados en estos medios (Srinivasan, Laxman, & Deshpande, 1991).

El medio ambiente y los factores genéticos pueden influir en la producción de sustancias bioactivas. El aislamiento de los actinomicetos se realiza en función de su hábitat, tratamientos efectuados, a los medios utilizados y las condiciones de

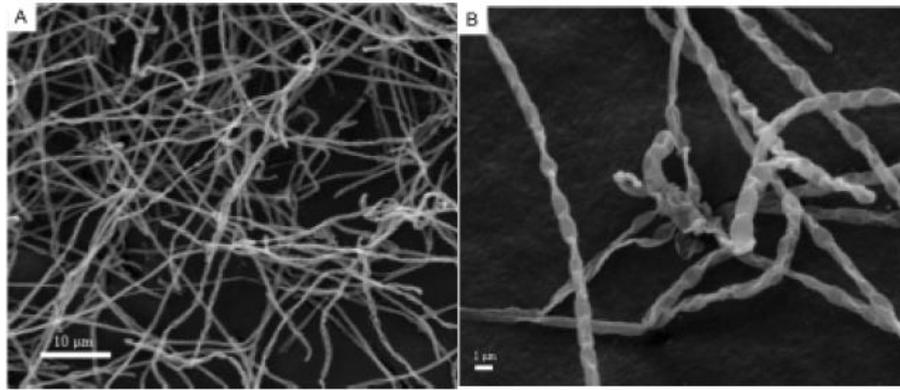
incubación. La mayoría de sustancias de interés han sido aisladas de cepas obtenidas de muestras de suelo, océanos y otros ambientes ricos en microorganismos (Uzcátegui Negrón et al., 2014).

### 1.1.3. Género *Streptomyces*.

Dentro del orden *Acnomycetales*, el género *Streptomyces* se destaca en la naturaleza por el mayor número de especies y variedades, que difieren mucho en su morfología, la fisiología, y las actividades bioquímicas (Taddei, Rodríguez, Márquez, & Castelli, 2006). Los *Streptomyces* ostentan un ciclo de vida morfológico y fisiológico complejo. En los suelos se encargan de degradar varios biopolímeros y material orgánico. Si se encuentran en medio sólido crecen en forma micelial formando filamentos ramificados carentes de septos internos. Estas bacterias cuentan con paredes celulares que están compuestas de una capa simple de peptidoglicano. La mayoría de los actinomicetos productores de sustancias bioactivas pertenecen a los *Streptomyces* (Pimienta & Vallín, 2005). Los metabolitos secundarios producidos por éstos tienen un amplio espectro de actividades biológicas, tales como antibacteriano (estreptomycin, tetraciclina, cloranfenicol), antifúngicos (nistatina), antiviral (tunicamicina), antiparasitario (Avermectina), inmunosupresores (rapamicina), anticancerígenos (Actinomicina, mitomicina C, antraciclina), inhibidores enzimáticos (ácido clavulánico) y diabetógenos (bafilomicina, estreptozotocina) (Arasu et al., 2006).

De acuerdo a Yashchuk & Miyazaki (2007) se puede identificar a las especies del género *Streptomyces* basándose en criterios morfológicos como el tipo de fragmentación del micelio vegetativo, la formación y la configuración de las cadenas de esporas y el tipo de formación del micelio.

En la **Figura 1A** y **Figura 1B** se muestran las características típicas del esporóforo y las esporas.



**Figura 1.** Cadenas de esporas de *Streptomyces* sp.: A) Forma de las cadenas de esporas (1250X); B) Número de esporas (5000X).  
**Fuente:** Tomado de Yashchuk & Miyazaki (2007).

#### 1.1.4. Género *Micromonospora*.

El género *Micromonospora* pertenece a la familia Micromonosporaceae que contiene actualmente 32 géneros. Son microorganismos mesófilos, Gram positivos, aerobios, filamentosos y productores de esporas. Muchas cepas producen pigmentos carotenoides miceliales que le dan una coloración naranja rojizo a las colonias. Entre las especies documentadas se encuentran: *Micromonospora coriariae*, *Micromonospora lupini*, *Micromonospora saelicesensis*, *Micromonospora pisi*, *Micromonospora cremea*, *Micromonospora zamorensis* y *Micromonospora halotolerans* (Carro, Riesco, Spröer, & Trujillo, 2016). De sedimentos marinos se ha aislado *Micromonospora fluostatini*, y de suelo de manglar la especie *Micromonospora maritima* (Veyisoglu et al., 2016).

Los antibióticos macrólidos como: Micromonospolides, mycinamicinas, megalomicina, rosamicina y juvenimicinas son producidos por los miembros del género *Micromonospora*, pero todos ellos difieren en el tamaño del anillo macrólido (Gärtner et al., 2011).

#### 1.2. Diabetes.

La diabetes es una afección crónica que se desencadena cuando el organismo pierde su capacidad de producir suficiente insulina o de utilizarla con eficacia. La insulina es una hormona que se fabrica en el páncreas y que permite que la glucosa de los alimentos pase a las células del organismo, en donde se convierte en energía para que funcionen los músculos y los tejidos. Como consecuencia de esto, una persona con diabetes no absorbe la glucosa apropiadamente, de modo que ésta queda circulando en la sangre a lo que se le denomina hiperglucemia. Como resultado hay un daño en los tejidos con el paso del tiempo. Este deterioro causa complicaciones para

la salud potencialmente letales (International Diabetes Federation, 2015). El nivel normal de glucosa en la sangre es aproximadamente 4 mM (120 mg/dL) pero aumenta aproximadamente a 12 mM (360 mg/dL) a los 30 minutos después de la ingesta de una dieta rica en carbohidratos (Uzcátegui Negrón et al., 2014).

Hay tres tipos principales de diabetes: La diabetes tipo 1, la tipo 2 y la gestacional (International Diabetes Federation, 2015). Debido a que los inhibidores enzimáticos son considerados útiles y de gran efecto frente a la sintomatología de la Diabetes tipo 2, en el presente estudio sólo se hará referencia a dicho tipo de patología.

### **1.2.1. Diabetes mellitus tipo II.**

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), las enfermedades cardiovasculares y el cáncer son un creciente problema en todo el mundo, especialmente en países desarrollados (Van de Laar, 2008). Se espera que para el 2035 los casos de DM2 aumenten en un 55%. En 2014, el costo del tratamiento de la diabetes ascendió a más de 612 millones de dólares a nivel mundial (Malunga, Eck, & Beta, 2016).

La DM2 es considerada un trastorno metabólico multifactorial caracterizada por hiperglucemia y un metabolismo anormal de los carbohidratos. Se asocia con varias complicaciones como la hiperlipidemia, la retinopatía y las enfermedades cardiovasculares que son las principales causas de morbilidad y mortalidad (Ghosh et al., 2014). La OMS ha proyectado que para el 2030 la diabetes será la séptima causa de muerte a nivel mundial (World Health Organization, 2016). Se espera que la población diabética en todo el mundo ascenderá a 418 millones para el año 2025 y es probable que esta cifra aumente hasta 552 millones en 2030 (Ghosh et al., 2014).

El tratamiento de la diabetes en la actualidad implica sobre todo la disminución de la hiperglucemia con el suministro de insulina y con el uso de varios grupos de fármacos como biguanidas, tiazolidinedionas, sulfonilureas, meglitinidas y los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa. Sin embargo, debido a la molesta presencia de los efectos secundarios hay un aumento de la demanda de nuevos agentes antidiabéticos (Ghosh et al., 2014).

Los principales inhibidores de la glucosidasa: acarbosa y miglitol, suelen producir diarrea, dolor intestinal y flatulencia. Ensayos realizados con inhibidores de la glucosidasa informan que estos efectos secundarios gastrointestinales son la razón más común de inconformidad de los pacientes diabéticos (Yilmazer, Griffith, Michels, Schneider, & Frei, 2015). Por lo tanto, se cree que los microorganismos podrían ser una rica fuente inexplorada de fármacos antidiabéticos potentes y que logren evitar los

indeseados efectos secundarios que causan los fármacos ya existentes (Ghosh et al., 2014).

### **1.3. Enfermedades neurodegenerativas.**

Se caracterizan por causar la muerte progresiva de neuronas en diferentes regiones del sistema nervioso. Esta pérdida progresiva de las células nerviosas es lo que origina los signos y síntomas neurológicos y neuropsicológicos característicos de cada una de ellas. El progreso de este tipo de enfermedades es inevitable, por lo cual la estimulación cognitiva es una intervención adecuada para conseguir ralentizar el deterioro cognitivo y funcional. La Esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington, el Parkinson y la enfermedad del Alzheimer se encuentran entre las más importantes enfermedades neurodegenerativas (NeuronUp, 2015).

#### **1.3.1. Alzheimer.**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más común que se caracteriza por el deterioro cognitivo progresivo y la pérdida generalizada de las neuronas y sus sinapsis en la corteza cerebral y el hipocampo. Se estima que una de cada ocho personas mayores de 65 años de edad padece de EA (Liu et al., 2016).

Algunos estudios realizados han dado a conocer que la reducción de los niveles de acetilcolina (ACh) en el hipocampo, debido ya sea por causas naturales como el envejecimiento, o por causas farmacológicas, se correlaciona específicamente con insuficiencia en la memoria espacial (Gawel et al., 2016). En el cerebro de los mamíferos, los niveles sinápticos de ACh se regulan por dos tipos de colinesterasas: la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa que hidrolizan a la ACh (Giacobini, 2004).

Existen varios tratamientos farmacológicos para el tratamiento de la EA, entre los que se encuentra el donepezilo y la rivastigmina. El Donepezilo es un inhibidor reversible de la acetilcolinesterasa de acción central, mientras que la rivastigmina, es un agente altamente potente que bloquea tanto la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa. Estos medicamentos están aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) como el tratamiento de primera elección para aliviar los síntomas presentados por la enfermedad (Gawel et al., 2016).

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa aumentan la concentración de acetilcolina en las sinapsis colinérgicas y frenan la progresión de la enfermedad. Los pacientes con EA a menudo también utilizan anticolinérgicos urinarios para el control de la incontinencia urinaria. (Bosch, 1998).

Los síntomas de la EA incluyen pérdida de memoria, déficit de idioma, depresión, agitación, demencia y trastornos del estado de ánimo. Pero la causa exacta de la EA aún no se conoce. Varias hipótesis se han formado para tratar de explicar la causa de la enfermedad. Entre éstas, la más antigua, y es precisamente en la que se basan la mayoría de los fármacos disponibles en la actualidad, es la hipótesis colinérgica, que propone que la EA es causada por una reducción en la síntesis del neurotransmisor acetilcolina (Varadaraju et al., 2013).

La Hipótesis colinérgica se basa en la observación de una pérdida significativa en las señales colinérgicas, tales como una pérdida severa de la materia blanca del cerebro con la consiguiente reducción de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (es decir, Acetilcolina [ACh], receptores nicotínicos/muscarínicos), observados en la corteza cerebral (post-mortem) de pacientes con EA. Una reducción significativa del número de los sitios de unión de la Acetilcolina en la corteza cerebral de pacientes con Alzheimer, significa un descenso en el número de receptores colinérgicos. Además, la actividad de la enzima ColinaAcetiltransferasa (ChAT) y Acetilcolinesterasa (AChE) se encuentran también disminuidas. Estas dos enzimas están involucradas en la síntesis y degradación de la Acetilcolina, por ejemplo, la ChAT transfiere un grupo acetilo de la coenzima (Acetil-CoA) a Colina, produciendo el neurotransmisor Acetilcolina, mientras que la AChE cataliza la reacción de hidrólisis de la ACh. Consecuentemente, cualquier falla en el sistema colinérgico está estrictamente ligado a un déficit de atención, aprendizaje y de memoria (Russo et al., 2015).

#### **1.4. Inhibición enzimática.**

##### **1.4.1. Tipos de inhibición.**

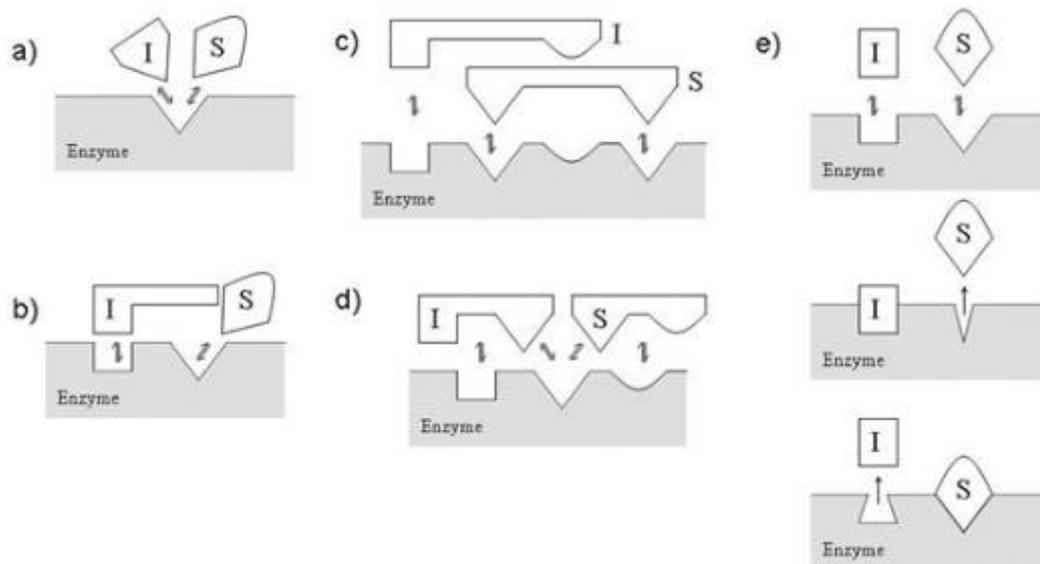
Hay tres tipos principales de inhibición: La inhibición competitiva, la no-competitiva y la incompetitiva. Comúnmente son utilizadas para describir la unión de un inhibidor a una enzima. Sin embargo, para obtener un análisis completo del mecanismo de acción se requiere tomar en cuenta y evaluar también otros eventos potenciales como la inhibición de tipo alostérica, la inhibición parcial, inhibición de unión fuerte y aquella dependiente del tiempo (Strelow et al., 2012).

La actividad de muchas enzimas se puede inhibir mediante la unión específica de moléculas pequeñas y de iones. Este medio de inhibición de la actividad de la enzima sirve como un mecanismo de control importante en los sistemas biológicos. La regulación de las enzimas alostéricas tipifica este tipo de control. Además, muchos

fármacos y agentes tóxicos actúan mediante la inhibición de enzimas (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002).

#### 1.4.2. Inhibición competitiva.

En la inhibición competitiva el sustrato y el inhibidor no se pueden unir a la misma enzima al mismo tiempo. Un inhibidor competitivo se une sólo a la enzima libre. A menudo, este acontecimiento de unión se produce en el sitio activo de la diana, precisamente donde el sustrato también se une (**Figura 2**). Aunque este es el caso para la mayoría de los inhibidores competitivos, es una simplificación excesiva engañosa. Es más apropiado decir que la unión de un inhibidor competitivo y la unión del sustrato son eventos que se excluyen mutuamente uno del otro (Strelow et al., 2012).



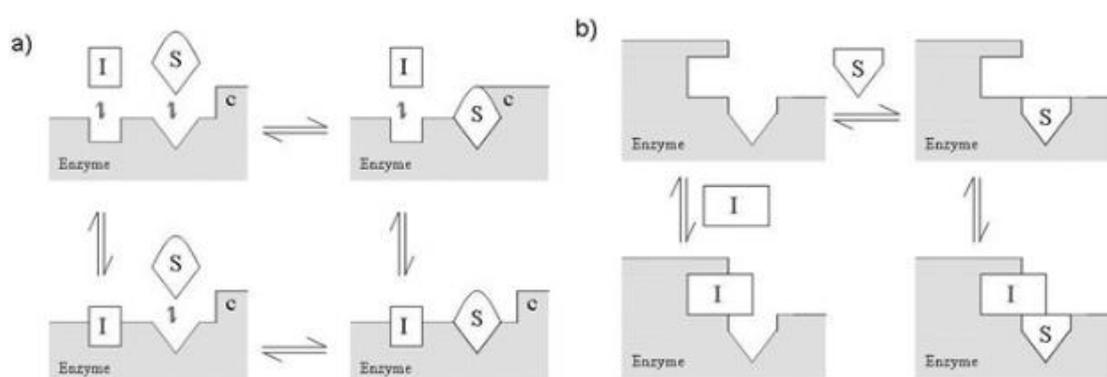
**Figura 2.** Ejemplos de inhibición competitiva, donde el sustrato (S) y el inhibidor (I) son eventos que se excluyen mutuamente. (a) modelo clásico para la inhibición competitiva en la que el I y S compiten por la misma región del sitio activo. (b) I no se une al sitio activo, pero impide estéricamente que S se vincule. (c) Los sitios de unión para S e I se solapan. (d) S e I comparten una unión común en la enzima. (e) I al unirse da lugar a un cambio conformacional que impide que el S se una (y viceversa).

Fuente: Tomado de Strelow et al., (2012).

A pesar que existen diferencias en la unión a una enzima libre, todos los inhibidores competitivos tienen los mismos efectos sobre la unión del sustrato y la catálisis. Un inhibidor competitivo aumentará el valor aparente de  $K_m$  de su sustrato sin cambio en el valor aparente de la  $V_{max}$ . Como resultado, a menudo se indica que la inhibición competitiva puede ser superada, observado por un aumento en el valor aparente de  $K_i$ , a mayores concentraciones de sustrato (Strelow et al., 2012).

### 1.4.2. Inhibición no competitiva.

Un inhibidor no competitivo se puede unir a la enzima al mismo tiempo que el sustrato. Un inhibidor no competitivo se une tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato. Estos eventos de unión se producen exclusivamente en un sitio distinto del sitio activo ocupado por el sustrato. La **Figura 3** proporciona algunos ejemplos de los acontecimientos de unión no competitivos más comunes (Strelow et al., 2012).



**Figura 3.** Ejemplos de inhibición no competitiva donde el inhibidor (I) se une a un sitio diferente del sitio de unión del Sustrato (S) y del Centro Catalítico (c) del sitio activo. (a) En este modelo, la unión de S induce un cambio conformacional para alinear el centro catalítico cerca de S para la catálisis. Sin embargo, cuando I se une en un lugar separado, el cambio de conformación no se produce y la actividad de la enzima se inhibe. (B) En este modelo, el I puede obstaculizar estéricamente la unión y liberación de S. Sin embargo, I y S pueden ocupar la enzima al mismo tiempo.

**Fuente:** Tomado de Strelow et al.,( 2012).

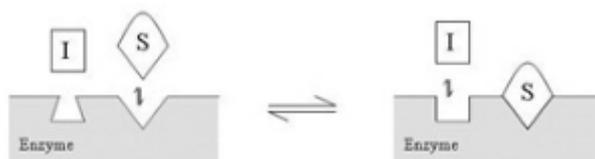
En contraste con un inhibidor competitivo, un inhibidor no competitivo bajará el valor aparente  $V_{max}$ , sin embargo, no hay ningún efecto sobre el valor aparente de  $K_m$  por su sustrato. Esencialmente, el  $K_i$  del inhibidor no cambia en función de la concentración de sustrato (Strelow et al., 2012).

En algunas circunstancias, un compuesto puede tener afinidad desigual tanto para la enzima libre y el complejo enzima-sustrato. Esta mezcla de fenotipos competitivos y no competitivos se llama ***inhibición mixta*** (Strelow et al., 2012).

### 1.4.3. Inhibición incompetitiva.

Un inhibidor incompetitivo se une exclusivamente al complejo enzima-sustrato produciendo un complejo inactivo enzima-sustrato-inhibidor (**Figura 4**). Cuando se encuentran, el valor aparente de  $V_{max}$  y el valor aparente de  $K_m$ , deben disminuir. A pesar de su rareza en los programas de descubrimiento de fármacos, los inhibidores

incompetitivos podrían tener consecuencias fisiológicas dramáticas. A medida que el inhibidor reduce la actividad de la enzima, hay un incremento en la concentración local de sustrato. Sin un mecanismo para limpiar la acumulación de sustrato, la potencia del inhibidor incompetitivo aumentará (Strelow et al., 2012).



**Figura 4.** Un ejemplo de inhibición incompetitiva donde el inhibidor (I) sólo se une en presencia de sustrato (S).

**Fuente:** Tomado de Strelow et al., (2012).

#### 1.4.5. Inhibición alostérica.

Un inhibidor alostérico disminuye la actividad mediante la unión a un sitio alostérico distinto de los además del sitio activo en el objetivo. Esta interacción se caracteriza por un cambio conformacional en la enzima diana que se requiere para la inhibición. Estos cambios conformacionales pueden afectar la formación del complejo enzima-sustrato en el sitio activo. La **Figura 2e** y **Figura 3a** son ejemplos clásicos de inhibición alostérica. Como tal, un inhibidor alostérico puede mostrar un fenotipo competitivo, no competitiva, o incompetitiva con respecto a la unión del sustrato (Strelow et al., 2012).

#### 1.4.6. Inhibición parcial.

La inhibición parcial es el resultado de la formación de un complejo enzima-sustrato-inhibidor que puede generar producto con menos facilidad que el complejo enzima-sustrato. Esto se puede ilustrar en la **Figura 3a**. Cuando "I" es un inhibidor parcial unido en el complejo enzima-sustrato-inhibidor, el centro catalítico puede retener cierta capacidad para alinear cerca el sustrato y facilitar la catálisis. Como consecuencia de estos cambios estructurales, los inhibidores parciales también pueden ser inhibidores alostéricos de la actividad enzimática (Strelow et al., 2012).

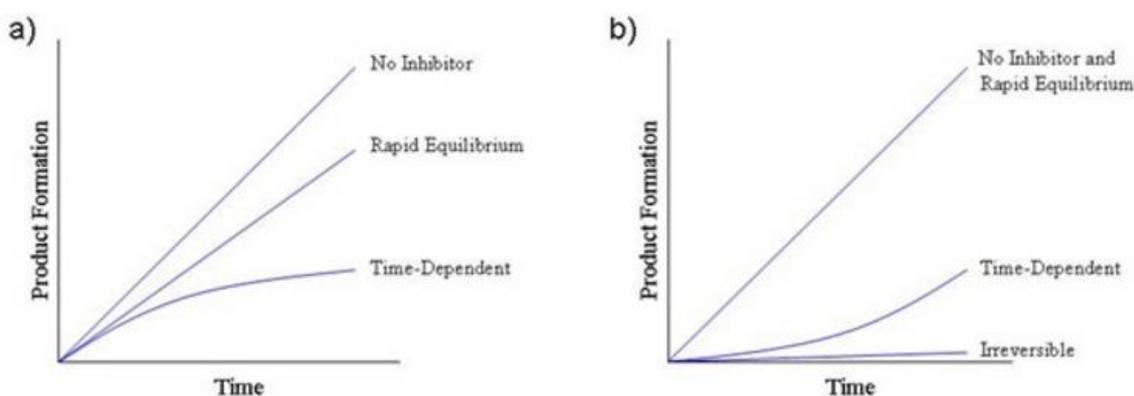
#### 1.4.7. Inhibición de unión fuerte.

En este tipo de inhibición, la población libre del inhibidor se agota de manera significativa por la formación del complejo enzima-inhibidor o enzima-sustrato-inhibidor. Mientras que los inhibidores de unión fuerte se pueden unir a la enzima diana de manera competitiva, no competitiva, o incompetitiva con respecto a la unión

del sustrato, pueden mostrar fenotipos no competitivos. Sin embargo, un inhibidor de unión fuerte típicamente se une con una afinidad aparente ( $K_i$ ) cerca de la concentración de la enzima (sitios activos) presentes en el ensayo bioquímico (Strelow et al., 2012).

#### 1.4.8. Inhibición dependiente del tiempo.

Los inhibidores dependientes del tiempo se unen lentamente a la enzima a una velocidad menor en la escala de tiempo de rotación enzimática, y presentan por lo tanto un cambio en la velocidad inicial. Esto tiene el efecto de ralentizar la aparición observada de inhibición. Los inhibidores dependientes del tiempo también impiden la recuperación de la actividad enzimática observada después de la inhibición, lo que resulta en valores de  $k_{off}$  lentos. Como se ilustra en la **Figura 5**, estos inhibidores típicamente producen velocidades iniciales no lineales y recuperación de la actividad enzimática no lineal (Strelow et al., 2012).



**Figura 5.** Ilustraciones de la inhibición dependiente del tiempo. (a) Este gráfico muestra la disminución de la velocidad inicial (producto formado vs tiempo), inhibidor de equilibrio rápido y un inhibidor dependiente del tiempo. Esta última produce una curva de progreso no lineal consistente con un valor  $k_{on}$  lento. (b) Esta gráfica representa la recuperación de la actividad enzimática (producto formado vs tiempo) después de la dilución del complejo enzima- inhibidor con el sustrato. La dilución de un complejo de inhibidor de equilibrio rápido recobra toda la actividad inmediatamente después de la dilución. La dilución de los complejos con inhibidores dependientes del tiempo se recupera la actividad enzimática más lentamente, indicativo de un compuesto con un valor de  $k_{off}$  lento. La dilución de los complejos de inhibidor irreversible mantiene el complejo enzima-inhibidor después de la dilución.

**Fuente:** Tomado de Strelow et al., (2012).

Curiosamente, muchos fármacos terapéuticos exitosos son inhibidores dependientes del tiempo. Para estos inhibidores con valores de  $k_{off}$  lentas, la velocidad de liberación del inhibidor del complejo enzima-inhibidor (recuperación de la actividad enzimática) procede independiente de la concentración de sustrato y el mecanismo fisiológico para eliminar el inhibidor. Esto hace que la inhibición dependiente del tiempo aporte una

estrategia muy atractiva y probada para el descubrimiento y desarrollo de fármacos (Strelow et al., 2012).

## **1.5. Ensayos de actividad hipoglucemiante.**

### **1.5.1. Alfa amilasa.**

La familia de las amilasas (endo-1,4-alfa-D-glucan glucanohidrolasa) cortan el enlace glucosídico de las cadenas de almidón para la producción de oligosacáridos más cortos (Santorelli et al., 2016).

Los carbohidratos que se encuentran con más frecuencia presentes en la dieta son el almidón y la sacarosa. La amilasa salival y pancreática se encarga de hidrolizar el almidón principalmente a maltosa y otros hidratos de carbono de cadena corta (Malunga et al., 2016).

A bajas concentraciones la glucosa y la galactosa se absorben a través de SGLT1 y la fructuosa mediante el GLUT5. Los azúcares pasan por el intestino por difusión pasiva a través de GLUT2 y GLUT5. Si existen niveles altos de glucosa y galactosa en el lumen SGLT2 se encarga de facilitar la inserción de GLUT2 en la membrana apical del enterocito para ayudar a la absorción de glucosa y galactosa. Por lo tanto la reducción de actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa intestinal y/o la absorción de glucosa podría prevenir o tratar la diabetes mellitus tipo 2 (Malunga et al., 2016).

Existen principalmente dos tipos de ensayos que se utilizan para determinar la actividad de la  $\alpha$ -amilasa. Uno se basa en la medición de la cantidad de azúcares reductores por el ácido dinitrosalicílico (DNS), mientras que el otro se basa en la disminución de valor de tinción azul de los complejos de yodo-almidón. El segundo método, que fue desarrollado por Fuwa (1954) y es ampliamente utilizado, se basa en el desarrollo de complejos de color azul que resulta de la unión del yodo a los polímeros del almidón. Al romperse o hidrolizarse el almidón en unidades más pequeñas de carbohidrato, el color azul desaparece. La formación del complejo y por consiguiente la coloración azul se puede medir espectrofotométricamente a una longitud de onda de 580 nm y permite la cuantificación de la concentración de almidón. Esta prueba puede determinar el final de una hidrólisis, cuando ya no hay cambio de color constituyendo una evidencia experimental ampliamente utilizada (Xiao et al., 2006).

### **1.5.2. Alfa glucosidasa.**

Las  $\alpha$ -glucosidasas se ubican en las membranas del intestino delimitadas por dos complejos de proteínas, la maltasa-glucoamilasa (MGAM) y sacarasa-isomaltasa (SI). Las cuatro subunidades N- y las subunidades C-terminales de MGAM y los complejos de SI hidrolizan los enlaces 1,4 alfa glucosídicos de almidón y producen glucosa libre. Por la actividad conocida de la maltasa, se nombró Ct (subunidad C-terminal) MGAM glucoamilasa debido a su actividad en oligómeros de cadena más larga, y Nt (subunidad N-terminal) SI fue nombrado como isomaltasa debido a su actividad desramificante (Dhital, Lin, Hamaker, Gidley, & Muniandy, 2013).

La hiperglucemia es el resultado de un aumento de los niveles de glucosa en sangre que se da por la hidrólisis de almidón ocasionado por la enzima  $\alpha$ -amilasa y por la liberación de glucosa en el intestino delgado por el trabajo de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. Con la inhibición de estas enzimas se logra un decremento en la hiperglucemia posprandial y podría ser una alternativa muy útil para el control de la diabetes mellitus (López, Aguilar, & Dublán, 2014).

Muchos métodos se han descrito para determinar la actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa, entre ellos el método descrito por Collins, Ng, Fong, Wan, & Yeung (1997) ha servido como base para que otros autores modifiquen el método de acuerdo a sus requerimientos. Este ensayo se realiza en una microplaca que ofrece una gran comodidad, velocidad y reproducibilidad. La actividad inhibidora de la glucosidasa es determinada por la medición de la liberación de p-Nitrofenol (*p*-NP) a partir de p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (*p*NPG). El producto liberado de p-nitrofenol da una coloración amarilla que puede ser absorbida a 405 o 412 nm y leída en un espectrofotómetro (Deutschländer, van de Venter, Roux, Louw, & Lall, 2009).

## **1.6. Ensayos de actividad anticolinesterásica.**

### **1.6.1. Acetilcolinesterásica.**

La acetilcolinesterasa (AChE) es una esterasa situada en las hendiduras sinápticas que hidroliza la acetilcolina en acetato y colina. (Varadaraju et al., 2013).

La acetilcolina (ACh) es el principal y más abundante neurotransmisor en el cerebro y es responsable de la función colinérgica. La acetilcolinesterasa (AChE) juega un papel importante en la hidrólisis de la acetilcolina. Hasta la fecha, el tratamiento de la

enfermedad de Alzheimer está basado en drogas para reducir el deterioro cognitivo mediante la mejora de la función colinérgica (Varadaraju et al., 2013).

Terapéuticamente, la aplicación controlada de inhibidores de la AChE se usa para aumentar los niveles sinápticos de acetilcolina en las enfermedades que alteran la neurotransmisión de acetilcolina como en la EA (Downes & Granato, 2004).

Muchos métodos principalmente el de Ellman et al., (1961) se han desarrollado para inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa. Se trata de un método colorimétrico. La enzima al hidrolizar el sustrato (Acetilcolina) da el producto resultante tiocolina que reacciona con el reactivo de Ellman (DTNB) para producir 2-nitrobenzoato-5-mercaptothiocholine y 5-tio-2-nitrobenzoato de metilo que puede ser detectado a 405 nm.

Algunos autores como Salles, Viana, Van De Meent, Rhee, & Verpoorte (2003) y Niño, Hernández, Correa, & Mosquera (2006) han hecho sus propias modificaciones al método de Ellman entre las que podemos citar, cambios en las cantidades de los reactivos, tiempos de lectura, longitud de onda (412 nm) incubación y preincubación.

### **1.7. Inhibidores enzimáticos comerciales.**

Los inhibidores de la glucosidasa se prescriben comúnmente para los diabéticos para reducir la hiperglucemia postprandial, producto de la absorción de almidón en el intestino. Los inhibidores están creados para inhibir principalmente las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, dos miembros del grupo de las hidrolasas que se encuentran en el tracto intestinal y que son protagonistas en la digestión de los hidratos de carbono. La inhibición global consiste en conseguir un descenso de los valores de glucosa postprandial en el torrente sanguíneo, limitando la absorción de glucosa a partir de los carbohidratos de la dieta (Yilmazer et al., 2015).

Los inhibidores terapéuticos de la glucosidasa (acarbose, miglitol y voglibose) tienen también fuerte actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa lo que ocasiona molestias en el tracto digestivo como dolor abdominal, flatulencias, aerofagia y diarrea, por lo tanto, nuevos inhibidores naturales serían útiles y podrían representar una terapia efectiva para la hiperglucemia post-prandial con efectos secundarios mínimos (López et al., 2014).

En el caso de la AChE, su inhibición conduce a un exceso de acetilcolina en las sinapsis neuromusculares, seguido de la activación de los receptores de acetilcolina (Downes & Granato, 2004).

Con los síntomas de la enfermedad de Alzheimer (EA) y basándose en la hipótesis colinérgica se condujo al desarrollo de inhibidores de la colinesterasa, que actúan mediante la inhibición de las dos enzimas responsables de la degradación de la acetilcolina: la acetilcolinesterasa (AChE) o butirilcolinesterasa (BuChE) (Onor, Trevisiol, & Aguglia, 2007).

Terapéuticamente, la aplicación controlada de inhibidores de la AChE se usa para aumentar los niveles sinápticos de acetilcolina en las enfermedades que alteran la neurotransmisión de acetilcolina como en la EA (Downes & Granato, 2004).

Al comienzo del siglo 21, evaluaciones médicas con uso de tecnologías, recomendaron la inclusión de tres agentes, para el tratamiento sintomático de las manifestaciones leves a moderadas de la enfermedad de Alzheimer: rivastigmina, donepezilo y galantamina. La Rivastigmina es un lento inhibidor reversible de la AChE y BuChE, mientras que el donepezilo y galantamina no muestran inhibición funcional de BuChE, y se consideran inhibidores selectivos y rápidamente reversibles de AChE (Onor et al., 2007).

Actualmente la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) tiene aprobados los siguientes fármacos como inhibidores anticolinesterásicos para el tratamiento de la EA: Tacrina, Donepezilo, Rivastigmina y Galantamina (Varadaraju et al., 2013).

## **CAPÍTULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2.1. Microorganismos de estudio.**

Las quince cepas de interés para el estudio de la inhibición de la actividad enzimática se encuentran almacenadas en el cepario (crioreservas -80°C) del Departamento de Química en la sección de Química Básica y Aplicada. Las cepas fueron aisladas mediante técnicas microbiológicas, a partir de sedimento. La recolección se la realizó en el año 2010 en el Manglar de Jambelí en la provincia de El Oro.

Con el análisis molecular respectivo se determinó que las cepas pertenecen a los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora*. Los datos de los procesos de recolección, aislamiento y análisis molecular de las cepas de estudio formaron parte de un proyecto interno del Departamento por lo que no se citarán en este estudio.

## **2.2. Reactivación de las cepas.**

A cada una de las cepas se las reactivó en 50 ml de medio A1 (Almidón, extracto de levadura, peptona y carbonato de calcio) al 75% de agua de mar artificial y, se incubaron por 7 días a 30 °C y 200 r.p.m.

El detalle de la composición porcentual usada en la elaboración del medio A1 y el agua de mar artificial se detallan en el Anexo 1.

## **2.3. Escalado del cultivo en medio A1 y obtención de extractos.**

Para el proceso de fermentación se utilizó frascos Fernbach de 2.8 L cada uno contenía un volumen de 1 L de medio A1 y se emplearon las mismas condiciones de cultivo requeridas en la reactivación de las cepas. Transcurridos los 7 días de incubación, se agregó a cada uno de los fermentadores 20 g/L de resina esteril Amberlite® XAD-7HP (SIGMA), la misma que se lavó repetidamente con metanol y agua destilada, para lograr una mayor adsorción de los productos orgánicos contenidos en cada uno de los cultivos. Se llevó a agitación a 200 r.p.m. por un período mínimo de dos horas y a continuación se procedió a filtrar con gasa estéril para separar la resina y restos orgánicos, del residuo acuoso.

El producto orgánico se extrajo con 1 L de Acetato de Etilo (AcOEt) por al menos cuatro horas a 200 r.p.m. Se filtró nuevamente y el residuo se concentró a presión reducida a 30°C en un rotaevaporador, hasta obtener el extracto seco de cada una de las quince cepas seleccionadas.

## **2.4. Ensayos enzimáticos.**

### **2.4.1. Preparación de las muestras.**

Se disolvieron 10 mg de cada extracto en una mezcla Metanol:H<sub>2</sub>O en proporción 1:1. Para evitar interferencias durante la lectura, las muestras se centrifugaron por 5 minutos a 13 000 r.p.m. y se usó el sobrenadante para determinar la capacidad inhibitoria en cada uno de los ensayos enzimáticos descritos a continuación. En caso de inhibición completa se realizaron diluciones de la solución del extracto en PBS (SIGMA-P4417).

### **2.4.2. Ensayo de inhibición frente a alfa amilasa.**

La actividad inhibidora se mide de acuerdo al método descrito por Xiao et al., (2006), con ligeras modificaciones. Se utilizó acarbosa como control positivo a una concentración de 5 mg/mL. El sustrato se preparó disolviendo 1 g de almidón en 50 mL de NaOH 0,4 M y se calentó durante 5 minutos a 100 °C. Después de enfriar en agua fría, el pH de la solución se ajustó a 7 con HCl 2 M y después se añadió H<sub>2</sub>O para completar 100 mL. La mezcla de 35 µL de la solución de PBS, 20 µL del sustrato y 5 µL de la muestra se preincubó en un placa de 96 pocillos a 37 °C durante 1 minuto. A continuación se añadió 20 µL de una solución de α-amilasa de 50 µg/mL (SIGMA-A3176) a cada pocillo. La placa se incubó durante 15 min. Finalmente, la reacción se detuvo con la adición de 50 µL de HCl 0,1 M y, se añadió 150 µL de una solución de yodo 0,5 mM (0,5 mM I<sub>2</sub> y 0,5 mM KI) y la absorbancia se midió en un espectrofotómetro lector de microplacas modelo EPOCH 2 (BIOTEK ®) a 580 nm. La actividad inhibidora (%) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula descrita por Kusano et al., (2011):

$$\% \text{ de Inhibición} = [1 - (ABS2 - ABS1)/(ABS4 - ABS3) \times 100]$$

Donde, Abs 1 es la absorbancia de la solución incubada que contiene la muestra, el almidón y amilasa, Abs 2 es la absorbancia de la solución incubada que contiene la muestra y el almidón, Abs 3 es la absorbancia de la solución incubada que contiene almidón y amilasa, y Abs 4 es la absorbancia de la solución incubada que contiene almidón. El desarrollo del método y sus respectivos controles se puede visualizar en el Anexo 2.

El valor de CI<sub>50</sub> se calculó mediante el modelo de ajuste de la curva en el programa estadístico IBM-SPSS (ESTADÍSTICA 20).

### 2.4.3. Ensayo de inhibición frente a $\alpha$ -glucosidasa.

Se determinó la actividad inhibidora de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa usando una placa de 96 pocillos y, *p*-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (*p*NPG, SIGMA N1377) como sustrato, de acuerdo con el método descrito por Tao et al., (2013) con ligeras modificaciones. En primer lugar, 75  $\mu$ L de PBS (SIGMA-P4417) se mezcló con 5  $\mu$ L de la muestra y 20  $\mu$ L de la solución de enzima (SIGMA G5003, 0.15 U/mL en PBS pH 7,4), a continuación, se preincubó a 37 °C durante 5 minutos antes de la iniciación de la reacción mediante la adición de sustrato. Después de la preincubación, se añadió 20  $\mu$ L de *p*NPG (5 mM en buffer fosfato, pH 7,4) y después se incubó a 37 °C. La cantidad de *p*-Nitrofenol (*p*-NP) liberado se midió en un espectrofotómetro lector de microplacas EPOCH 2 (BIOTEK ®) a 405 nm durante 60 minutos, registrando la absorbancia cada 5 minutos. El desarrollo del método y sus respectivos controles se puede visualizar en el Anexo 3.

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición por medio de la siguiente fórmula descrita por Choi, Lee, & Kim, (2015):

$$\% \text{ de Inhibición} = [(A_o - A_s)/A_o] \times 100$$

Donde,  $A_o$  es la absorbancia registrada por la actividad enzimática sin inhibidor (control), y  $A_s$  es la absorbancia registrada para la actividad enzimática en presencia del inhibidor (muestra). El valor de  $CI_{50}$  se calculó mediante el modelo de ajuste de la curva en el programa estadístico IBM-SPSS (ESTADÍSTICA 20). La acarbosa se utilizó como control positivo a una concentración de 5 mg/mL.

### 2.4.4. Ensayo de inhibición frente acetilcolinesterasa

La actividad inhibidora de AChE se midió utilizando el método espectrofotométrico desarrollado por Ellman et al., (1961) con una ligera modificación sugerida por Rhee et al., (2001). La Acetilcolina (AcSCh, SIGMA-O1480) se utilizó como sustrato para detectar la inhibición de la AChE. La mezcla de reacción contenía 40  $\mu$ L de Buffer A (Tris-HCl, 50 mM, pH 8, suplementado con NaCl 0,1 M y  $MgCl_2$  0,02 M  $6.H_2O$ ), 20  $\mu$ L del extracto, 20  $\mu$ L de AcSCh (15 mM, PBS pH 7,4 SIGMA-P4417) y 100  $\mu$ L de DTNB (3 mM, SIGMA-D218200; disuelto en buffer A). La mezcla se preincubó durante 3 min a 25 °C. Finalmente, la reacción enzimática inició con la adición de 20  $\mu$ L de AChE (0,5 U/mL, SIGMA-C3389, disuelta en buffer A) y se incubó a 25 °C durante 15 minutos. La cantidad de producto liberado se controló en un lector de microplacas EPOCH 2 (BIOTEK ®), a 412 nm, registrando la absorbancia cada 60 segundos. El

ensayo se realizó por triplicado y se usó una placa de 96 pocillos. El desarrollo del método y sus respectivos controles se puede visualizar en el Anexo 4.

El porcentaje de la actividad inhibidora de AChE (% INH) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inibición} = [1 - (As)/Ao] \times 100$$

Donde, Ao es la absorbancia registrada por la actividad enzimática sin inhibidor (control de la actividad enzimática), y As es la absorbancia registrada por la actividad enzimática en presencia del inhibidor (muestra analizada). El valor de CI<sub>50</sub> se calculó mediante el modelo de ajuste de la curva en el programa estadístico IBM-SPSS (ESTADÍSTICA 20). Donepezilo (SIGMA-D6821) se utilizó como control positivo.

## **CAPÍTULO III**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. Obtención de los extractos.

Se cultivó 1L por cada microorganismo reactivado. Se empleó resina Amberlite XAD-7HP (20 g) y 1 litro de Acetato de etilo para la obtención de los metabolitos presentes en el caldo de cultivo. El extracto resultante se filtró y concentró a presión reducida a 30°C en un rotaevaporador. Sus características fisicoquímicas se muestran en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Características fisicoquímicas de los extractos crudos.

Extracto crudo	Características			
	Cantidad mg/L	Género	Color	Solubilidad
<b>PBLC-01</b>	214,4	<i>Streptomyces</i>	Café	AcOEt
<b>PBLC-02</b>	118,1	<i>Streptomyces</i>	Café	AcOEt
<b>PBLC-04</b>	181,9	<i>Streptomyces</i>	Café-naranja	AcOEt
<b>PBLC-05</b>	221,8	<i>Streptomyces</i>	Naranja	AcOEt
<b>PBLC-07</b>	119,5	<i>Micromonospora</i>	Café-oscuro	AcOEt
<b>PBLC-08</b>	248,9	<i>Micromonospora</i>	Café-naranja	AcOEt
<b>PBLC-09</b>	159,9	<i>Streptomyces</i>	Café	AcOEt
<b>PBLC-12</b>	272,9	<i>Micromonospora</i>	Naranja	AcOEt
<b>PBLC-14</b>	176,4	<i>Micromonospora</i>	Café	AcOEt
<b>MJA-05</b>	306	<i>Streptomyces</i>	Café	AcOEt
<b>MJH-08</b>	222,4	Por determinar	Café	AcOEt
<b>MJG-02</b>	212,3	<i>Streptomyces</i>	Café	AcOEt
<b>MJG-03</b>	132,2	<i>Streptomyces</i>	Café-oscuro	AcOEt
<b>MJG-05</b>	175,4	<i>Streptomyces</i>	Café	AcOEt
<b>MJG-20</b>	54,6	<i>Micromonospora</i>	Café-naranja	AcOEt

Fuente: Autora.

Generalmente los extractos crudos consisten en mezclas de compuestos extraídos en base a su afinidad química durante el proceso de separación, por tal razón el uso de los solventes adecuados permite una separación idónea de los principios activos debido a la polaridad que presentan. León, Liza, & Soto (2007) menciona que el uso del Acetato de etilo permite obtener extractos con actividad inhibitoria como resultado de la polaridad del solvente que no altera la composición y conserva las características de los compuestos activos además de conseguir un rendimiento variable de cada uno de los extractos.

En una investigación realizada por Suthindhiran, Jayasri, & Kannabiran (2009) también utilizó el acetato de etilo como disolvente para la obtención del extracto de *Micromonospora sp.* El efecto del extracto de acetato de etilo en la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa se mostraron significativas en condiciones *in vitro*.

Todos los extractos presentaron diferencias en sus rendimientos, a pesar de que todos fueron sometidos a las mismas condiciones de crecimiento y de extracción; esto es debido a que cada uno de los microorganismos de estudio difiere en sus capacidades metabólicas.

### 3.2. Actividad inhibitoria frente a $\alpha$ -amilasa.

Los efectos inhibidores de  $\alpha$ -amilasa de los extractos fueron evaluados utilizando  $\alpha$ -amilasa de páncreas porcino (Tipo IV-B). Ninguno de los extractos evaluados presentó una inhibición superior al 50% a la dosis de 10 mg/mL (concentración final del ensayo 416,67  $\mu$ g/mL) por lo que no se pudo calcular la  $CI_{50}$ . La acarbosa presentó una  $CI_{50}$  de 10  $\mu$ M.

Los extractos de las cepas MJG-03, MJG-02 y MJG-05 que, de acuerdo a las características macroscópicas, pertenecen al género *Streptomyces*, exhibieron la actividad inhibitoria más alta con valores entre 41% y 46%. Las cepas PBLC-05, PBLC-08, PBLC-09 mostraron porcentajes de inhibición entre 32 a 36 % y las restantes cepas mostraron porcentajes de inhibición inferiores a 28% (**Tabla 2**). Según un estudio realizado por Meng et al., (2013) indica que el género *Streptomyces* es rico en sustancias bioactivas ya que las cepas de su estudio alcanzan porcentajes de inhibición que van desde 44,3 hasta 96,3% probados a la misma dosis que este estudio (10 mg/mL) pero la enzima usada en el ensayo es de páncreas humano. Este estudio difiere del nuestro ya que las cepas PBLC-01 y PBLC-09 también pertenecen al género *Streptomyces* pero mostraron porcentajes bajos de inhibición de 28.4 y 32.6% respectivamente.

**Tabla 2.** Porcentaje de inhibición de los 15 extractos crudos frente al sistema de alfa-amilasa.

Extracto	% IHB
PBLC-01	28,49
PBLC-02	27,25
PBLC-04	14,95
PBLC-05	36,65
PBLC-07	18,15
PBLC-08	33,11
PBLC-09	32,59
PBLC-12	15,35
PBLC-14	23,35
MJA-05	23,14
MJH-08	23,71
MJG-02	41,98

<b>MJG-03</b>	46,86
<b>MJG-05</b>	41,46
<b>MJG-20</b>	25,29

Fuente: Autora.

Según Imada (2005) los inhibidores de la amilasa han recibido atención en los últimos años porque son útiles para el control de enfermedades dependientes de los carbohidratos como la diabetes, la obesidad o la hiperlipidemia. Hasta la fecha, la mayoría de los inhibidores de la amilasa han sido aislados de actinomicetos terrestres. Sin embargo, a partir de la cepa, *Streptomyces corchorusii* subsp. *rhodomarinus* susp. nov., se logró el aislamiento de un inhibidor (de naturaleza proteica) de la  $\alpha$ -amilasa. La producción del inhibidor en la cepa marina se realizó a elevadas concentraciones de agua de mar, mientras que la variedad terrestre *S. corchorusii*, no produce el inhibidor (Imada, 2005). Este es el primer informe de un inhibidor de  $\alpha$ -amilasa que produce un microorganismo del medio ambiente marino.

Actualmente, se ha reportado el aislamiento de varios inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, especialmente de especies del género *Streptomyces*, los mismos que se los ha clasificado en dos grandes grupos: compuestos de naturaleza glucocídica (aminoazúcares y “oligostatins”) e inhibidores de naturaleza proteica (“proteinaceous”) (Sun et al., 2015).

De acuerdo al presente trabajo, algunas de las cepas pertenecientes al género *Micromonospora*, exhibieron un porcentaje de inhibición relativamente bajo que iba desde 15 a 24% a una dosis de 416,67  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; sin embargo, en la investigación de Suthindhiran et al., (2009) algunos de los aislamientos obtenidos que pertenecían al género *Micromonospora*, mostraron una buena actividad inhibitoria frente al sistema de  $\alpha$ -amilasa, con porcentajes de inhibición superior al 70% a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo cual demuestra la diversidad metabólica de éste género.

### 3.3. Actividad inhibitoria frente a $\alpha$ -glucosidasa.

El efecto inhibitorio de los extractos se evaluaron utilizando  $\alpha$ -glucosidasa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Tipo I). Los extractos de las cepas PBLC-02, PBLC-05 y MJG-20 mostraron muy buena actividad inhibitoria con valores de  $\text{CI}_{50}$  de 84,41  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 56,51  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 64,78  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, siendo su actividad cinco veces más alta que el inhibidor comercial acarbosa (377  $\mu\text{M}$ ). Los extractos de las cepas PBLC-04, PBLC-12 y PBLC -14, mostraron actividad inhibitoria débil, con porcentajes de inhibición

inferiores a 29 %. El resto de cepas demostraron tener una actividad inhibitoria moderada con valores de  $CI_{50}$  entre 113,79  $\mu\text{g/mL}$  y 279,54  $\mu\text{g/mL}$  (**Tabla 3**).

**Tabla 3.**  $CI_{50}$  y porcentaje de inhibición de los 15 extractos crudos frente al sistema de alfa-glucosidasa.

Extracto	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	% INH
PBLC-01	132,89	-
PBLC-02	84,41	-
PBLC-04	-	13%
PBLC-05	56,51	-
PBLC-07	262,52	-
PBLC-08	117,88	-
PBLC-09	279,54	-
PBLC-12	-	19%
PBLC-14	-	29%
MJA-05	113,79	-
MJH-08	161,36	-
MJG-02	121,37	-
MJG-03	153,55	-
MJG-05	119,51	-
MJG-20	64,78	-

Fuente: Autora.

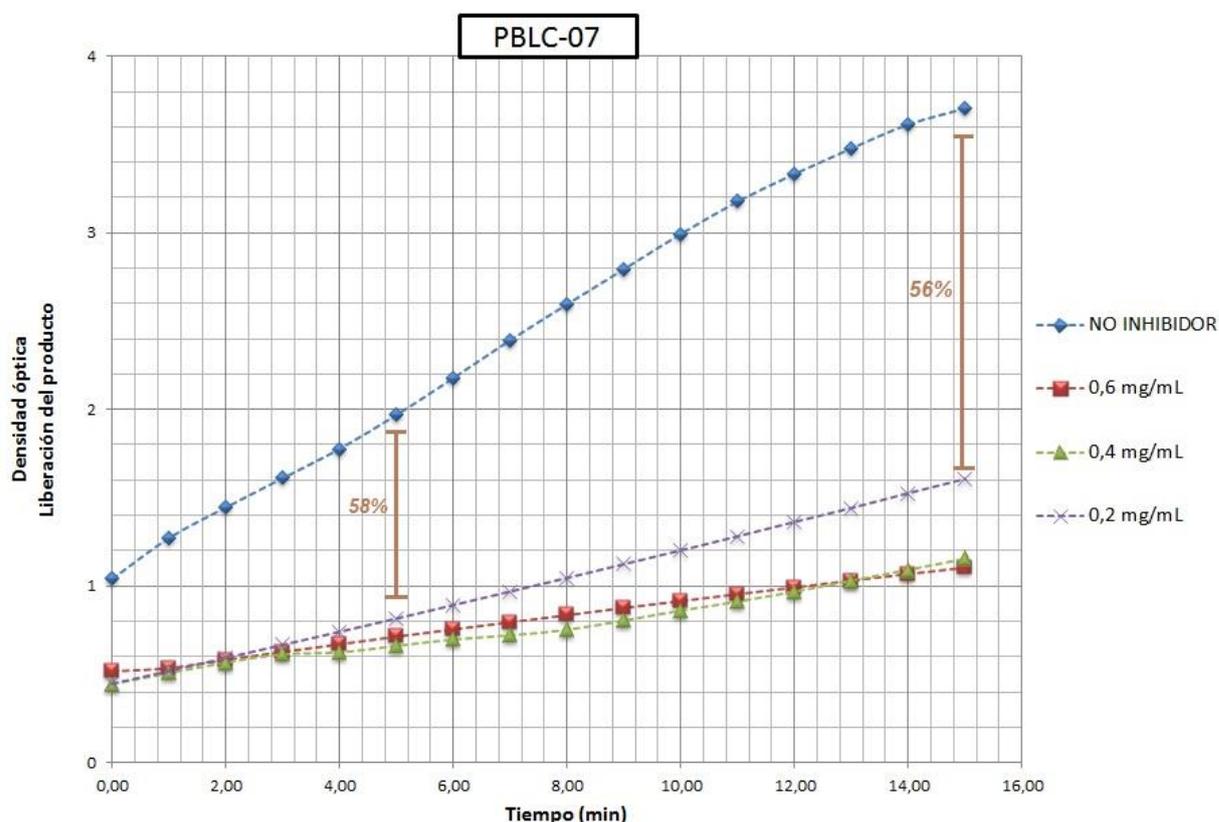
No es inusual que los actinomicetos sean una gran fuente de sustancias bioactivas como el caso de inhibidores enzimáticos, muchas investigaciones lo han demostrado, como la realizada por Chen et al., (2016) en la que se identificaron a partir de *Streptomyces sp.* dos compuestos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa con valores de  $K_i/CI_{50}$  de 16,8/19,7 y 6,0/8.3  $\mu\text{M}$ . Además Lee (2000) encontró que el ftalato de dibutilo, es un inhibidor de glucosidasa reversible de unión lenta, no competitivo, que fue aislado a partir de *Streptomyces melanosporofaciens* con un valor de  $K_i$  de 3,9  $\mu\text{M}$ .

En una investigación realizada por Suthindhiran et al., (2009) una cepa de actinomiceto designado como VITSDK3 se aisló a partir de muestras de sedimentos marinos y posteriormente se identificó como perteneciente al género *Micromonospora*. El extracto de esta cepa mostró una actividad inhibitoria significativa frente a  $\alpha$ -glucosidasa, con un porcentaje de inhibición superior a 70% a una dosis de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.4. Actividad inhibitoria frente a acetilcolinesterasa.

La actividad inhibitoria de los extractos fue evaluada mediante la utilización de acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* (Tipo VI-S). Se midió la actividad inhibitoria a dos tiempos, a los 5 y a los 15 minutos, de manera que se pueda determinar el comportamiento de inhibición del extracto en función del tiempo.

Las cepas PBLC-07 y MJH-08 mostraron actividad inhibitoria significativa a los primeros cinco minutos con valores de  $CI_{50}$  de 45,38  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 81,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Este efecto inhibitorio disminuyó a los 15 minutos, donde se observó valores de  $CI_{50}$  de 165,48  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 281,72  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Este tipo de efecto es característico de la inhibición competitiva, ya que se manifiesta un efecto inhibitorio temporal, dependiente de la concentración del extracto (**Figura 6**).

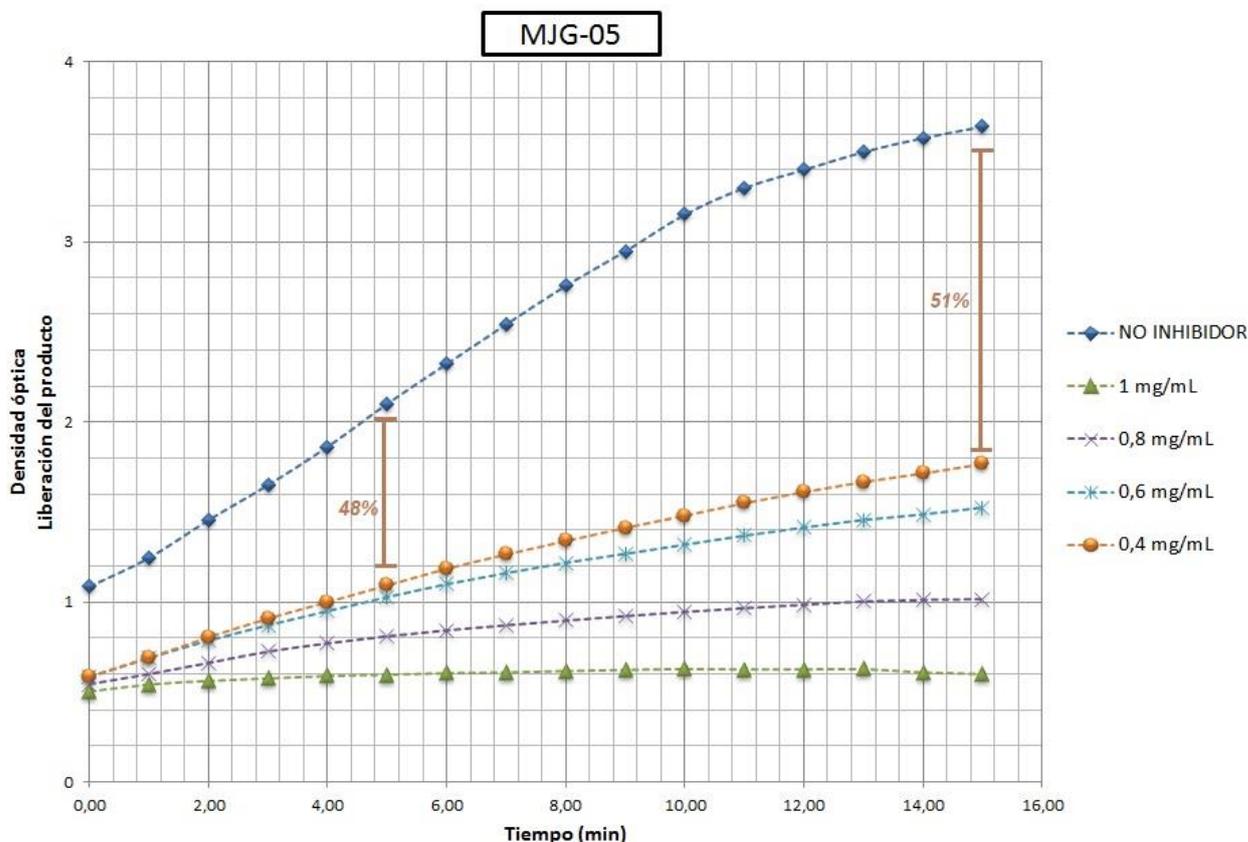


**Figura 6.** Inhibición competitiva del extracto de PBLC-07. Se muestra únicamente los porcentajes de inhibición a los 5 y 15 minutos de la concentración de 0,2 mg/mL para indicar la disminución del efecto inhibitorio.

**Fuente:** Autora.

En el caso de la cepa MJG-05, la inhibición resultó dependiente del tiempo, ya que a los 5 minutos el valor calculado de  $CI_{50}$  fue de 332,18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y a los 15 minutos, la actividad inhibitoria se incrementó, observándose un valor de  $CI_{50}$  de 99,15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los inhibidores

dependientes del tiempo se unen lentamente a la enzima, observándose cambios en el valor de  $CI_{50}$  con respecto al tiempo (**Figura 7**).



**Figura 7.** Inhibición competitiva, dependiente del tiempo, del extracto MJG-05. Se muestra únicamente los porcentajes de inhibición a los 5 y 15 minutos de la concentración de 0,4 mg/mL para indicar el aumento del efecto inhibitorio.

**Fuente:** Autora.

El resto de microorganismos ensayados mostraron valores de  $CI_{50}$  superiores a 200  $\mu\text{g/mL}$ , indicativo de una actividad inhibitoria de moderada a débil (**Tabla 4**). La actividad inhibitoria del Donepezilo (control positivo) estuvo en el orden de 10 nM, actividad similar a la reportada por Sugimoto, Ogura, Arai, Imura, & Yamanishi (2002).

**Tabla 4.**  $CI_{50}$  y porcentaje de inhibición de los 15 extractos crudos frente al sistema de acetilcolinesterasa.

Extracto	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Lectura 5 min	Lectura 15 min
<b>PBLC-01</b>	> 1000	> 1000
<b>PBLC-02</b>	371,89	323,65
<b>PBLC-04</b>	> 1000	> 1000
<b>PBLC-05</b>	265,50	241,38

<b>PBLC-07</b>	45,38	165,48
<b>PBLC-08</b>	403,53	403,53
<b>PBLC-09</b>	400,00	540,56
<b>PBLC-12</b>	551,94	> 1000
<b>PBLC-14</b>	> 1000	920, 12
<b>MJA-05</b>	237,55	317,71
<b>MJH-08</b>	81,01	281,72
<b>MJG-02</b>	411,89	398,02
<b>MJG-03</b>	271,06	310,27
<b>MJG-05</b>	332,18	99,15
<b>MJG-20</b>	119,06	233,06

Fuente: Autora.

En una investigación realiza por Ohlendorf et al., (2012) se encontró un nuevo producto natural denominado Geraniifenazinodiol producido por una cepa de *Streptomyces sp.* denominada LB173 aislada inicialmente de una alga marina (*Saccharina latissima*), en la Bahía de Kiel (Alemania). La estructura se estableció mediante análisis de datos de RMN y MS. El geraniifenazinodiol fue moderadamente activo contra Acetilcolinesterasa humana, con un valor de  $CI_{50}$  de 2,62  $\mu M$ ; mientras que, empleando Huperzina A como control positivo, el valor de  $CI_{50}$  fue de 0,012  $\mu M$ .

Según Lin Li et al., (2015) su investigación con el actinomiceto marino *Rubrobacter radiotolerans* condujo al aislamiento y caracterización de dos compuestos diméricos naturalmente raros. El compuesto 1 se identificó como un nuevo alcaloide indólico dimérico denominado 2-(2-(3-hidroxi-1-(1*H*-indol-3-il)-2-metoxipropil)-1*H*-indol-3-il) ácido acético y el compuesto 2 identificado como 3-(3-(2-hydroxietill)-1*H*-indol-2-il)-3-(1*H*-indol-3-yil) propano-1,2-diol. Las estructuras de estos nuevos compuestos se dilucidaron mediante la interpretación de datos espectroscópicos. El ensayo para la actividad anticolinesterásica indica que ambos compuestos inhibieron la actividad de la enzima con valores de  $CI_{50}$  de 11,8 y 13,5  $\mu M$ , respectivamente, considerada como una actividad moderada.

## CONCLUSIONES

A partir de las quince cepas se logró recoger extractos crudos con Acetato de etilo como disolvente de extracción, obteniendo rendimientos satisfactorios que fluctuaron entre 0,031 % y 0,012 %, rendimiento que se encuentra dentro de los valores normales obtenidos para este tipo de microorganismos y procesos de extracción.

En el ensayo frente al sistema enzimático de  $\alpha$ -amilasa de los quince extractos en estudio, sólo las cepas MJG-03, MJG-02 y MJG-05, correspondientes al género *Streptomyces*, exhibieron la actividad inhibitoria más alta con valores entre 41 % y 46 %. Las cepas PBLC-05 y PBLC-09, correspondientes al género *Streptomyces*, y la cepa PBLC-08 del género *Micromonospora*, mostraron porcentajes de inhibición menores, entre 32 a 36 %; mientras que, las cepas restantes mostraron porcentajes de inhibición inferiores a 28%.

La capacidad inhibitoria de los extractos de las cepas PBLC-02 y PBLC-05 que pertenecen al género *Streptomyces*, y la cepa MJG-20 del género *Micromonospora* mostraron una actividad inhibitoria fuerte ante  $\alpha$ -glucosidasa con valores de  $CI_{50}$  de 84,41  $\mu\text{g/mL}$ , 56,51  $\mu\text{g/mL}$  y 64,78  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

En el ensayo frente al sistema enzimático de acetilcolinesterasa las cepas PBLC-07 (*Micromonospora*) y MJH-08 (sin determinar) mostraron una fuerte actividad inhibitoria con valores de  $CI_{50}$  de 45,38  $\mu\text{g/mL}$  y 81,01  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Este efecto inhibitorio se redujo significativamente cuando se calculó el valor de  $CI_{50}$  a los 15 minutos, siendo estos valores de 165,48  $\mu\text{g/mL}$  y 281,72  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Para la cepa MJG-05 (*Streptomyces*), inicialmente se evidenció un efecto inhibitorio débil, ya que a los 5 minutos el valor de  $CI_{50}$  fue de 332,18  $\mu\text{g/mL}$  y a los 15 minutos, la actividad inhibitoria se incrementó, observándose un valor de  $CI_{50}$  de 99,15  $\mu\text{g/mL}$ . Estos resultados indican que los compuestos presentes en el extracto presentan un efecto inhibitorio competitivo del tipo dependiente del tiempo.

## RECOMENDACIONES

Optimizar el proceso de fermentación de los cultivos utilizando condiciones de cultivo adecuadas que favorezcan el crecimiento y desarrollo de los microorganismos con el fin de incrementar el contenido de biomasa y un aumento en el rendimiento.

Probar nuevas concentraciones de la enzima  $\alpha$ -amilasa, así como la posibilidad de utilizar otro tipo de enzima proveniente de otro organismo que no sea la utilizada en este trabajo.

Profundizar en la investigación de los extractos de las cepas PBLC-02, PBLC-05 y MJG-20 que resultaron activas frente a los sistemas enzimáticos de  $\alpha$ -glucosidasa. La línea de investigación se la puede seguir a nivel fotoquímico para conseguir aislar los compuestos que poseen la característica inhibitoria.

Realizar estudios complementarios con las cepas PBLC-07, MJH-08 y MJG-05 que permitan identificar los compuestos activos presentes en los extractos crudos, además de promover el estudio hacia nuevos parámetros como el tipo de inhibición realizada por los extractos con el uso y aplicación de otros parámetros cinéticos que se deriven como la constante de inhibición ( $K_i$ ).

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aponte, J., León, J., Rojas, R., Montero, S., & Loayza, L. (2015). Actividad antimicrobiana y sinérgica de metabolitos producidos por *Streptomyces erythrogriseus* M10-77 de origen marino. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35, núm, 1, 13–19.
- Arasu, M., Rejiniemon, T., Al-dhabi, N., Duraipandiyan, V., Ignacimuthu, S., Agastian, P., ... Choi, K. C. (2006). Nutritional requirements for the production of antimicrobial metabolites from *Streptomyces*, 8(8), 750–758. <http://doi.org/10.5897/AJMR2013.6351>
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (5th editio). New York: W H Freeman. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22530/>
- Bosch, E. (1998). USE OF CHOLINESTERASE INHIBITORS INCREASES INITIATION OF URINARY ANTICHOLINERGICS IN PERSONS WITH ALZHEIMER'S DISEASE, 064, 195–196.
- Carro, L., Riesco, R., Spröer, C., & Trujillo, M. (2016). *Micromonospora luteifusca* sp. nov. isolated from cultivated *Pisum sativum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(4), 237–242. <http://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.04.003>
- Chen, Z., Hao, J., Wang, L., Wang, Y., Kong, F., & Zhu, W. (2016). New  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from marine algae-derived *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434. *Scientific Reports*, 6, 20004. <http://doi.org/10.1038/srep20004>
- Choi, C. I., Lee, S. R., & Kim, K. H. (2015). Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of constituents from *Euonymus alatus* twigs. *Industrial Crops and Products*, 76, 1055–1060. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.031>
- Collins, R. A., Ng, T. B., Fong, W. P., Wan, C. C., & Yeung, H. W. (1997). Inhibition of Glycohydrolase Enzymes By Aqueous Extracts of Chinese Medicinal Herbs in a Microplate Format. *BIOCHEMISTRY End MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL*, 42(6), 1163–1169.
- Dávila, M., Gallegos, G., Francisco, H., Ochoa, Y., & Flores, A. (2013). Actinomicetos

antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola, 4, 1187–1196.

Deuschländer, M. S., van de Venter, M., Roux, S., Louw, J., & Lall, N. (2009). Hypoglycaemic activity of four plant extracts traditionally used in South Africa for diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(3), 619–624. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.052>

Dhital, S., Lin, A., Hamaker, B., Gidley, M., & Muniandy, A. (2013). Mammalian Mucosal  $\alpha$ -Glucosidases Coordinate with  $\alpha$ -Amylase in the Initial Starch Hydrolysis Stage to Have a Role in Starch Digestion beyond Glucogenesis. *PLoS ONE*, 8(4), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0062546>

Downes, G., & Granato, M. (2004). Acetylcholinesterase function is dispensable for sensory neurite growth but is critical for neuromuscular synapse stability. *Developmental Biology*, 270(1), 232–245. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.02.027>

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [http://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](http://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

Franco, M., Quintana, A., Duque, C., Suarez, C., Rodriguez, M., & Barea, M. (2010). Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology*, 45(3), 209–217. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.04.007>

Fuwa, H. (1954). A New Method for Microdetermination of Amylase Activity By the Use of Amylose As the Substrate. *J. Biochem.*, 41(5), 583–603.

Gärtner, A., Ohlendorf, B., Schulz, D., Zinecker, H., Wiese, J., & Imhoff, J. (2011). Levantilides A and B, 20-membered macrolides from a *Micromonospora* strain isolated from the mediterranean deep sea sediment. *Marine Drugs*, 9(1), 98–108. <http://doi.org/10.3390/md9010098>

Gawel, K., Labuz, K., Gibula, E., Jenda, M., Marszalek, M., Filarowska, J., ... Kotlinska, J. (2016). Cholinesterase inhibitors, donepezil and rivastigmine, attenuate spatial memory and cognitive flexibility impairment induced by acute ethanol in the

Barnes maze task in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*.  
<http://doi.org/10.1007/s00210-016-1269-8>

Ghosh, S., More, P., Derle, A., Patil, A., Markad, P., Asok, A., ... Chopade, B. a. (2014). Diosgenin from *Dioscorea bulbifera*: novel hit for treatment of type II diabetes mellitus with inhibitory activity against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *PloS One*, 9(9), e106039. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0106039>

Giacobini, E. (2004). Cholinesterase inhibitors: New roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research*, 50(4), 433–440.  
<http://doi.org/10.1016/j.phrs.2003.11.017>

Imada, C. (2005). Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(1), 59–63.  
<http://doi.org/10.1007/s10482-004-6544-x>

International Diabetes Federation. (2015). ¿QUÉ ES LA DIABETES? Retrieved September 15, 2016, from <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/es/que-es-la-diabetes>

Kusano, R., Ogawa, S., Matsuo, Y., Tanaka, T., Yazaki, Y., & Kouno, I. (2011).  $\alpha$ -Amylase and Lipase Inhibitory Activity and Structural Characterization of Acacia Bark Proanthocyanidins. *Journal of Natural Products*, 74(2), 119–128.  
<http://doi.org/10.1021/np100372t>

Lee, D. S. (2000). Dibutyl phthalate, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from *Streptomyces melanosporofaciens*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(3), 271–273.  
[http://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)88832-5](http://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)88832-5)

León, J., Liza, L., & Soto, I. (2007). Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 14(2), 259–270.

Lin Li, J., Huang, L., Liu, J., Song, Y., Gao, J., Jung, J. H., ... Chen, G. (2015). Acetylcholinesterase inhibitory dimeric indole derivatives from the marine actinomycetes *Rubrobacter radiotolerans*. *Fitoterapia*, 102, 203–207.  
<http://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.01.014>

- Liu, W., Lang, M., Youdim, M., Amit, T., Sun, Y., Zhang, Z., ... Weinreb, O. (2016). Design, synthesis and evaluation of novel dual monoamine-cholinesterase inhibitors as potential treatment for Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.06.013>
- López, L., Aguilar, L., & Dublán, O. (2014). Actividad antioxidante e inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa de tres variedades de cebolla ( *Allium cepa* L . ). *Revista Electrónica Nova Scientia*, 14. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4749012>
- Malunga, L., Eck, P., & Beta, T. (2016). Inhibition of Intestinal  $\alpha$ -Glucosidase and Glucose Absorption by Feruloylated Arabinoxylan Mono- and Oligosaccharides from Corn Bran and Wheat Aleurone. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2016, 1–9. <http://doi.org/10.1155/2016/1932532>
- Meng, P., Xie, C., Geng, P., Qi, X., Zheng, F., & Bai, F. (2013). Inhibitory effect of components from *Streptomyces* species on alpha-glucosidase and alpha-amilase of different origin. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 49(2), 181–189. <http://doi.org/10.7868/S0555109913020104>
- NeuronUp. (2015). Enfermedades neurodegenerativas. Retrieved September 14, 2016, from <https://www.neuronup.com/es/neurorehabilitation/disease>
- Niño, J., Hernández, J. A., Correa, Y. M., & Mosquera, O. M. (2006). In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(7), 783–785. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762006000700013>
- Ohlendorf, B., Schulz, D., Erhard, A., Nagel, K., & Imhoff, J. F. (2012). Geranylphenazinediol, an acetylcholinesterase inhibitor produced by a *Streptomyces* Species. *Journal of Natural Products*, 75(7), 1400–1404. <http://doi.org/10.1021/np2009626>
- Onor, M., Trevisiol, M., & Aguglia, E. (2007). Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clinical Interventions in Aging*, 2(1), 17–32. <http://doi.org/10.2147/ciia.2007.2.1.17>

- Pimienta, E., & Vallín, C. (2005). Utilización de *Streptomyces* como hospedero para la producción de proteínas heterólogas. *CENIC Ciencias Biológicas*, 36(2), 97–104.
- Rhee, I. K., Van De Meent, M., Ingkaninan, K., & Verpoorte, R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, 915(1-2), 217–223. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00624-0](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00624-0)
- Russo, P., Kisialiou, A., Lamonaca, P., Moroni, R., Prinzi, G., & Fini, M. (2015). New Drugs from Marine Organisms in Alzheimer's Disease. *Marine Drugs*, 14(1), 5. <http://doi.org/10.3390/md14010005>
- Salles, M., Viana, F., Van De Meent, M., Rhee, I. K., & Verpoorte, R. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from plants to treat Alzheimer disease. *Quimica Nova*, 26(3), 301–304. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300002>
- Santorelli, M., Maurelli, L., Pocsfalvi, G., Fiume, I., Squillaci, G., La Cara, F., ... Morana, A. (2016). Isolation and characterisation of a novel alpha-amylase from the extreme haloarchaeon *Haloterrigena turkmenica*. *International Journal of Biological Macromolecules*. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.001>
- Srinivasan, M., Laxman, R., & Deshpande, M. (1991). Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 7(2), 171–184. <http://doi.org/10.1007/BF00328987>
- Strelow, J., Dewe, W., Iversen, P. W., Brooks, H. B., Radding, J. A., McGee, J., & Weidner, J. (2012b). *Mechanism of Action Assays for Enzymes*. (G. Sittampalam, N. Coussens, & H. Nelson, Eds.). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92001/>
- Sugimoto, H., Ogura, H., Arai, Y., Imura, Y., & Yamanishi, Y. (2002). New Drug and Recent Technique Research and Development of Donepezil Hydrochloride, a New Type of Acetylcholinesterase Inhibitor. *Jpn. J. Pharmacol*, 89, 7–20. <http://doi.org/10.1254/jjp.89.7>

- Sun, Z., Lu, W., Liu, P., Wang, H., Huang, Y., Zhao, Y., ... Cui, Z. (2015). Isolation and characterization of a proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitor AAI-CC5 from *Streptomyces* sp. CC5, and its gene cloning and expression. *Antonie van Leeuwenhoek*, *107*(2), 345–356. <http://doi.org/10.1007/s10482-014-0333-y>
- Suthindhiran, K. R., Jayasri, M. A., & Kannabiran, K. (2009).  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of *Micromonospora* sp. VITSDK3 (EU551238). *International Journal of Integrative Biology*, *6*(3), 115–120.
- Taddei, A., Rodríguez, M., Márquez, E., & Castelli, C. (2006). Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. *Microbiological Research*, *161*(3), 222–231. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2005.08.004>
- Tao, Y., Zhang, Y., Cheng, Y., & Wang, Y. (2013). Rapid screening and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR. *Biomedical Chromatography*, *27*(2), 148–155. <http://doi.org/10.1002/bmc.2761>
- Uzcátegui Negrón, M. del C., Serrano, J. A., & Panizo, M. M. (2014). Condiciones de cultivo que fomentan la producción de sustancias antimicrobianas en actinomicetos patógenos y del suelo. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, *33*(2), 134–139. Retrieved from [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562013000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562013000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Van de Laar, A. (2008). Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, *4*(6), 1189–1195.
- Varadaraju, K. R., Kumar, J. R., Mallesha, L., Muruli, A., Mohana, K. N. S., Mukunda, C. K., & Sharanaiah, U. (2013). Virtual screening and biological evaluation of piperazine derivatives as human acetylcholinesterase inhibitors. *International Journal of Alzheimer's Disease*, *2013*. <http://doi.org/10.1155/2013/653962>
- Veyisoglu, A., Carro, L., Guven, K., Cetin, D., Spröer, C., Schumann, P., ... Sahin, N. (2016). *Micromonospora yasonensis* sp. nov., isolated from a Black Sea sediment. *Antonie van Leeuwenhoek*, *109*(7), 1019–1028. <http://doi.org/10.1007/s10482->

World Health Organization. (2016). World Health Organization. Retrieved September 14, 2016, from <http://www.who.int/es/>

Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2006). A quantitative starch – iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*, 362(MAY 2006), 146–148. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.036>

Yashchuk, O., & Miyazaki, S. (2007). Propiedades morfológicas de los esporóforos y esporas de *Streptomyces* sp.

Yilmazer, M., Griffith, A., Michels, A., Schneider, E., & Frei, B. (2015). Inhibition of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Activity by Tea and Grape Seed Extracts and their Constituent Catechins, 60(36), 8924–8929. <http://doi.org/10.1021/jf301147n>.Inhibition

## **ANEXOS**

**ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO PARA ACTINOMICETOS SUPLEMENTADOS CON AGUA DE MAR ARTIFICIAL.**

<b>A. FÓRMULACIÓN PARA AGUA DE MAR ARTIFICIAL VOL: 10 L</b>	
<b>Solución 1 (disolver en 8 L)</b>	
NaCl	211.90 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	35.5 g
KCl	5.99 g
NaHCO <sub>3</sub>	1.74 g
KBr	0.863 g
Ácido Bórico	0.230 g
NaF	0.028 g
<b>Solución 2 (disolver en 1.93L)</b>	
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	95.92 g
CaCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	13.44 g
SrCl <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O	0.218 g
<b>Nutriente 1 (añadir 10mL de la solución stock)</b>	
NaNO <sub>3</sub>	46.70 g en 1L de H <sub>2</sub> O
<b>Nutriente 2 (añadir 10mL de la solución stock)</b>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	3.09 g en 1L de H <sub>2</sub> O
<b>Solución Metales Stock 1- Hierro (añadir 10mL de la solución stock)</b>	
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.77 g en 1L de H <sub>2</sub> O
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	3.09 g
<b>Solución Metales Stock 2-Metales Trazas (añadir 10mL de la solución stock)</b>	
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.073 g en 1L de H <sub>2</sub> O
CoSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.016 g
MnSO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.054 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	1.48 mg
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.0173 mg
NiCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	1.49 mg
Na <sub>2</sub> EDTA.2 H <sub>2</sub> O	2.44 g
<b>Stock de Vitaminas (añadir 10mL de la solución stock)</b>	
Tiamina clorhidrato	0.1 g en 1L de H <sub>2</sub> O
Biotina	2 mg
Vitamina B12	1 mg

<b>B. MEDIO MÍNIMO A1 (1L de disolución)</b>	
<b>Almidón</b>	10 g
<b>Extracto de levadura</b>	4 g
<b>Peptona</b>	2 g
<b>Carbonato de calcio</b>	1 g
<b>Agua de mar artificial</b>	75%
<b>Agua destilada</b>	25%
<b>Suplementos:</b>	
<b>Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub></b>	5mL/L u 8 g/L
<b>KBr</b>	5mL/L u 8 g/L

**Fuente:** Departamento de Química – Sección de Bioensayos.

## ANEXO 2. DESARROLLO DEL MÉTODO FRENTE A $\alpha$ -AMILASA.

REACTIVOS	BLANCO ( $\mu$ L)	PRUEBA (ABS1)	BLC PRUEBA (ABS2)	ACT_ENZ (ABS3)	CNTRL_ALM (ABS4)	CNTRL_ POSITIVO
<b>PBS</b>	55	35	55	35	55	20
<b>Inhibidor*</b>	-	-	-	-	-	<b>20*</b>
<b>MeOH:H<sub>2</sub>O<sup>†</sup>/Extracto<sup>‡</sup></b>	5 <sup>†</sup>	5 <sup>‡</sup>	5	5 <sup>†</sup>	5 <sup>†</sup>	-
<b>Enzima (50 <math>\mu</math>g/mL)</b>	20	20	-	20	-	20
<b>Sustrato (Almidón 1%)</b>	-	20	20	20	20	20
<b>Incubación (mins)</b>	-	15	15	15	15	15
<b>Stop Reacción (HCL) (0,1 M)</b>	50	50	50	50	50	50
<b>Solución de Yodo (0,5 mM)</b>	150	150	150	150	150	150
<b>Lectura 580 nm</b>						

<sup>‡</sup> Concentración del extracto: 10mg/mL (MeOH:H<sub>2</sub>O, 1:1).

\* Como control positivo (Inhibidor) se emplea Acarbose a una concentración de 5 mg/mL. Las cantidades de los reactivos y soluciones están expresados en microlitros ( $\mu$ L).

**Fuente:** Departamento de Química – Sección de Bioensayos.

### ANEXO 3. DESARROLLO DEL MÉTODO FRENTE A $\alpha$ -GLUCOSIDASA.

REACTIVOS	BLANCO	PRUEBA (As)	ACT_ENZ (Ao)	CNTRL_POSITIVO*
Inhibidor*	-	-	-	20*
MeOH:H <sub>2</sub> O <sup>†</sup> /Extracto <sup>‡</sup>	5 <sup>†</sup>	5 <sup>‡</sup>	5 <sup>†</sup>	-
PBS 7.4 pH	95	75	75	60
Enzima 15 $\mu$ g/mL (150 mU/mL)	20	20	20	20
Preincubación (5 min - 37°C)				
p-NPG (5 mM)	-	20	20	20
Incubación 60 min a 37°C				
Lectura 405 nm x 60min con intervalos de lectura de 5min				

<sup>‡</sup> Concentración del extracto: 10mg/mL (MeOH:H<sub>2</sub>O, 1:1).

\* Como control positivo (Inhibidor) se emplea Acarbosa a una concentración de 5 mg/mL. Las cantidades de los reactivos y soluciones están expresados en microlitros ( $\mu$ L).

**Fuente:** Departamento de Química – Sección de Bioensayos.

#### ANEXO 4. DESARROLLO DEL MÉTODO FRENTE A ACETILCOLINESTERASA.

REACTIVOS	BLANCO	ACT_ENZ (Ao)	PRUEBA (As)	CNTRL_POSITIVO*
BUFFER A-TRIS pH 8	80	40	40	58
AcSCh (15 mM, sustrato)	-	20	20	20
DTNB (3 mM) TRIS 50 mM pH 8	100	100	100	100
MeOH:H <sub>2</sub> O <sup>†</sup> /Extracto <sup>‡</sup>	20	20	20	-
Inhibidor*	-	-	-	2*
Preincubación 25°C, min Lectura 412 nm	3	3	3	3
AChE (0,5 U/mL) (BUFFER A-TRIS-50 mM pH8)	-	20	20	20
<b>Lectura 412 nm x 15 min con intervalos de lectura de 60 segundos</b>				

<sup>‡</sup> Concentración del extracto: 10mg/mL (MeOH:H<sub>2</sub>O, 1:1).

\* Como control positivo (Inhibidor) se emplea Donepezilo a una concentración de 10 µM. Las cantidades de los reactivos y soluciones están expresados en microlitros (µL).

**Fuente:** Departamento de Química – Sección de Bioensayos.