



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

Plantas de la región como fuente potencial de metabolitos  
secundarios inhibidores de colinesterasa

Valeria Cavallaro

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2015



## **PREFACIO**

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional de Sur y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 21 de Junio de 2011 y el 10 de Agosto de 2015, bajo la dirección de la Dra. Ana Paula Murray, Profesora Asociada de Química Orgánica.

Valeria Cavallaro



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ..../..../..... , mereciendo la calificación de..... (.....)

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Ana Paula Murray, directora de esta tesis, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la posibilidad de realizar este trabajo, acercándome a los productos naturales. Gracias por confiar en mí, por lo enseñado y compartido estos años.

Al resto del grupo de investigación, las que están, las que estuvieron, o las que sólo pasaron por un tiempo, Belén, Cris, Silvana, Janeth, Nati, Flor y Brunella. Muchas gracias por la ayuda, buena predisposición, por los mates y charlas compartidas. Especialmente a Nati y Juli, por el apoyo y aliento, no sólo en la química, sino en la vida; gracias por convertirse en mis amigas durante este camino. Mis días en el laboratorio y esta tesis no hubieran sido lo mismo sin ustedes.

A mi mamá, por enseñarme que con trabajo y dedicación se pueden cumplir los objetivos, por ser mi ejemplo de perseverancia y de esfuerzo, por alentarme siempre a intentar ser mejor, por tu paciencia en los días difíciles. Este logro también es tuyo... gracias por todo.

A Pato, por acompañarme y darme fuerzas en todo momento, por tu paciencia, tu entusiasmo y tu interés en mi trabajo. Gracias amor, por tratar de buscar soluciones conmigo y por transmitirme la tranquilidad que a veces me falta.

A mi familia entera, la de sangre y la del corazón, por su interés y apoyo incondicional durante este tiempo, pero más que nada por ser mi cable a tierra, por darme fuerzas y brindarme su cariño. Los quiero.

A mis amigas, especialmente a “las de la uni”, por el apoyo, la compañía y los almuerzos. Gracias por su amistad que continúa en esta etapa postcarrera.

Al Prof. Ángel Gutiérrez Ravelo y Prof. Ana Estévez Braun, quienes amablemente me recibieron en su grupo de investigación. Gracias por su calidez, por permitirme aprender de ustedes y su trabajo. Quiero agradecer además a todo el grupo QUIBIONAT de la Universidad de La Laguna por hacerme sentir como en casa durante mi estancia.

Al Prof. Vladimir Krystof y su grupo de investigación en el Laboratorio de Reguladores del Crecimiento, por recibirme, y transmitirme sus conocimientos. A la Universidad Palacky de Olomouc por facilitar y brindarme su apoyo en cada paso de la estadía.

A los biólogos del Laboratorio de Plantas Vasculares de la UNS, especialmente a la Dra. María Gabriela Murray, por la identificación del material vegetal.

A todo el personal de Química Orgánica de la UNS, por el buen compañerismo, los cumpleaños, seminarios y congresos compartidos.

Por último, quiero agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por mi beca doctoral, y a la Universidad de La Laguna y Erasmus Mundus por la financiación de las estancias doctorales fuera del país. Al INQUISUR y al Departamento de Química, en cuyas instalaciones se realizó este trabajo de tesis.

## INDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ii</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>iii</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>I.1 Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>2</b>
<b>I.1.1 Colinesterasas y su relación con la Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>6</b>
<b>I.1.2 Medicamentos actuales para la Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>8</b>
<b>I.1.3 Importancia del desarrollo de nuevos iACEs en la actualidad</b>	<b>11</b>
<b>I.1.4 Detección de la actividad inhibitoria de colinesterasas</b>	<b>12</b>
<b>I.2 Productos naturales bioactivos</b>	<b>14</b>
<b>I.2.1 Productos naturales para la Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>23</b>
<b>I.3 Plantas halófitas</b>	<b>26</b>
<b>I.3.1 Salitral de la Vidriera</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
<b>III.1 Recolección y selección de especies vegetales</b>	<b>36</b>
<b>III.2 Familia Amaryllidaceae</b>	<b>54</b>
<b>III.2.1 Alcaloides presentes en <i>H. jamesonii</i> y su actividad inhibitoria de colinesterasa</b>	<b>59</b>
<b>III.2.1.1 Aislamiento bioguiado</b>	<b>59</b>
<b>III.2.1.2 Actividad inhibitoria de alcaloides identificados en <i>H. jamesonii</i></b>	<b>64</b>
<b>III.2.2 Identificación de compuestos activos en <i>H. tubispathus</i></b>	<b>65</b>
<b>III.2.2.1 Determinación estructural e identificación de los compuestos 6 y 16</b>	<b>68</b>

<b>III.2.2.2</b> Actividad inhibitoria de colinesterasa de compuestos identificados y aislados de <i>H. tubispathus</i>	<b>73</b>
<b>III.3</b> Familia Chenopodiaceae	<b>76</b>
<b>III.3.1</b> Extracción de metabolitos secundarios y actividad inhibitoria de ACE	<b>78</b>
<b>III.3.1.1</b> Aislamiento de metabolitos de <i>H. olivascens</i>	<b>79</b>
<b>III.3.1.2</b> Aislamiento de metabolitos de <i>A. patagonica</i>	<b>82</b>
<b>III.4</b> Familia Asteraceae	<b>85</b>
<b>III.4.1</b> Aislamiento bioguiado de <i>F. bidentis</i>	<b>87</b>
<b>III.4.2</b> Determinación estructural e identificación del compuesto <b>22</b>	<b>87</b>
<b>III.4.3</b> Actividad inhibitoria de colinesterasas de compuestos <b>22-25</b>	<b>94</b>
<b>III.5</b> Familia Verbenaceae	<b>99</b>
<b>III.5.1</b> Aislamiento bioguiado por la actividad inhibitoria enzimática de <i>L. salsa</i>	<b>101</b>
<b>III.5.2</b> Actividad inhibitoria de ACE y BuCE de compuestos <b>26 y 27</b>	<b>103</b>
<b>III.6</b> Conclusiones	<b>105</b>
<b>CAPÍTULO IV. EXPERIMENTAL</b>	
<b>IV.1</b> General	<b>108</b>
<b>IV.1.1</b> Materiales	<b>108</b>
<b>IV.1.2</b> Equipos	<b>109</b>
<b>IV.1.3</b> Material vegetal	<b>109</b>
<b>IV.1.4</b> Ensayo cualitativo de inhibición de ACE en cromatofolios	<b>111</b>
<b>IV.1.5</b> Ensayo cuantitativo de inhibición de colinesterasas	<b>112</b>
<b>IV.2</b> Extracción, aislamiento e identificación de metabolitos secundarios	<b>112</b>
<b>IV.2.1</b> <i>Habranthus jamesonii</i>	<b>112</b>
<b>IV.2.2</b> <i>Habranthus tubispathus</i>	<b>113</b>
<b>IV.2.3</b> <i>Heterostachys olivascens</i>	<b>116</b>

<b>IV.2.4</b> <i>Allenrolfea patagonica</i>	<b>118</b>
<b>IV.2.5</b> <i>Flaveria bidentis</i>	<b>119</b>
<b>IV.2.6</b> <i>Lippia salsa</i>	<b>122</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>124</b>
<b>ANEXO DE ESPECTROS</b>	<b>139</b>
<b>ANEXO DE PUBLICACIONES</b>	<b>152</b>



## **Resumen**

Durante esta tesis se trabajó con seis especies vegetales entre quince recolectadas en la zona del Salitral de la Vidriera, con pocos o ningún antecedente de estudios fitoquímicos o de actividad biológica. Los extractos etanólicos de estas especies presentaron actividad inhibitoria de las enzimas acetilcolinesterasa (ACE) y/o butirilcolinesterasa (BuCE) de muy buena a moderada. Llevando a cabo un fraccionamiento bioguiado fue posible el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios responsables de la actividad.

A partir de los extractos de *H. jamesonii* y *H. tubispathus* (Amaryllidaceae), fue posible la identificación de quince alcaloides mediante CG-EM. De *H. tubispathus* se logró además, el aislamiento de tres alcaloides mayoritarios: hippeastidina (**6**), licorina (**8**), y 3-O-demetilhippeastidina (**16**), constituyendo el primer reporte de datos espectroscópicos completo de los compuestos **6** y **16**. El alcaloide aislado, hippeastidina, resultó ser el componente más activo de *H. tubispathus*.

De las quenopodiáceas estudiadas, *H. olivascens* y *A. patagonica*, se aislaron ácidos grasos en grandes cantidades de los subextractos menos polares, siendo el ácido palmítico (**17**) el mayoritario. De *H. olivascens* también fue posible el aislamiento del alcaloide salsolina (**20**), de la fracción diclorometánica, y del osmolito glicinbetaína (**21**) de la fracción más polar. Por otra parte, la fracción más activa de *A. patagónica* resultó contener fosfatidilcolinas, compuestos con antecedentes de actividades relacionadas con la patología de la EA.

De la especie endémica *F. bidentis* (Asteraceae) se obtuvo 3-sulfato de 6-metoxikaempferol (**22**) a partir del subextracto acuoso que había mostrado la mejor inhibición de ACE. Este flavonoide sulfatado, cuya caracterización espectroscópica se presenta en este trabajo por primera vez, fue sometido a modificaciones químicas sencillas obteniendo los derivados **23-25**. Si bien no se obtuvo una mejora en la actividad de **22**, se determinó la importancia del grupo sulfato en la inhibición de la enzima.

Por último, los flavonoides activos luteolina (**26**) y apigenina (**27**) fueron aislados de la especie *L. salsa* (Verbenaceae) mediante fraccionamiento bioguiado de su extracto etanólico. Su presencia en esta especie es reportada en este trabajo por primera vez.

## **Abstract**

Six species, from fifteen collected in Salitral de la Vidriera area, were selected and studied in this thesis. All of them, with few or none previous phytochemical or biological activity records in the literature. Ethanolic extracts from this species showed high to moderate acetyl- (AChE) and/or butyryl-cholinesterase (BuChE) inhibitory activity. The isolation and identification of the active metabolites were achieved by bioassay-guided fractionation.

From ethanolic extracts of *H. jamesonii* and *H. tubispathus* (Amaryllidaceae) fifteen alkaloids were identified using GC-MS. In addition, major alkaloids from *H. tubispathus* were isolated: hippeastidine (**6**), lycorine (**8**) and 3-O-demethylhippeastidine (**16**). Alkaloids **6** and **16** were completely characterized by spectroscopic methods for the first time. Hippeastidine (**6**), was found to be the most active constituent in *H. tubispathus*.

From the studied chenopodiaceae, *H. olivascens* and *A. patagonica*, fatty acids were isolated in large quantities, with palmitic acid (**17**) as the major one. In addition, from *H. olivascens*, salsoline (**20**), an alkaloid, was obtained from its dichloromethane subextract and glycinbetaine (**21**), an osmolyte, from its more polar fraction. Moreover, the most active fraction from *A. patagonica* contained phosphatidylcholines, compounds with history in AD pathology related activities.

From the endemic species *F. bidentis* (Asteraceae), the flavonoid 6-methoxykaempferol-3-sulfate (**22**) was obtained from aqueous sub-extract. This sulfated flavonoid, whose spectroscopic data is presented here for the first time, was subjected to simple chemical modifications leading to derivatives **23-25**. Even though this modification did not improve the activity elicited by **22**, the importance of sulfate group in the enzyme inhibition was determined.

Finally, active flavonoids luteolin (**26**) and apigenin (**27**) were isolated from *Lippia salsa* (Verbenaceae) by bioassay-guided fractionation of its ethanolic extract. Its presence in this species is reported in this work for the first time.

## ABREVIATURAS

<b>AAm</b>	alcaloides de Amaryllidaceae
<b>A<math>\beta</math></b>	péptido beta-amiloide
<b>AC</b>	acetilcolina
<b>ACE</b>	acetilcolinesterasa
<b>AcOEt</b>	acetato de etilo
<b>AcOH</b>	ácido acético
<b>AG</b>	ácido graso
<b>ATCI</b>	ioduro de acetiltiocolina
<b>APP</b>	proteína precursora de amiloide
<b>BACE-1</b>	$\beta$ -secretasa
<b>BSTFA</b>	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
<b>BTCI</b>	ioduro de butiriltiocolina
<b>BuCE</b>	butirilcolinesterasa
<b>CAS</b>	sitio activo catalítico
$\delta_c$	desplazamiento químico de $^{13}\text{C}$
$\delta_H$	desplazamiento químico de $^1\text{H}$
<b>DMSO-<math>d_6</math></b>	dimetilsulfóxido deuterado
<b>DTNB</b>	ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EM</b>	Espectrometría de masas
<b>Et<math>_2</math>O</b>	éter etílico
<b>EtOH</b>	etanol
<b>FC</b>	fosfatidilcolina
<b>FS</b>	flavonoides sulfatados
<b>GBM</b>	glioblastoma multiforme humano
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<b>iACE</b>	inhibidores de acetilcolinesterasa
<b>iCEs</b>	Inhibidores de colinesterasa
<b>IC<math>_{50}</math></b>	concentración que inhibe al 50% la actividad enzimática máxima
<b>J</b>	constante de acoplamiento
<b><i>m/z</i></b>	relación masa/carga

<b>M<sup>+</sup></b>	ión molecular
<b>MeOD-<i>d</i><sub>4</sub></b>	metanol deuterado
<b>MeOH</b>	metanol
<b><i>n</i>-BuOH</b>	<i>n</i> -butanol
<b>NEQ</b>	nuevas entidades químicas
<b>NFTs</b>	ovillos neurofibrilares
<b>NMDA</b>	receptor <i>N</i> -metil-D-aspartato
<b>os</b>	señal superpuesta
<b>PAS</b>	sitio aniónico periférico
<b>PI</b>	porcentaje de inhibición
<b>PN</b>	producto natural
<b><i>R</i><sub>f</sub></b>	factor de retención
<b>ROS</b>	especies reactivas de oxígeno
<b><i>Tc</i>ACE</b>	acetilcolinesterasa de <i>Torpedo californica</i>
<b>TLC</b>	cromatografía en capa fina
<b><i>t</i><sub>R</sub></b>	tiempo de retención

**CAPÍTULO I**  
**- *Introducción* -**

## **1.1 Enfermedad de Alzheimer**

La demencia, que ha recibido varios nombres a lo largo de la historia, es conocida desde tiempos de Hipócrates (400 a.C.). Sin embargo, fue Alois Alzheimer quien en 1901 identificó el primer caso, de la después bautizada en su honor, enfermedad de Alzheimer (EA). Esta enfermedad representa el tipo más común de demencia, con más del 75% de los casos en la población mundial. La EA es un desorden neurodegenerativo progresivo que afecta la memoria, el pensamiento, el razonamiento y el lenguaje, terminando por desarrollar cambios en la personalidad del paciente haciéndolo incapaz de cuidarse por sí mismo.

La EA afecta a los pacientes de formas distintas, pero los síntomas iniciales más comunes son la pérdida gradual de la habilidad de recordar nueva información. Esto ocurre debido a que las primeras neuronas en verse afectadas son aquellas involucradas en formar nuevos recuerdos. A medida que otras partes del cerebro comienzan a funcionar mal, los individuos experimentan otros obstáculos como dificultad para resolver problemas, para completar actividades hogareñas o laborales, confusión en tiempo y espacio, problemas para entender imágenes visuales, pérdida de la capacidad de habla y escritura, disminución o pérdida del juicio, cambios en el humor y la personalidad, incluyendo depresión, entre otras ([http://www.alz.org/downloads/Facts\\_Figures\\_2014.pdf](http://www.alz.org/downloads/Facts_Figures_2014.pdf)).

Mundialmente, la prevalencia de la EA era de más de 35 millones de personas en el año 2010, con proyecciones de 65 millones para el año 2030 y 115 millones de personas afectadas por la enfermedad o desórdenes relacionados para el año 2050. Este aumento desmedido en el número de pacientes es consecuencia directa de las mejoras en el servicio de salud, aumento de la esperanza de vida y edad promedio de la población mundial. La EA representa un problema social y financiero, no sólo para el paciente y su familia, sino también para la sociedad entera (Goure y col., 2014).

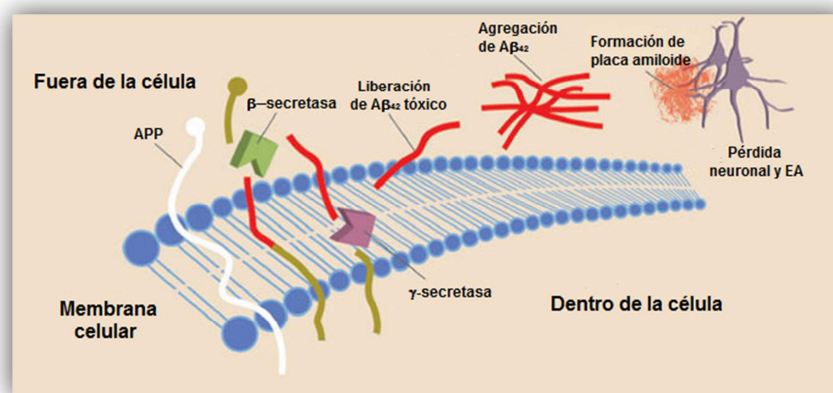
La etiología de la EA es multifactorial, únicamente un 3% de los casos se deben a una mutación en los genes que codifican la APP (proteína precursora de amiloide),

*presenilin 1* (PSEN 1) y *presenilin 2* (PSEN 2), generando formas de EA precoz. El mayor factor de riesgo es la edad, siendo componentes importantes también la historia familiar, traumas en la cabeza, el género, casos de depresión previa, diabetes mellitus, hiperlipidemia y factores vasculares (Anand y col., 2014).

Neuropatológicamente la EA está caracterizada por depósitos extracelulares del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) llamados placas seniles, depósitos intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada (conocidos como ovillos neurofibrilares o NFTs), pérdida neuronal y pérdida sináptica. Además, estudios anatómicos en pacientes con EA han mostrado pérdida de materia blanca y una reducción específica de neuronas colinérgicas en el cerebro basal anterior (Lombardo y col., 2014). Estas evidencias han llevado a los científicos a establecer hipótesis que se correlacionen con los hechos observados. Las de mayor importancia y aceptación son la hipótesis de la cascada amiloide, la de la proteína tau y la hipótesis colinérgica.

El carácter patogénico del péptido  $A\beta$  ha dado origen a la llamada hipótesis amiloide. Esta establece que la formación y deposición de pequeños péptidos de  $A\beta$  genera fibras amiloides largas e insolubles, que se acumulan como placas seniles en regiones críticas del cerebro, llevando al desarrollo y progreso de la EA, la cual eventualmente conduce a discapacidades crecientes y finalmente a la muerte. Los péptidos  $A\beta$  patogénicos, junto con otros péptidos no patogénicos, son originados por la actividad proteolítica de la APP, una proteína normal de las membranas celulares. La actividad de distintas secretasas ( $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ -secretasa) escinde la APP, produciendo diferentes péptidos dependiendo de dos rutas: la ruta  $\alpha$  (o no-amiloidogénica) la cual deriva en la formación de APP soluble ( $sAPP\alpha$ ), y la ruta de la  $\beta$ -secretasa (o amiloidogénica), mediada por la acción secuencial de  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, resultando en la formación de péptidos  $A\beta$ . Debido a que las  $\gamma$ -secretasas dividen su sustrato en posiciones vecinas, los péptidos  $A\beta$  son un grupo proteico que difiere solo en su longitud (entre 39-43 aminoácidos). Las especies dominantes son  $A\beta_{1-40}$ , constituyendo 80-90% de los péptidos  $A\beta$ , y  $A\beta_{1-42}$ , el cual en condiciones normales constituye entre 5-10%, siendo un péptido tóxico y de alta agregación. Diversos

factores, genéticos y ambientales, hacen que la proporción de las especies de péptidos  $A\beta$  varíe, desencadenando la acumulación de oligómeros y polímeros  $A\beta_{1-42}$  de mayor toxicidad y activando una cascada de enzimas responsables del estrés oxidativo y de la regulación de los niveles de  $Ca^{2+}$  en las células. Consecuentemente se produce la formación de radicales libres, respuesta inflamatoria, un aumento en la fosforilación de la proteína tau y depósito de NFTs, concluyendo finalmente con muerte neuronal (Figura 1) (Agis-Torres y col., 2014; Cahlíková y col., 2014).

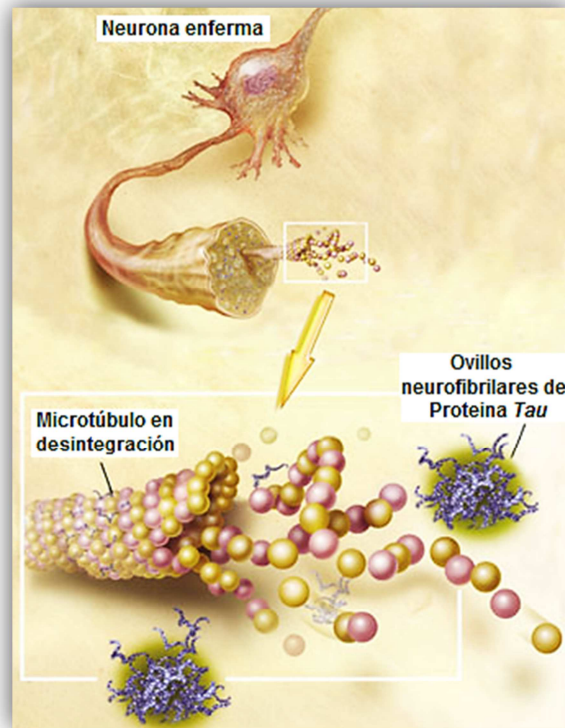


**Figura 1:** Formación de placas amiloides.

Contrario a lo que se pensaba, la densidad de las placas amiloides no se correlaciona bien con la severidad de la demencia presentada por pacientes de EA. Varios estudios han demostrado, que los NFTs sí explican con bastante precisión la sintomatología clínica. Además, existe evidencia que revela que podría existir la presencia de depósitos amiloides con pocas o ninguna manifestación clínica. Estos hechos han dado origen a una segunda hipótesis, la de la proteína tau. Esta proteína, presente en las neuronas en condiciones normales, está relacionada con la incorporación de tubulina a los microtúbulos, estabilizándolos y afectando el tráfico axonal. Durante la EA, la fosforilación de la proteína tau se ve aumentada regulando negativamente su unión a los microtúbulos, afectando el transporte axonal e incrementando la capacidad de tau de autoensamblarse y formar agregados, conduciendo a su deposición como NFTs (Figura 2). Además, se ha demostrado que la



hiperfosforilación interfiere con las actividades neuronales, causando alteraciones en las funciones mitocondriales celulares como la respiración, llevando al déficit cognitivo característico de la EA (Cahlíková y col., 2014; Nisbet y col., 2015).

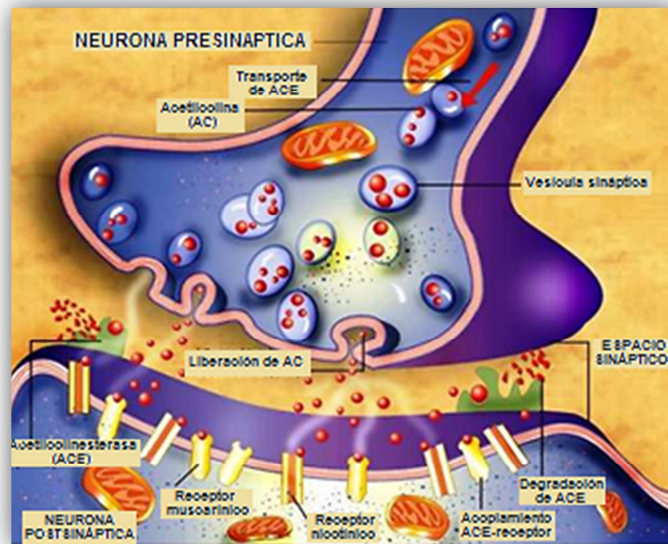


**Figura 2:** Desintegración de microtúbulos en EA, rol de la proteína tau.

Existen trabajos recientes que hablan de un rol sinérgico entre el péptido A $\beta$  y la proteína tau en el desarrollo y progresión de la EA, como un proceso en dos etapas. En la primera, los oligómeros solubles del péptido A $\beta$  generan neurotoxicidad y se depositan en forma de fibras y placas seniles, prolongando la respuesta inflamatoria. Luego, los NFTs se depositan y el subsecuente daño neuronal y sináptico lleva a la disfunción de neurotransmisores (Tayeb y col., 2012; Nisbet y col., 2015).

### 1.1.1 Colinesterasas y su relación con la Enfermedad de Alzheimer

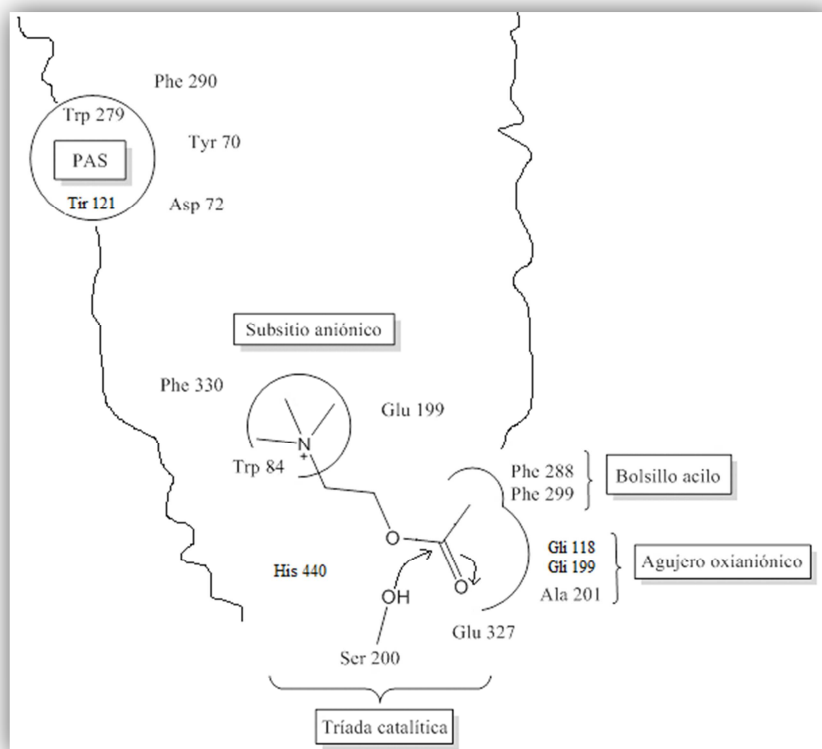
Durante la progresión de la EA, distintos tipos de neuronas se deterioran, entre ellas, neuronas colinérgicas del cerebro anterior, seguido por una disminución progresiva del neurotransmisor acetilcolina. La hipótesis colinérgica ha llevado al descubrimiento de los inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (iACEs) los cuales son, hasta el momento, la principal terapia utilizada para los casos de EA media a moderada. Los iACE previenen la degradación de acetilcolina por la enzima acetilcolinesterasa (ACE), resultando en mayores niveles de este neurotransmisor disponible en la sinapsis colinérgica para su absorción (Figura 3). El tratamiento mejora la transmisión colinérgica beneficiando la comunicación entre neuronas y disminuyendo de esta manera, los síntomas de la deficiencia cognitiva. Esto sin embargo, no afecta la progresión ni el resultado de la enfermedad (García-Ayllon y col., 2014; Wattmo y col., 2014).



**Figura 3:** Sinapsis neuronal. Hipótesis colinérgica.

La estructura en tres dimensiones de la enzima ACE ha sido determinada en base a la misma enzima extraída de la raya eléctrica *Torpedo californica* ya que su estructura es muy similar a la que está presente en mamíferos (Figura 4). Se ha

determinado que ACE posee dos sitios de unión principales: el sitio activo catalítico (CAS) y el sitio aniónico periférico (PAS). El CAS, ubicado en el interior de una profunda cavidad, contiene dos subsitios: el aniónico y el esteárico. El subsitio aniónico, sin carga y lipofílico, se une a la amina cuaternaria positivamente cargada de la acetilcolina mediante catorce residuos de aminoácidos, entre los cuales Trp84 es uno de los más importantes por sus interacciones  $\pi$ -catión. El subsitio esteárico, donde la acetilcolina es hidrolizada a colina y acetato, contiene la llamada tríada catalítica de los aminoácidos Ser200, His440 y Glu327. El PAS es un área no muy definida, ubicada a la entrada de la cavidad catalítica. El PAS se une transitoriamente al sustrato como el primer paso de la ruta catalítica, aumentando la eficiencia catalítica, al atrapar al sustrato en su camino al sitio activo (Houghton y col., 2006; Čolovic y col., 2013; Singh y col., 2013).



**Figura 4:** Esquema de los sitios de unión en la cavidad de ACE de *Torpedo californica*.

El péptido A $\beta$  interacciona con el PAS resultando en la formación de placas amiloides y el consecuente daño a neuronas colinérgicas. Se cree, que el diseño de nuevos iACEs que puedan interactuar simultáneamente con el CAS y PAS de la enzima pueden resultar en el desarrollo de agentes con un perfil farmacológico expandido como consecuencia de su alta afinidad por la enzima y su interferencia en la agregación del péptido A $\beta$  mediante el bloqueo del PAS (Singh y col., 2013).

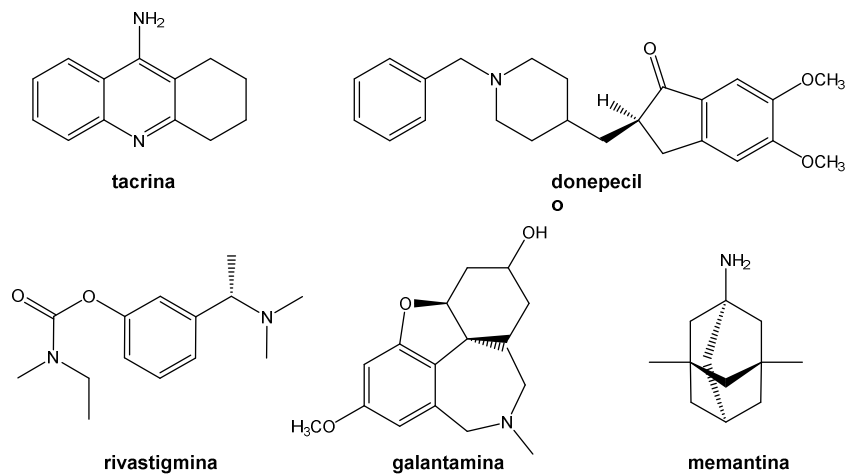
Además de ACE, existe otra colinesterasa, llamada butirilcolinesterasa (BuCE), también capaz de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina. Mientras que ACE se encuentra asociada principalmente a neuronas y axones, BuCE es expresada y secretada por células gliales en el cerebro. En un cerebro sano, ACE y BuCE se encuentran en una proporción 4:1, sin embargo, en cerebros de pacientes con la EA la actividad de ACE puede disminuir hasta un 45% durante el progreso de la enfermedad, reflejando la desaparición de neuronas y axones a las cuales se encuentra asociada, mientras que la actividad de BuCE puede hasta duplicarse. Se ha demostrado también, que niveles en crecimiento de BuCE se correlacionan con el depósito de placas amiloides y NFTs. Debido a esto, se ha establecido que una inhibición selectiva de BuCE o inhibidores duales de ACE y BuCE podrían ser cruciales en la patogénesis de estadios de medios a avanzados de la EA, con el fin de evitar un mayor declive en las habilidades cognitivas y mentales mientras persiste la disminución de neuronas colinérgicas (Greig y col., 2005; Furukawa-Hidi y col., 2011; Wang YH y col., 2012).

### ***1.1.2 Medicamentos actuales para la Enfermedad de Alzheimer***

Se ha demostrado que el uso de iACEs tiene un impacto positivo tanto en los síntomas psiquiátricos como en los conductuales en personas afectadas por la EA (Čolovic y col., 2013).

En la actualidad existen cinco medicamentos aprobados por agencias regulatorias internacionales como US-FDA (United States Food and Drug Administration) y la EMA (European Medicines Agency) para el tratamiento de las

manifestaciones cognitivas de la EA y el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes: tacrina (ya retirada del mercado), donepecilo, rivastigmina y galantamina como inhibidores de ACE reversibles, y memantina como un antagonista del receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA) (Figura 5) (Čolovic y col., 2013; Konrath y col., 2013). Tacrina fue el primer inhibidor de ACE aprobado para el tratamiento de la EA en 1993, presentando una mejora del rendimiento cognitivo de entre el 5 y el 40% después del tratamiento, en pacientes con EA media a moderada. Su uso, sin embargo, ha sido dejado de lado por la alta incidencia de efectos secundarios gastrointestinales y alta hepatotoxicidad (Konrath y col., 2013).



**Figura 5:** Fármacos aprobados para el tratamiento de la EA.

Donepecilo es un inhibidor reversible y selectivo de ACE aprobado en 1996, que se une al PAS de la enzima, exhibiendo no solo tratamiento sintomático, sino retrasando además la deposición de placas amiloides. Este medicamento tiene mejores propiedades que tacrina sin presentar hepatotoxicidad, mostrando pocos efectos secundarios gastrointestinales (Čolovic y col., 2013; Konrath y col., 2013).

Rivastigmina, derivado del alcaloide natural fisostigmina, es un inhibidor pseudorreversible potente que bloquea la actividad de ACE uniéndose a la parte esteérica del sitio activo de la enzima. A diferencia de donepecilo que inhibe selectivamente a ACE, rivastigmina muestra similar inhibición de ambas colinesterasas,

ACE y BuCE. No causa daño a los riñones, produciendo sólo efectos secundarios colinérgicos como náuseas, vómitos y dolores de cabeza (Čolovic y col., 2013; Konrath y col., 2013).

El alcaloide galantamina es un compuesto natural, aislado por primera vez de la especie *Galanthus nivalis* y luego encontrado como constituyente en distintas especies de la familia Amaryllidaceae. Es un inhibidor de ACE selectivo, competitivo y rápidamente reversible que interacciona tanto con el sitio aniónico como con la cavidad aromática de la enzima. Además, se ha demostrado que es un modulador alostérico del receptor neuronal nicotínico de acetilcolina. Los efectos secundarios presentados, al igual que otros iACE, son mayormente gastrointestinales. Aunque se ha conseguido la síntesis total de este alcaloide, la comercialización actual se basa en la extracción, con bajo rendimiento y alto costo, de distintas poblaciones de *Leucojum aestivum* (Ortiz y col., 2012; Čolovic y col., 2013; Konrath y col., 2013).

Considerando los efectos clínicos de donepecilo, rivastigmina y galantamina, no existe evidencia de la superioridad de ninguno de los medicamentos en cuanto a su eficacia. Sin embargo, donepecilo ha presentado mejor tolerancia con menores efectos secundarios gastrointestinales que los otros dos.

Memantina por su parte, es un antagonista no competitivo del receptor NMDA. Protege a las neuronas de una actividad glutamatérgica excesiva, que resulta en excitotoxicidad. Además, disminuye la hiperfosforilación de la proteína tau. Muchos estudios clínicos han demostrado que mejora la cognición y los efectos neuropsiquiátricos y conductuales de la EA. Memantina está aprobada desde 2002 para casos de EA moderada a severa y su utilización clínica es en combinación con los iACEs en etapas avanzadas de la enfermedad así como en otras demencias (Tayeb y col., 2012).

Debido a que la disfunción neuronal comienza en las etapas iniciales de la EA, la utilidad de los iACEs es la de proveer alivio de la sintomatología clínica en el período de transición, apoyando las funciones cerebrales con las neuronas disponibles. Al

aumentar el daño neuronal, la efectividad terapéutica de los iACEs disminuye gradualmente. Estudios recientes indican que en la actualidad, el beneficio evidenciado en el tratamiento con iACEs comerciales es variable, pudiendo durar hasta cuatro años (Anand y col., 2014).

### ***1.1.3 Importancia del desarrollo de nuevos iACEs en la actualidad***

El entendimiento de la patofisiología de la EA está cambiando constantemente, pero durante las últimas décadas la intensiva investigación nos ha dado herramientas significativas en el progreso del conocimiento de la enfermedad. De acuerdo con esto, se han abordado distintas estrategias con el fin de modificar el proceso de la EA, siendo los mayores desarrollos aquellos enfocados en terapias basadas en el péptido A $\beta$  y la proteína tau. Varios medicamentos han sido investigados cuidadosamente en estudios preclínicos, pero muchos de ellos han fallado en producir buenos resultados en las etapas clínicas (Anand y col., 2014).

Si bien existen importantes avances hacia el descubrimiento de terapias que modifiquen la enfermedad, el tratamiento sintomático es, hasta el momento, la mejor solución en el manejo de la enfermedad. Sumado a esto, existen evidencias recientes que indican que los iACEs han demostrado un potencial modificador de la enfermedad y no sólo alivio sintomático, alentando nuevos estudios (Anand y col., 2014; Cummings y col., 2014).

Considerando lo anterior, puede decirse que el descubrimiento de nuevos inhibidores de colinesterasa (iCEs), que tengan un efecto más prolongado y menores efectos secundarios sigue siendo un desafío en la comunidad científica. Es importante destacar además, que el tiempo necesario para la aprobación del uso terapéutico de agentes sintomáticos es sustancialmente más corto que para aquellos que presentan una modificación de la enfermedad, con lo cual el interés en nuevos iCEs que puedan llegar al mercado en un período de tiempo no muy extenso es aún mayor.

### 1.1.4 Detección de la actividad inhibitoria de colinesterasa

La elección de un ensayo de *screening* apropiado es crucial. De hecho, la actividad biológica demostrada por compuestos naturales y sintéticos con distintos test y/o realizada por diversos grupos de investigación puede ser muy variable. En las últimas décadas, la introducción del método de Ellman (Ellman y col., 1961) como un método de “*screening*” rápido ha resultado en el descubrimiento de un gran número de nuevos iACEs, convirtiéndolo en el método más difundido (Di Giovanni y col., 2008).

El ensayo de Ellman emplea ioduro de acetiltiocolina (ATCI) como sustrato de la enzima ACE y ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) como reactivo de color. El método se basa en la reacción entre la tiocolina, liberada a partir de la hidrólisis del sustrato por acción de la ACE, con el reactivo de color DTNB. El producto resultante genera un anión de color amarillo que puede detectarse en el UV por su absorción a 405 nm (Figura 6).

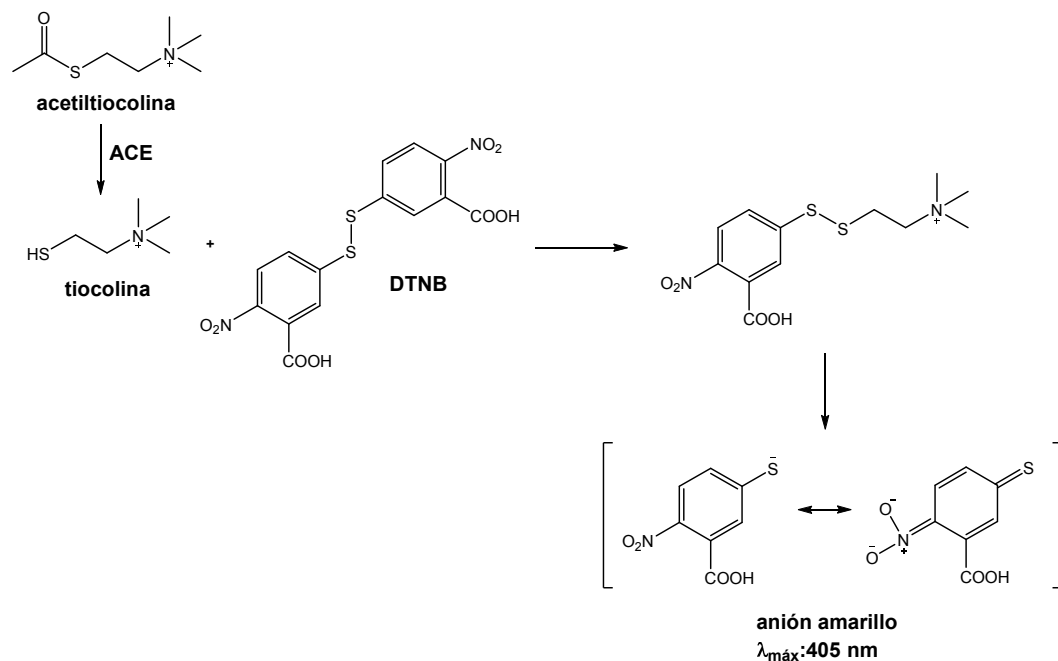
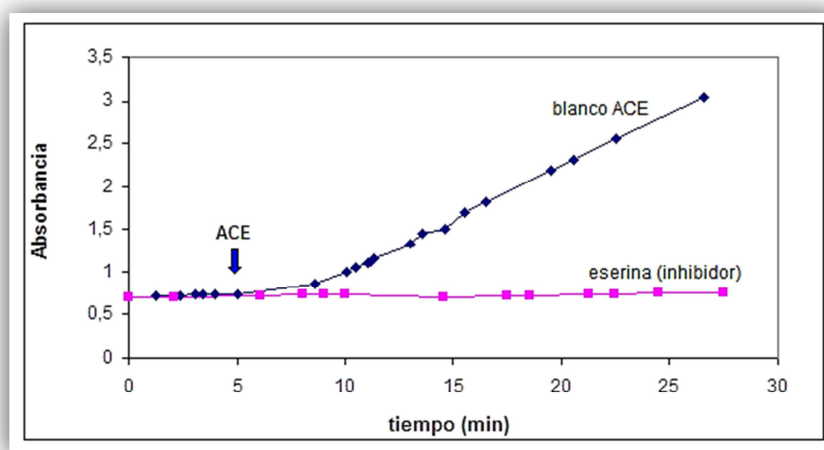


Figura 6: Método de Ellman.



Cuanto mayor es la cantidad de sustrato hidrolizado, mayor es la absorbancia de la muestra. En ausencia de un inhibidor, la curva de absorbancia vs tiempo tiene pendiente positiva y permite medir la velocidad inicial de la enzima. En cambio, en presencia de un inhibidor la pendiente de la curva disminuye, ya que la actividad enzimática es menor, siendo cero para el 100% de inhibición (Figura 7).



**Figura 7:** Curva absorbancia vs tiempo en presencia y ausencia de un inhibidor.

López y colaboradores modificaron el ensayo de Ellman para detectar inhibición de ACE en extractos considerando que muchos de ellos son muestras poco solubles en medios acuosos. Para ello, incluyeron el empleo de un tensioactivo no iónico (Tween 20), a bajas concentraciones en los buffers empleados para el ensayo, como emulsionante (López y col., 2002).

La reacción de Ellman también ha sido adaptada a ensayos cualitativos realizados sobre cromatografías en capa fina. Este método bioautográfico permite el *screening* rápido de extractos, fracciones y/o compuestos puros. Además, posibilita el reconocimiento de inhibidores conocidos en etapas tempranas de la investigación y la elección de los extractos más promisorios para el descubrimiento de nuevas estructuras. Utilizando el método en TLC en combinación con la cuantificación espectrofotométrica, es posible obtener información valiosa para los pasos de purificación posteriores a la extracción (Rhee y col., 2001).

En la actualidad, con el surgimiento de los conocimientos sobre BuCE y su rol en la EA y enfermedades relacionadas, el método de Ellman ha sido también adaptado para determinar la actividad inhibitoria de esta enzima. Para esto, se utiliza como sustrato de la enzima BuCE, yoduro de butiriltiocolina (BTCl), manteniendo el resto de los parámetros en la determinación.

En el caso de ACE, puede adquirirse comercialmente enzima ACE liofilizada purificada del órgano eléctrico de la anguila *Electrophorus electricus* (*electric eel*) y de eritrocitos humanos. Ambas pueden utilizarse con ciertas modificaciones para realizar mediciones usando el método de Ellman. De igual forma, la enzima BuCE puede obtenerse en forma comercial purificada de suero equino o suero humano.

## **1.2 Productos naturales bioactivos**

Los productos naturales (PNs) son usualmente moléculas pequeñas producidas por una fuente biológica como plantas, animales o microorganismos, y cuya ocurrencia puede estar limitada a una familia taxonómica, género o especie particular. Generalmente, el término producto natural es considerado sinónimo de metabolito secundario. Considerando a este último como un compuesto orgánico con una estructura determinada para ejercer una actividad biológica, que no tiene una función primaria directamente involucrada en el crecimiento, desarrollo y reproducción normal de un organismo, sino que es utilizado por éste para controlar relaciones ecológicas (Krause y col., 2013; Martins y col., 2014).

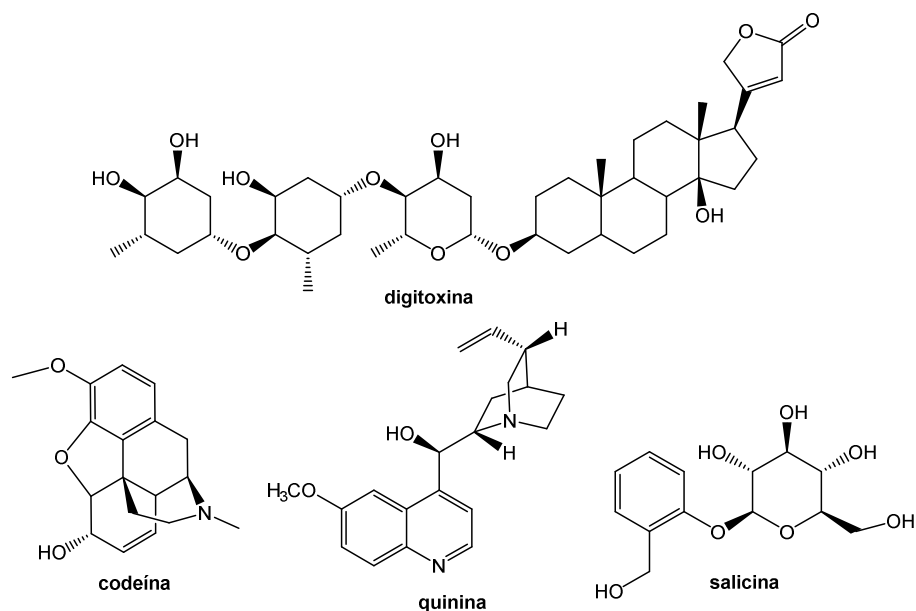
Los PNs han sido utilizados tradicionalmente como fuente de medicina, e incluso hoy son considerados como la fuente más exitosa de potenciales fármacos líderes. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de la población mundial todavía utiliza plantas o medicinas relacionadas como atención primaria de salud (Dias y col., 2012).

El uso terapéutico de los PNs ha sido descrito a través de la historia en la forma de medicinas tradicionales, remedios, pociones y aceites. La principal fuente de conocimiento del uso de PNs es el resultado de la experiencia del hombre, experimentos de prueba y error por cientos de años en búsqueda de tratamientos disponibles frente a distintas enfermedades. Las plantas, en particular, han sido la base de sofisticados sistemas de medicina tradicional desde hace miles de años. El registro más antiguo, es el uso de tabletas de arcilla con aceites de *Cupressus sempervirens* y especies de *Commiphora* para disminuir la tos y enfriamientos en la Mesopotamia (2600 a.C.). De igual forma, existen documentos de civilizaciones en Egipto, China, India y Grecia registrando el uso de cientos de hierbas medicinales y sus extractos como píldoras, infusiones, ungüentos, etc. para el tratamiento de diversas afecciones (Dias y col., 2012; Cragg y col., 2014).

A principios de 1800, los avances en el conocimiento científico llevaron al descubrimiento de compuestos puros dando inicio a una nueva era en medicina, donde los fármacos podían ser purificados de las plantas y administrados en dosis precisas, independientemente de la cantidad de material vegetal. Entre los primeros ejemplos reportados se encuentra la digitoxina, un glucósido cardiotónico eficaz para mejorar el ritmo cardíaco, aislado de *Digitalis purpurea* (Figura 8). Otro ejemplo es el alcaloide isoquinolínico codeína, aislado a partir del opio extraído de cápsulas inmaduras de *Papaver somniferum* (Figura 8). Este alcaloide, interactúa con los receptores opioides distribuidos en el sistema nervioso, por lo que es ampliamente utilizado como analgésico narcótico; además se utiliza por su efecto antitusivo. Puede mencionarse también la quinina, aislada de la corteza de especies de *Cinchona*, que fue aprobada como fármaco antimalárico por la FDA en el año 2004 (Figura 8). La salicina, aislada de la corteza del árbol *Salix alba*, ha sido utilizada antiguamente para tratar la fiebre, y luego indicada para el tratamiento sintomático de las molestias reumáticas (Figura 8) (Der Marderosian y col, 2002; Butler, 2004).

Desde ese momento hasta la actualidad, el conocimiento asociado a las medicinas tradicionales ha promovido numerosas investigaciones de plantas

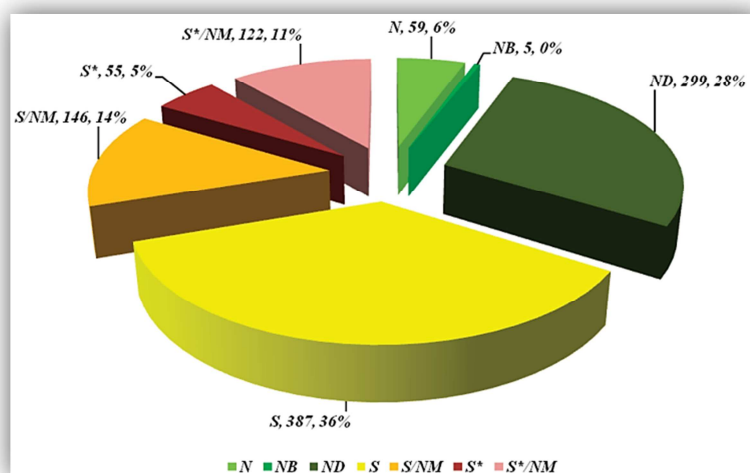
medicinales y ha llevado al descubrimiento de muchos fármacos o compuestos líderes de origen natural.



**Figura 8:** Ejemplos de compuestos naturales bioactivos descubiertos a principios del siglo XIX .

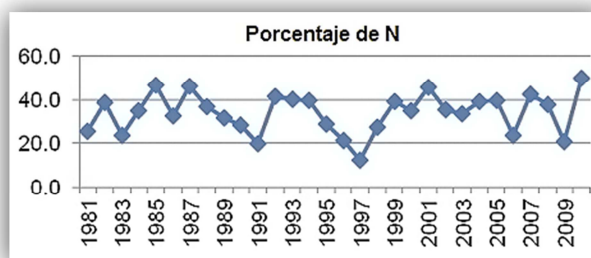
La importante contribución de la naturaleza al descubrimiento de nuevos fármacos ha sido evaluada por Newman y Cragg en distintos artículos (Cragg y col., 1997; Newman y col., 2003; 2007; 2012). En el más reciente, se tienen en cuenta los fármacos aprobados para el tratamiento de enfermedades humanas entre 1981 y 2010, concluyendo que los PNs o estructuras basadas en PNs continúan desempeñando un rol muy importante en el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Los autores consideran las nuevas sustancias activas o NEQ clasificadas dentro de las siguientes categorías: N (producto natural), NB (producto natural botánico, mezcla de drogas vegetales), ND (derivado de un producto natural, usualmente con modificaciones semisintéticas), S (fármaco totalmente sintético, obtenido mediante *screening* al azar o modificación de un compuesto existente), S\* (obtenido por síntesis total, pero con farmacóforo de un producto natural). Introducen además, una subcategoría NM que incluye inhibidores o antagonistas del sustrato o receptor natural. El análisis de los datos obtenidos por estos autores en la Figura 9

muestra que en el período de treinta años estudiado, sólo un 36% de las NEQ aprobadas son de origen estrictamente sintético, sin tener ninguna relación con una estructura natural; mientras que los PNs, mezclas de drogas vegetales y derivados semisintéticos de PNs representan el 34%. Esto demuestra, que aún sin tener en cuenta el aporte de los PNs en la inspiración de nuevas moléculas, categorías S\*, S\*/NM, S/NM, los PNs han ocupado y siguen ocupando un rol muy destacado en el desarrollo de nuevos medicamentos, además de proveer un punto de partida para nuevos compuestos sintéticos.



**Figura 9:** Fuente de medicamentos aprobados entre 1981-2010 (Newman y col., 2012).

Analizando el porcentaje de NEQ aprobadas que se muestra en la Figura 10 los autores demuestran que el porcentaje de los productos N, sin incluir las categorías inspiradas por PNs, varía entre 10,8% y 50% en ese periodo de tiempo. El valor más alto se alcanzó en el año 2010, donde la mitad de las veinte moléculas pequeñas aprobadas fueron incluidas dentro de alguna de las categorías N.



**Figura 10:** Porcentaje de NEQ en la categoría N aprobadas entre 1981 y 2010 (Newman y col., 2012).

El interés de las industrias farmacéuticas en los PNs presentó una disminución durante la década de los '90 debido al desarrollo de nuevas tecnologías muy promisorias como la química combinatoria (QC) y los ensayos de *screening* de alto rendimiento (*high throughput screening*, HTS). Sin embargo, las altas expectativas puestas en estas disciplinas no fueron satisfechas y el número de NEQ obtenidas por estos métodos ha ido disminuyendo. Existe hasta la fecha, una sola NEQ introducida por la QC mediante síntesis *de novo*, un compuesto antitumoral llamado sorafenib (Figura 11), aprobado por la FDA en 2005 para el tratamiento de carcinoma renal y en 2007 para el tratamiento de carcinoma hepatocelular. Consecuentemente, el interés por las fuentes naturales ha experimentado un renacimiento. Aun cuando no se hallen NEQ de plantas medicinales, compuestos conocidos con nuevas actividades biológicas pueden proporcionar importantes fármacos líderes. Varios compuestos conocidos aislados de plantas medicinales han mostrado su acción en nuevas dianas terapéuticas, tal es el caso de indirubina, utilizado en la medicina tradicional china por sus propiedades antiinflamatorias, sedativas y antipiréticas, y que ha demostrado recientemente ser un inhibidor selectivo de kinasas independientes de ciclina (Figura 11). También puede mencionarse como ejemplo kamebakaurina, el cual en la actualidad ha demostrado inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, mientras que tradicionalmente se lo utilizaba en China, Japón y Corea como remedio para desórdenes gastrointestinales (Figura 11) (Camp y col., 2012; Cragg y col., 2014).

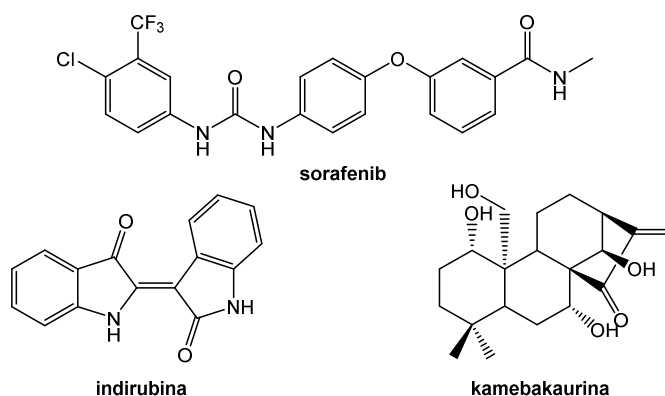


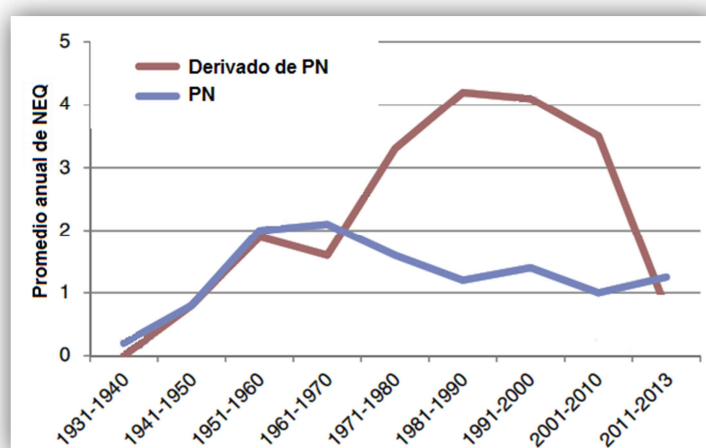
Figura 11.

Existe actualmente una nueva tendencia, la síntesis orientada a la diversidad para crear librerías de productos inspirados en estructuras naturales, donde la química de PNs y la QC unen sus esfuerzos (Balunas y col., 2005; Newman y col., 2012).

Es importante considerar el origen biosintético de los PNs. Los múltiples propósitos biológicos y roles para los cuales los PNs han sido sintetizados por un organismo requieren biodisposición y acceso a las dianas biológicas en los mismos. Por esto, los PNs pueden considerarse como prevalidados por la naturaleza, es decir, han sido optimizados para presentar interacciones óptimas con macromoléculas biológicas a través de la selección evolutiva. Por ejemplo, muchas plantas sintetizan alcaloides para protegerse de ser comidas por animales, especialmente mamíferos. Debido a esto, los alcaloides han evolucionado para unirse a proteínas específicas de mamíferos y ser tóxicos para ellos. Los PNs pueden ser considerados entonces como estructuras privilegiadas, presentando tres características estructurales importantes como son diversidad, complejidad estructural y quiralidad, responsables del éxito que presentan como fuente de fármacos (Breinbauer y col., 2002; Rosen y col., 2009; Lachance y col., 2012).

La búsqueda de nuevos PNs requiere importantes inversiones en tiempo y recursos, en parte por el gran esfuerzo requerido para aislar e identificar estas sustancias. Como se mencionó anteriormente, la industria farmacéutica se ha ido alejando progresivamente de los PNs así como de compuestos puramente sintéticos,

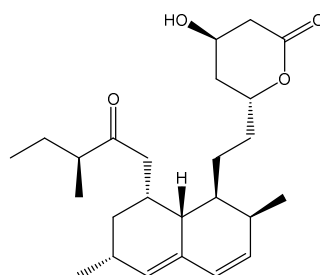
volcándose hacia la semisíntesis. Este cambio es evaluado por Patridge y colaboradores al analizar los PNs sin modificación y sus derivados semisintéticos (Figura 12) (Patridge y col., 2015). Con el paso del tiempo, los derivados semisintéticos y sintéticos de PNs han ido aumentando progresivamente, desde un 14% en 1940 a un 28% en la actualidad, entre todas las NEQ aprobadas.



**Figura 12:** Promedio anual de NEQ aprobadas por la FDA entre 1931 y 2013 (Patridge y col., 2015).

Los PNs no sólo representan una importante fuente para el descubrimiento de nuevos medicamentos sino que el estudio detallado de sus actividades biológicas y los mecanismos moleculares involucrados han llevado a la identificación de modos de acción sin precedentes que han resultado claves en el tratamiento de enfermedades humanas. Un ejemplo relevante es la inhibición de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa por estatinas como la lovastatina (Figura 13). Las estatinas, aisladas de distintas clases de hongos y sus posteriores derivados semisintéticos, permitieron la identificación de la HMG-CoA reductasa como una diana terapéutica efectiva en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Ni éste, ni muchos otros mecanismos de acción habrían sido descubiertos sin el descubrimiento en primer lugar del PN líder (Newman y col., 2012; Bauer y col., 2014).

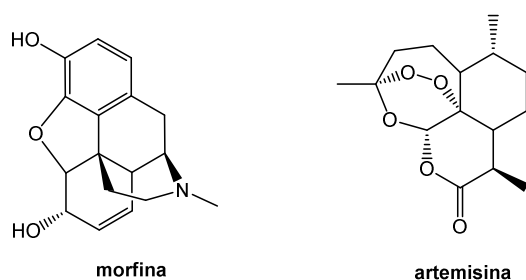




**Figura 13:** Lovastatina.

La primer NEQ aislada de plantas fue la morfina, aprobada en 1827, antes de la creación de la FDA moderna. Desde su aislamiento de la planta del opio (*Papaver somniferum*), la morfina y sus derivados se han convertido en los analgésicos y sedantes más utilizados para el alivio del dolor en pacientes con dolores crónicos, enfermedades avanzadas y para postoperatorios (Figura 14). Este tipo de compuestos interactúan con receptores estereoespecíficos opioides pre y postsinápticos en el sistema nervioso central y otros tejidos, logrando así su efecto analgésico narcótico (Patridge y col., 2015).

El descubrimiento de artemisina para el tratamiento de la malaria fue uno de los mayores descubrimientos en medicina en el siglo XX. Este compuesto, aislado de la especie medicinal china *Artemisia annua*, es una lactona sesquiterpénica caracterizada por un puente endoperóxido, esencial para su actividad (Figura 14). Debido a la pobre solubilidad de artemisina en agua y grasas, el grupo carbonilo de su estructura fue reducido para obtener derivados con mejor solubilidad, los cuales también presentan una importante actividad. A pesar de que su mecanismo de acción todavía no ha sido completamente elucidado, artemisina y sus derivados son unos de los agentes antimaláricos más potentes aprobados para el tratamiento de la enfermedad en diversos países (Cui y col., 2009; Cragg y col., 2013).



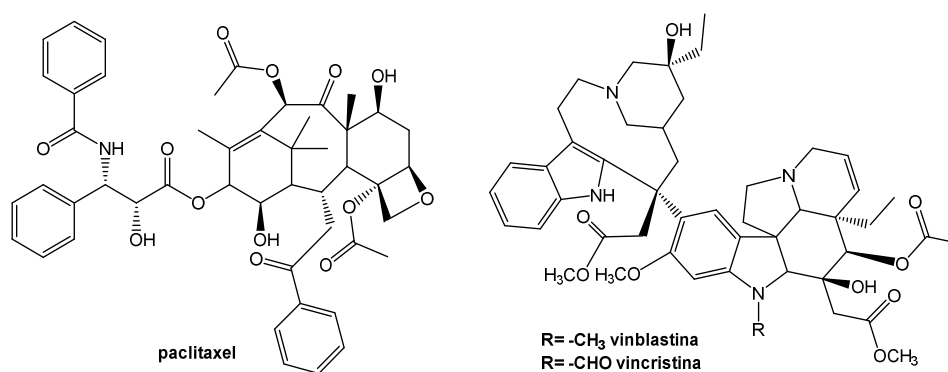
**Figura 14:** Morfina y artemisina.

El paclitaxel (Figura 15) es un diterpenoide aislado de la corteza de *Taxus brevifolia* Nutt., aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer de mama y ovario a principios de los '90. Su estructura es muy compleja en la que se destaca un esqueleto hidrocarbonado con ciclos de 6, 8 y 6 carbonos polisustituidos con 4 metilos y 8 funciones oxigenadas. Presenta además, un total de 11 estereocentros. Los taxanos, incluyendo al paclitaxel y sus derivados, actúan al unirse a la tubulina interfiriendo con el ensamblaje de los microtúbulos. El aislamiento del paclitaxel de la corteza de *Taxus* requiere mucho esfuerzo y los rendimientos suelen ser bajos. Debido a esto, se ha recurrido a la semisíntesis y a alternativas biotecnológicas como los cultivos celulares para su obtención (Balunas y col., 2005; Cureno y col., 2011).

En la terapia contra el cáncer pueden destacarse otros compuestos aislados de plantas o derivados de ellos. Los alcaloides vinblastina y vincristina (Figura 15), aislados de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, han sido usados clínicamente por más de 40 años. Ellos y sus derivados, llamados comúnmente alcaloides de la vinca, actúan interaccionando con la tubulina e interrumpiendo la función normal de los microtúbulos. Sus usos son amplios, siendo especialmente efectivos en la terapia de leucemia y cáncer de mama (Balunas y col., 2005; Moudi y col., 2013).

El descubrimiento de éstos, así como de muchos compuestos naturales más, representa un ejemplo muy ilustrativo de cómo los conocimientos adquiridos durante siglos en la medicina tradicional y en el estudio de los productos naturales pueden ser aplicados por la industria farmacéutica y la comunidad científica para el desarrollo de nuevos fármacos, y constituye una muestra más de la importancia que tiene la

continua exploración de la biodiversidad del planeta en busca de compuestos con estructuras novedosas.



**Figura 15:** Paclitaxel y alcaloides de la vinca.

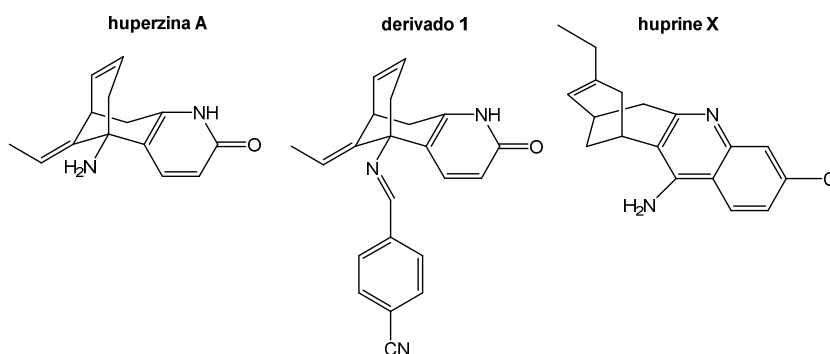
### 1.2.1 Productos naturales para la Enfermedad de Alzheimer

Históricamente, una gran variedad de hierbas medicinales han sido utilizadas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y desordenes cognitivos en la medicina tradicional. Desde la aprobación de galantamina y el derivado semisintético de fisostigmina, rivastigmina, para el tratamiento de la EA, muchos esfuerzos se han puesto en el descubrimiento de nuevos compuestos de origen natural con actividad neuroprotectora. Esto queda demostrado en la gran cantidad de trabajos publicados cada año en este campo (Russo y col., 2013; Kim y col., 2014; Su, y col., 2014).

La mayoría de los iCEs de origen natural pueden incluirse en el grupo de los alcaloides y han sido descritos en diferentes familias taxonómicas como por ejemplo: los alcaloides isoquinolínicos presentes en amarilidáceas y papaveráceas, los alcaloides esteroidales de buxáceas, los alcaloides quinolizidínicos encontrados en lycopodiáceas y los alcaloides indólicos de apocináceas y rubiáceas, entre otros. Se ha observado en general, que las complejas estructuras de estos compuestos que contienen nitrógeno

en su estructura interaccionan bien en el sitio activo de la enzima (Konrath y col., 2013; Murray y col., 2013).

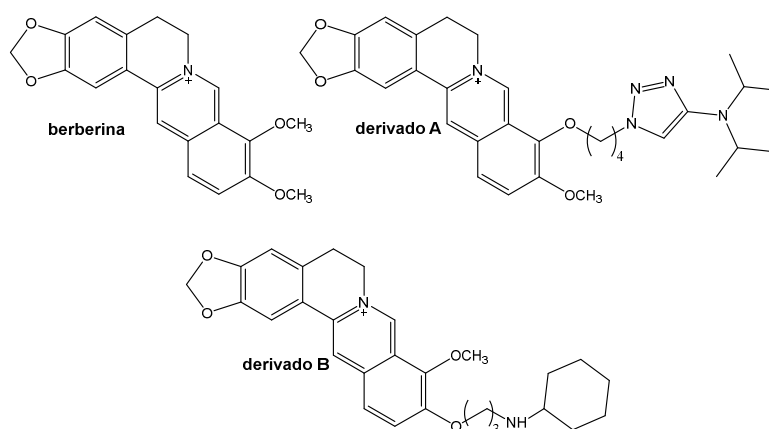
Huperzina A (Figura 16) es un iACE altamente selectivo, reversible y potente ( $IC_{50}=0,042 \mu M$ ) aislado de la planta medicinal china *Huperzia serrata*. Presenta una alta biodisponibilidad y potencia comparado con los iACEs comerciales, aunque es menos activo frente a BuCE. Se ha demostrado además, que regula el metabolismo de la APP protegiendo a las células del estrés oxidativo, apoptosis y disfunción mitocondrial generados por la deposición del  $A\beta$ . Aunque en China se expende como suplemento dietario para desordenes relacionados con la memoria, todavía no existen evidencias clínicas concluyentes que permitan su aprobación por entidades internacionales como medicamento para la EA. Actualmente, su estructura está siendo usada como base para el desarrollo de nuevos compuestos mediante semisíntesis. Se destacan derivados con un anillo aromático adicional con pequeños sustituyentes y novedosos híbridos tacrina-huperzina (Figura 16) que han mostrado mayor inhibición que huperzina A, sin inhibición de BuCE (Russo y col., 2013; Silva y col., 2014).



**Figura 16:** Huperzina A y sus derivados.

Entre los alcaloides más activos también se puede mencionar berberina (Figura 17), un alcaloide isoquinolínico presente en las raíces, rizomas y corteza de numerosas plantas como *Coptis chinensis*, *Berberis vulgaris*, *Berberis aquifolium*, *Berberis aristata*, etc. Berberina presenta numerosas actividades biológicas, entre ellas antiACE ( $IC_{50}=0,37 \mu M$ ) y se ha comprobado que es capaz de cruzar la barrera

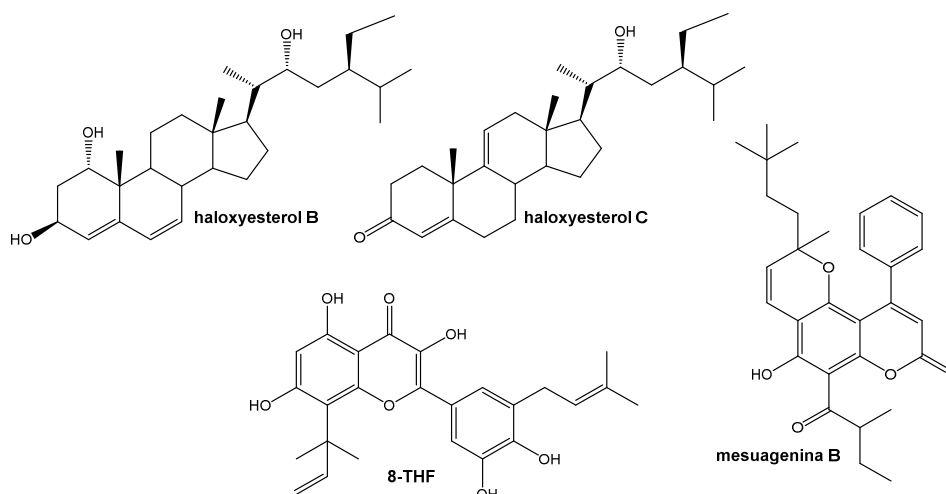
hematoencefálica alcanzando el sistema nervioso central, donde no sólo funciona como iACE uniéndose al PAS de ACE, sino también como agente neuroprotector, disminuyendo la toxicidad inducida por NMDA e inflamación. Se han diseñado diversos derivados semisintéticos de berberina (Figura 17), entre ellos algunos con sustituyentes que contienen un grupo triazol o amino unidos mediante un espaciador adecuado para mejorar la interacción con el CAS. Los derivados A y B han resultado en un aumento importante de la potencia ( $IC_{50}=0,044 \mu\text{M}$  y  $0,020 \mu\text{M}$ , respectivamente) interaccionando ambos con el PAS, mediante la porción berberínica, y el CAS vía interacciones  $\pi$ -catión con el nitrógeno protonado de la porción adicionada (Huang y col., 2010; Shi y col., 2011; Silva y col., 2014).



**Figura 17:** Berberina y sus derivados.

Se han obtenido potentes inhibidores de colinesterasa de fuentes naturales pertenecientes a otras clases de compuestos como terpenos, flavonoides y otros compuestos fenólicos. Si bien existen pocos compuestos no alcaloides con propiedades anti-ACE, son importantes ejemplos a mencionar los haloxyesteroides B y C aislados de la quenopodiácea *Haloxylon recurvum* con potente inhibición de ACE no competitiva ( $IC_{50}= 0,89 \mu\text{M}$  y  $1,0 \mu\text{M}$  respectivamente), una 4-fenilcumarina, mesuagenina B ( $IC_{50}= 0,7 \mu\text{M}$ ), aislada de *Mesua elegans* (Clusiaceae) y flavonoides prenilados aislados de la morácea *Broussonetia papyfera*, siendo 8-(1,1-dimetilalil)-5'-(3-metilbut-2-enil)-3',4',5,7-tetrahidroxiflavonol (8-THF) el inhibidor reversible más

potente de la serie, con un  $IC_{50} = 0,82 \mu M$ . Las estructuras de los compuestos mencionados se muestran en la Figura 18 (Murray y col., 2013).



**Figura 18:** Compuestos activos frente a ACE no alcaloides.

### 1.3 Plantas halófitas

Sólo entre un 5 y un 15% de un total de aproximadamente 250.000 especies de plantas superiores han sido investigadas sistemáticamente por sus componentes y actividad biológica. Existe por lo tanto, una enorme riqueza potencial de nuevos compuestos bioactivos que reside en la naturaleza, específicamente en las plantas (Dias y col., 2012).

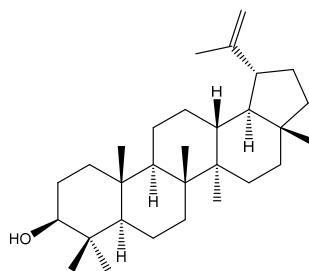
A diferencia de otras plantas vasculares, las especies tolerantes a la sal, caracterizadas por una alta adaptabilidad fisiológica, son capaces de prosperar incluso bajo estas condiciones de estrés. Se han propuesto diversas clasificaciones para estas plantas dependiendo de los requerimientos salinos, mecanismos adaptativos o sus características biotópicas. La vegetación halófitas incluye todas las clases antes mencionadas. Son plantas que pueden crecer y sobrevivir en ambientes con alta concentración de sales ( $> 200 \text{ mM NaCl}$ ) como regiones costeras, marismas, dunas, salinas, etc. Los mecanismos de tolerancia en estas plantas están relacionados con una absorción controlada, almacenamiento, síntesis de solutos compatibles y excreción del

exceso salino. Existen más de 2500 especies halófitas conocidas mundialmente por poseer algún tipo de tolerancia salina (Imada y col., 2015).

Bajo condiciones ambientales desfavorables, como alta salinidad del suelo, existe un aumento en la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en tejidos vegetales. Las halófitas, son capaces de captar y neutralizar estas ROS en respuesta al estrés. En muchas plantas, se ha encontrado una correlación entre la concentración creciente de sales en el medio y una mayor producción de ciertos metabolitos secundarios. Por ejemplo, poblaciones de *Nitaria retusa* (Nitrariaceae) mostraron un aumento en el contenido de flavonoides y fenoles con el aumento de salinidad en el suelo (0-100 mM NaCl), mientras que el contenido de fenoles en raíces de *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae) resultó ser máximo en presencia de 100 mM de NaCl y luego comenzó a decrecer con mayores concentraciones de sal (Ksouri y col., 2011; Hasanuzzaman y col., 2014).

Varias de estas especies han sido utilizadas en la medicina tradicional y recientemente, sus extractos han presentado actividad biológica frente a patógenos humanos, animales y vegetales. Por ejemplo, los frutos de *Chenopodium album* (Chenopodiaceae) han sido utilizados en la medicina tradicional China por sus propiedades diuréticas, laxantes, sedativas, hepatoprotectivas y antiparasitarias por muchos años. Se han reportado propiedades antiinflamatorias y analgésicas de su extracto etanólico, así como actividad antihelmíntica *in vitro* e *in vivo*, justificando su uso tradicional (Ksouri y col., 2011).

La halófito *Thespesia populnea* (Malvaceae) se encuentra en regiones tropicales y selvas costeras de India. Sus raíces, hojas y flores son útiles en infecciones cutáneas como psoriasis y eczema. La decocción de la raíz es usada comúnmente para el tratamiento de enfermedades de la piel y el hígado. Estudios de actividad antibacterial han demostrado que en las hojas el efecto se debe a la presencia del triterpeno lupeol (Figura 19) (Ksouri y col., 2011).



**Figura 19:** Lupeol.

La especie *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae) cultivada principalmente en Europa y América del Norte, ha sido utilizada tradicionalmente con resultados positivos aliviando resfríos, mejorando la digestión y la circulación sanguínea y aliviando dolores en general. También se la utiliza en el tratamiento de úlceras gástricas. Se ha demostrado que el aceite esencial y el extracto de flavonoides de esta especie presentan importantes aplicaciones médicas como reducción de factores de riesgo cardiovasculares, tratamiento de úlceras gastrointestinales y como agente protector hepático, entre otras (Ksouri y col., 2011).

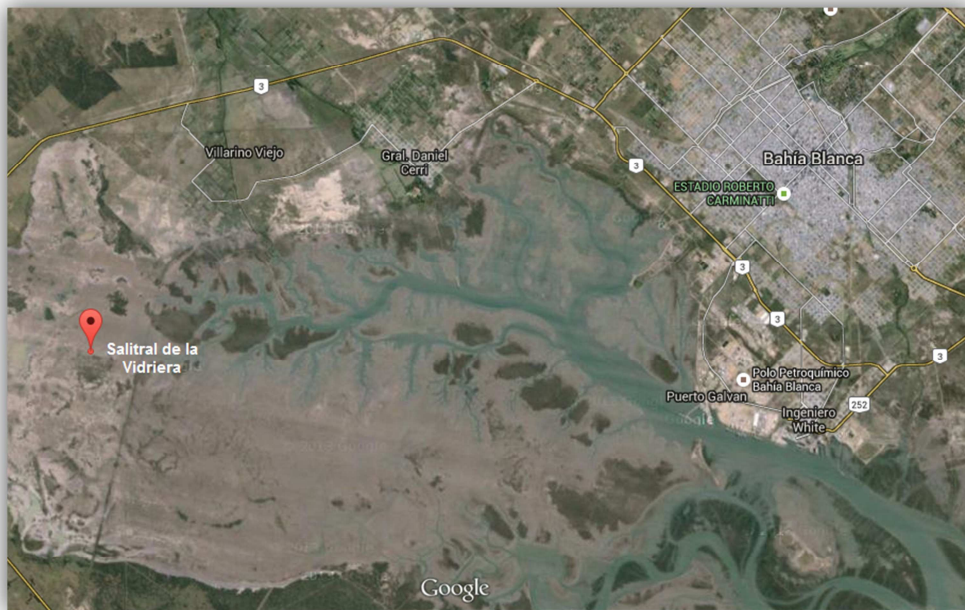
Existen otros muchos ejemplos de usos tradicionales de halófitas de las familias Aizoaceae, Apiaceae, Brassicaceae, Combretaceae, Elaeagnaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Plantaginaceae, Tamaricaceae, entre otras (Ksouri y col., 2011; Imada y col., 2015).

La distribución de halófitas en diversas familias botánicas, que conduce a diversidad de compuestos químicos, y su metabolismo adaptado al estrés resulta en la presencia de metabolitos secundarios restringidos únicamente a estas especies. Tanto especies halófitas utilizadas en la medicina tradicional, como aquellas que aún no han sido exploradas, presentan un gran potencial de contribución al descubrimiento de variedad de estructuras novedosas con importantes actividades biológicas y por ende, al desarrollo de potenciales fármacos líderes (Buhmann y col., 2013).



### 1.3.1 Salitral de la Vidriera

El salitral de la Vidriera se encuentra situado aproximadamente a 30 km de la ciudad de Bahía Blanca, partido de Villarino, provincia de Buenos Aires (Figura 20) y corresponde a la provincia fitogeográfica del Espinal dentro del distrito del Caldén (Cabrera y col., 1971). La vegetación de la zona se encuentra distribuida en parches y la flora está constituida por aproximadamente 161 especies vegetales correspondientes a 35 familias botánicas. Típicamente, la vegetación de ambientes salinos tiene características similares, aun en diferentes zonas geográficas, por tratarse de comunidades edáficas donde la salinidad del suelo es el factor más importante por encima de cualquier otro rasgo ambiental.



**Figura 20:** Ubicación del Salitral de la Vidriera.

La vegetación dominante en el Salitral de la Vidriera es de estepas arbustivas pertenecientes a la familia Chenopodiaceae, siendo más abundantes los géneros *Allenrolfea*, *Atriplex*, *Heterostachys*, *Sarcocornia* y *Suaeda*. Otros componentes vegetativos importantes en términos de abundancia en el Salitral son especies leñosas

de las familias Rhamnaceae, Fabaceae, Asteraceae, Solanaceae y Cactaceae (Murray y col., 2008; Cuadra y col., 2014).

En el grupo de investigación existen antecedentes de trabajo con especies halófitas del Salitral de la Vidriera. A partir de un *screening* realizado sobre extractos de distinta polaridad y aceites esenciales de especies vegetales de la zona, se detectaron especies con actividad biológica significativa, incluyendo inhibición *in vitro* de ACE, en especies pertenecientes a las familias Anacardiaceae, Asteraceae, Plumbaginaceae y Chenopodiaceae. Esto, condujo al aislamiento bioguiado de metabolitos secundarios con actividad antioxidante de la plumbaginácea *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Murray y col., 2004). Se realizó además, el estudio de los aceites esenciales de *Atriplex undulata* (Moq.) D. Dietr., *Schinus fasciculata* (Griseb.) I.M. Johnston y *S. praecox* (Griseb.) Speg. tanto en su composición química, como en su capacidad antioxidante (Murray y col., 2008; Rodríguez y col., 2010).

A partir también del *screening* inicial se seleccionó para su estudio la especie *Chuquiraga erinacea* D. Don. subsp. *erinacea*, una asterácea endémica, que mostró inhibición de ACE en los extractos obtenidos de sus partes aéreas. El fraccionamiento de estos extractos guiado por el bioensayo, permitió el aislamiento de los compuestos presentes en las fracciones activas, que resultaron ser triterpenos pentacíclicos monohidroxilados (lupeol,  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirina, pseudotaraxasterol y taraxasterol), dihidroxilados (calenduladiol y faradiol) y trihidroxilados (heliantriol B2) (Figura 21). El más activo de ellos fue el calenduladiol. A partir de este compuesto natural se prepararon por semisíntesis derivados disulfatados de este triterpeno que resultaron ser inhibidores más potentes que el diol de partida (Vela Gurovic, 2009; Vela Gurovic y col., 2010; Castro y col., 2014; Castro, 2015).

Puede concluirse entonces, que la zona del Salitral de la Vidriera resulta de interés para la recolección de especies vegetales con gran potencialidad para el descubrimiento de nuevos líderes con bioactividad.

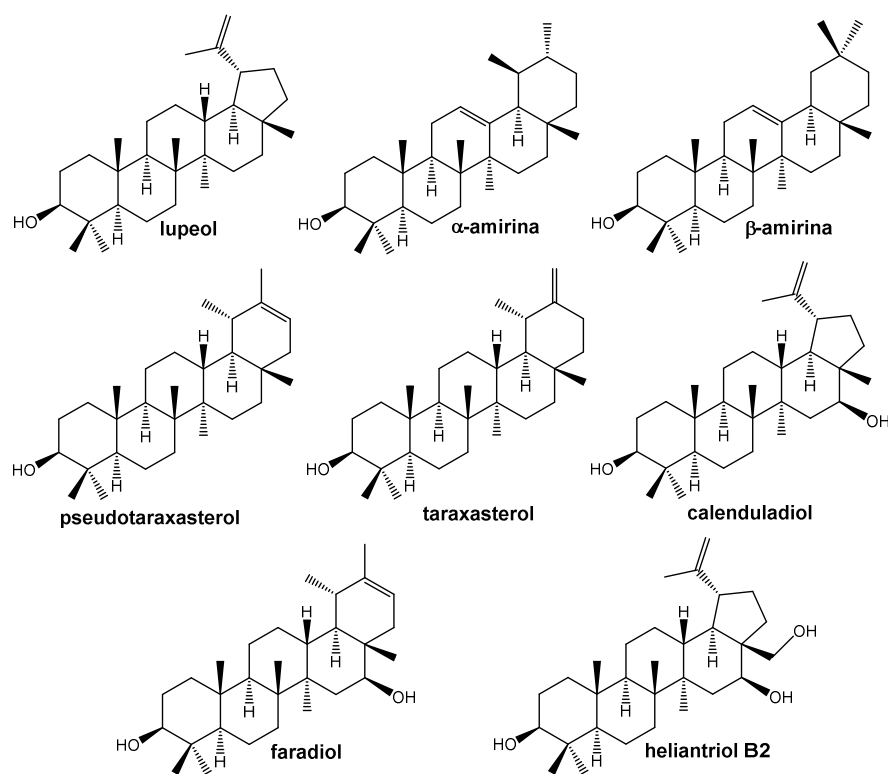


Figura 21: Compuestos activos aislados de *C. erinacea*.

# **CAPÍTULO II**

## ***-Objetivos-***

## **Objetivos**

El objetivo general de esta tesis es contribuir al descubrimiento de metabolitos secundarios bioactivos presentes en la biodiversidad local con actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (ACE) y/o butirilcolinesterasa (BuCE), que presenten una potencialidad de desarrollo como fármacos. Los inhibidores de colinesterasa, que pueden pertenecer a distintos grupos de compuestos, encuentran aplicación como drogas para la terapia de la Enfermedad de Alzheimer (EA) u otras enfermedades neurodegenerativas que involucran la función colinérgica.

Teniendo en cuenta lo anterior se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Recolectar especies pertenecientes a la flora del Salitral de la Vidriera, y realizar una descripción bibliográfica actualizada acerca de sus usos, composición química y actividades biológicas testeadas hasta el momento.
- Evaluar la actividad inhibitoria de ACE de los extractos de las especies recolectadas con el propósito de seleccionar las que resulten de interés para su estudio.
- Realizar el fraccionamiento bioguiado por el ensayo de actividad enzimática de los extractos de las especies seleccionadas.
- Aislar, caracterizar e identificar los metabolitos secundarios activos.
- Cuantificar la inhibición de las enzimas ACE y BuCE de los compuestos aislados, determinando su  $IC_{50}$  (concentración que inhibe la actividad de la enzima al 50%) o bien el porcentaje de inhibición a una concentración determinada.

Durante el desarrollo de la tesis, debido al trabajo previo realizado y a la presencia de sólo otra especie del género en la zona, se desprende el siguiente objetivo adicional:

- Estudiar la especie *Habranthus tubispathus* (L'Her) Traub., a fin de completar el estudio del género *Habranthus* en la región y comparar la composición de alcaloides de ambas especies.

**CAPÍTULO III**  
**- *Resultados y***  
***discusión* -**

### III.1 Recolección y selección de especies vegetales

Para esta tesis, las plantas de la región del Salitral de la Vidriera fueron seleccionadas siguiendo un criterio aleatorio, recolectando plantas al azar de acuerdo a su disponibilidad. Se realizaron varias recolecciones entre Noviembre de 2010 y Noviembre de 2013. La identificación taxonómica de los ejemplares recolectados fue realizada por la Dra. María Gabriela Murray, del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, en cuyo herbario se depositaron los correspondientes especímenes de referencia.

El material vegetal, una vez identificado, fue macerado en etanol durante dos semanas para obtener extractos vegetales en pequeña escala con el propósito de evaluar su actividad inhibitoria de ACE espectrofotométricamente mediante el método de Ellman. De no ser mencionado, los extractos etanólicos se realizaron a partir de la planta entera.

Se presenta a continuación una descripción botánica, fitoquímica, de usos etnomedicinales, actividades biológicas testeadas hasta el momento y resultados de actividad inhibitoria de ACE de los extractos etanólicos evaluados. La nomenclatura científica y sinónimos fueron tomados del “Catálogo de Plantas Vasculares del Conosur” (Zuloaga y col., 2008).

- ***Allenrolfea patagonica* (Moq.)Kuntze (Chenopodiaceae)**

**Sinónimos:** *Halostachys patagónica* Moq., *Halopeplis patagónica* (Moq.) Ung.-Sternb., *Spyrostachys patagónica* (Moq.) Benth. & Hook., nom. superfl., *Spirostachys patagónica* (Moq.) Griseb.

**Nombre vulgar:** “jume”, “zampa mora”.





**Status:** endémica.

**Descripción botánica y distribución:** arbustiva perenne de hasta 1 m de alto, color verde oscuro, negruzco cuando seco leñoso, ramas ascendentes, alternas, arqueadas. Hojas alternas, carnosas, persistentes, muy reducidas, de forma piramidal con un pequeño mucrón en el ápice, hemiamplexicaules, sin estípulas. Las inflorescencias son estrobiliformes, cilíndricas de hasta 4 cm de largo. Flores pequeñas, hermafroditas, agrupadas de 3 a 5 en las axilas de brácteas carnosas. Cáliz poliédrico. Un solo estambre. Fruto utrículo rodeado por el perigonio algo suberificado. Semilla comprimida lateralmente. Se encuentra desde Salta hasta el sur de la provincia de Buenos Aires, habitando suelos salados (Lamberto y col., 1997).

**Composición química:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Usos etnomedicinales:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Actividad biológica:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Inhibición de ACE:** si bien la actividad del extracto etanólico puede considerarse baja (12% a una concentración de 1 mg/ml) la inhibición fue mayor al realizar un primer fraccionamiento (72% a una concentración de 1 mg/ml para el subextracto diclorometánico).

- ***Beta vulgaris* L. ssp. *maritima* (L.) Arcang. (Chenopodiaceae)**

**Sinónimos:** *Beta maritima* L., *Beta vulgaris* L. var. *perennis*.

**Nombre vulgar:** “acelga salvaje”.

**Status:** adventicia.

**Descripción botánica y distribución:**

Herbácea perenne de 10-60 cm de altura, glabra, con varios tallos hojosos que nacen



desde la base. Hojas alternas, con largos pecíolos, láminas ovado-oblongas o romboidales, sinuadas, de borde entero, ápice obtuso, las radicales mucho mayores que las caulinares. Raíz leñosa. Inflorescencia en espiga simple o ramificada. Flores en partes solitarias y en parte reunidas en glomérulos de 2-5 flores. Flores hermafroditas con 5 sépalos unidos en la base y concrescente con el ovario. Androceo formado por 5 estambres. Gineceo con 2 ó 3 estigmas casi sésiles. Fruto con pericarpio carnoso o lignificado, rodeado por el cáliz concrescente, en el cual los sépalos se vuelven carenados. Originaria de la costa del Mediterráneo. Adventicia en América. En la Argentina crece espontáneamente en algunos suelos salados, especialmente en el ámbito bonaerense (Lamberto y col., 1997).

**Composición química:** se han encontrado como constituyentes de la planta betaxantinas (Piattelli y col., 1965), compuestos fenólicos (Gardner y col., 1967), brassinoesteroides y esteroides (Schmidt y col., 1994).

**Usos etnomedicinales:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Actividad biológica:** el extracto etanólico de la raíz ha demostrado quimiopreención frente al cáncer de pulmón y de piel *in vitro* e *in vivo* (Kapadia y col., 1996), y propiedades hepatoprotectoras *in vivo* (Agarwal y col., 2006).

**Inhibición de ACE:** el extracto etanólico demostró una significativa inhibición con un porcentaje de inhibición de 61% a una concentración de 1 mg/ml.

- ***Blumenbachia insignis* Schrad.**  
**(Loasaceae)**

**Sinónimos:** *Blumenbachia multifida* Ball, *Loasa muralis* Griseb., *Blumenbachia parviflora* Gillies ex Hook, nom. nud., *Blumenbachia multifida* Hook. f.,



*Blumenbachia multifida* Hook. f., *Blumenbachia palmata* (Spreng.) Cambess., *Loasa palmata* Spreng.

**Nombre vulgar:** “ortiga del monte”.

**Status:** nativa.

**Descripción botánica y distribución:** Planta bienal. Tallos tendidos o ascendentes, con muchas ramificaciones, cubiertas por pelos, algunos urticantes. Hojas de 6-8 cm de largo, con pecíolo de 1-2 cm de longitud, profundamente palmatisectas, con segmentos oblongos o lineales, agudos con cerdas y pelos urticantes. Flores axilares y terminales, solitarias, hermafroditas, actinomorfas con pedúnculo cubierto por pelos urticantes densos, receptáculo globoso. Corola con 5 pétalos blancos, cuculados, abiertos. Escamas nectaríferas amarillas. Cáliz con 5 sépalos iguales. Estambres numerosos, reunidos en fascículos opuestos a los pétalos. Estaminodios 10, filiformes. Fruto cápsula globosa, dehiscente por valvas espiraladas, 15-20 mm de diámetro, cubierta de gloquidios y algunos pelos urticantes. Habita el sur de Brasil, Uruguay y el norte de Argentina hasta la provincia de Río Negro, creciendo en suelos secos. Es frecuente en los suelos con conchilla de la ribera del Plata y en suelos secos del sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Lamberto y col., 1997).

**Composición química:** aminogrupos primarios y secundarios, leucoantocianinas y saponinas (Verettoni, 1985).

**Usos etnomedicinales:** antirreumática, hoja y tallos (Verettoni, 1985).

**Actividad biológica:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Inhibición de ACE:** la inhibición del extracto etanólico de esta especie se consideró baja, mostrando un IC<sub>50</sub> mucho mayor a 1 mg/ml (22,7% de inhibición de ACE a una concentración de 1 mg/ml).

- ***Flaveria bidentis* (L.) Kuntze (Asteraceae)**

**Sinónimos:** *Ethulia bidentis* L., *Eupatorium chilense* Molina, *Flaveria bonariensis* DC., *Flaveria capitata* Juss., *Flaveria chilensis* Juss., *Flaveria contrayerba* (Cav.) Pers., *Milleria chiloensis* Juss., *Milleria contrayerba* Cav., *Flaveria bidentis* (L.) B.L. Rob., comb. superfl., *Vermifuga corymbosa* Ruiz & Pav.

**Nombre vulgar:** “balda”, “valda”, “contrayerba”, “fique”, “flor amarilla”, “chaca contrayerba”.



**Descripción botánica y distribución:** planta anual glabra o casi glabra, con tallos erguidos, ramificados dicotómicamente, de 40-90 cm de altura. Hojas opuestas, lanceoladas o elípticas, trinervadas, enteras o a veces aserradas, de 6-8 cm de largo por 0,8-3 cm de ancho, atenuadas en corto peciolo o sésiles. Capítulos sentados, agrupados en cimas terminales y axilares densas y cortas. Involucro cilíndrico de 4 mm de altura por 1 mm de diámetro, formado por tres brácteas oblanceoladas, notablemente trinervadas, con una bráctea exterior mas corta. Receptáculo sin paleas. Flores dimorfas: flor femenina una, cortamente ligulada y 1-5 flores hermafroditas, con corola tubulosa dilatada y pentalobada. Gineceo con ovario ínfero, bicarpelar, unilocular y uniovulado, con estilo simple, bífido en el ápice. Androceo formado por cinco estambres insertos en el tubo de la corola, con filamentos libres y anteras soldadas entre sí por sus bordes. Aquenios oblongos, con 8-10 costillas, negros, glabros, de 2,5-3 mm de longitud, con pappus. Se la encuentra desde América tropical hasta el centro de nuestro país en suelos húmedos y secos, sueltos, arcillosos, arenosos y aún salitrosos (Lamberto y col., 1997).

**Composición química:** se han aislado flavonoides de la planta entera (Cabrera y col. 1976; 1977; 1979; Pereyra y col., 1972) y se ha aislado 1-metil-3-(metil-tio)-benceno de las capitulescencias y 3-metilbencilmercaptano de las hojas (Pastor de Abram y Zelada Mariluz, 2006).

**Usos etnomedicinales:** Su infusión se emplea en digestiones difíciles y tardías. Es aromática, vermífuga, excitante y emenagoga. Sus hojas y flores se utilizan en preparaciones antifebriles y para combatir parasitosis y afecciones bronquiales (Verettoni, 1985; Pastor de Abram y Zelada Mariluz, 2006).

**Actividad biológica:** Se ha informado moderada actividad antibacterial de su extracto clorofórmico (Bardon y col., 2007). Su extracto metanólico ha mostrado actividad insecticida significativa (Broussalis y col., 1999).

**Inhibición de ACE:** el valor de  $IC_{50}$  del extracto etanólico fue de 0,12 mg/ml, demostrando buena actividad inhibitoria de ACE.

- ***Grahamia bracteata* Hook & Arn. (Anacampserotaceae)**

**Sinónimos:** no posee.

**Nombre vulgar:** “vinagrillo”.

**Status:** endémica.

**Descripción botánica y distribución:**

Planta leñosa, apoyante, generalmente de 20-60 cm de altura. Hojas alternas, carnosas, cilíndricas, caducas en invierno, pelos estipulares persistentes. Tallos trepadores, apoyándose en otros arbustos, y poseen la particularidad de emitir raíces al ponerse en contacto con el suelo arraigando en el mismo. Flores terminales, solitarias, largamente pecioladas, grandes y muy vistosas, rodeadas por brácteas membranáceas, imbricadas. Corola con 5 pétalos blancos que al marchitarse se tornan rosados. Estambres numerosos, alrededor de 40 con filamentos rojizos y anteras amarillo-anaranjadas. Estigma profundamente 5-fido, blanco-crema. Fruto cápsula 4-5 valvada, con muchas semillas. En la Argentina crece preferentemente en lugares secos y salitrosos. También en los salitrales costeros de Bahía Blanca (Lamberto y col., 1997).



**Composición química:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Usos etnomedicinales:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Actividad biológica:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Inhibición de ACE:** la actividad del extracto etanólico se considera de moderada a baja con un valor de  $IC_{50}$  de 1,29 mg/ml.

- ***Habranthus jamesonii* (Baker) Ravenna (Amaryllidaceae)**

**Sinónimos:** *Amaryllis jamesonii* (Baker) Traub & Uphof, *Habranthus melanopotamicus* (Speg.) Fabris, *Hippeastrum jamesonii* Baker, *Zephyranthes melanopotamica* Speg., *Rhodophiala jamesonii* (Baker) Traub & Uphof.

**Nombre vulgar:** “cebolla del zorro”.

**Status:** endémica.

**Descripción botánica y distribución:** geófito

estival, raíces subcarnosas, bulbos ovoideos, oscuros, de 40-45 mm de diámetro. Hojas lineares de 20-30 cm de largo algo carnosas. Escapo carnoso del mismo largo de las hojas 1-2 (3-4) floro. Espata única membranosa de 4-6 cm de longitud; perigonio ligeramente zigomorfo de 4,5-5 cm de longitud, tépalos blancos con uña y línea externa verdosa. Habita en el sur de la Argentina. En la provincia de Buenos Aires se halla desde Bahía Blanca al sur, en dunas o en matorrales de quenopodiáceas. Florece en primavera (Lamberto y col., 1997).



**Composición química:** en los bulbos de ejemplares de la especie de las provincias de Mendoza y San Juan se han identificado de alcaloides isoquinolínicos mediante CG-EM (Ortiz y col., 2012).

**Usos etnomedicinales:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Actividad biológica:** Su extracto básico clorofórmico ha presentado actividad inhibitoria de ACE (Ortiz y col., 2012).

**Inhibición de ACE:** tanto el extracto etanólico de bulbos como el de partes aéreas demostraron una potente actividad inhibitoria de ACE con valores de IC<sub>50</sub> de 34,4 y 29,6 µg/ml respectivamente.

- ***Heterostachys olivascens* (Speg.) Speg (Chenopodiaceae)**

**Sinónimos:** *Spirostachys olivascens* Speg., *Heterostachys olivascens* (Speg.) Molino, comb. superfl.

**Nombre vulgar:** “jume”.

**Status:** endémica.

**Descripción botánica y distribución:**

Arbusto muy ramoso de 25 a 75 cm de altura. Ramas alternas con pocas hojas. Hojas muy reducidas, escumiformes, verde oscuro, hemiamplexicaules, alternas, tempranamente caedizas. Flores pequeñas, solitarias en las axilas de brácteas carnosas, formando espigas estrabiláceas, alternas, elipsoide-globosas, de 5 mm de largo por 3 mm de diámetro. Brácteas alternas, triangular-ovadas, ápice agudo, a veces redondeadas, también caedizo. Cáliz membranáceo, ovoideo-orbicular con ápice 3-hendido. Un solo estambre lateral. Ovario comprimido. Habita en suelos salitrosos del litoral marítimo del sur de Buenos Aires y Río Negro (Lamberto y col., 1997).



**Composición química:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Usos etnomedicinales:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Actividad biológica:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Inhibición de ACE:** el extracto etanólico demostró una inhibición de ACE moderada con un valor de inhibición de 35% a 1 mg/ml.

- ***Hyalis argentea* D. Don ex Hook. & Arn. var. *argentea* (Asteraceae)**

**Sinónimos:** *Plazia argentea* (D. Don ex Hook. & Arn.) Kuntze.

**Nombre vulgar:** “olivillo”, “olivo”, “blanquilla”, “clavelillo”.

**Status:** endémica.

**Descripción botánica y distribución:** subarbusto de hasta 1 m de altura. Tallos erectos, estriados. Hojas alternas, sésiles, lanceoladas de hasta 12 cm de longitud. Capítulos numerosos y terminales. Flores violáceas. Fruto oblancheolado con papus, formado por cerdas blancas. Presente en América Austral en médanos o pampas medanosas formando comunidades extensas (Lamberto y col., 1997).



**Composición química:** a partir de las partes aéreas de la planta se han aislado cuatro diterpenos pertenecientes a la clase de ent-kaurenos, tres guaianólidos, una cumarina y tres lactonas diterpénicas (Ybarra y col., 1996).

**Usos etnomedicinales:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Actividad biológica:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Inhibición de ACE:** la actividad demostrada por el extracto etanólico de las partes aéreas de esta especie puede considerarse buena con un valor de IC<sub>50</sub> 0,81 mg/ml.



- ***Jaborosa bergii* Hieron (Solanaceae)**

**Sinónimos:** no posee.

**Nombre vulgar:** “Flor de sapo”.

**Status:** endémica.

**Descripción botánica y distribución:**

Hierba perenne, rizomatosa. Tallos rastreros muy ramificados, costados, cortamente pubescentes. Hojas opuestas o fasciculadas, profundamente pinnatisectas, de contorno oblanceolado, con segmentos dentados. Flores hermafroditas, actinomorfas. Corola tubulosa blanca, algo pubescente, pentadentada, de 6-8 mm de longitud. Estambres 5. Ovario súpero, bicarpelar. Fruto baya globosa, pluriseminada, de 6-7 mm de diámetro. Habita en el sur de la provincia fitogeográfica del monte, desde San Luis hasta Río Negro. No muy frecuente en la zona de Bahía Blanca, hallándose en suelos húmedos (Lamberto y col., 1997).



**Composición química:** se han aislado distintos whitanólidos a partir de las partes aéreas de la planta (Monteagudo y col., 1988; Nicotra y col., 2003).

**Usos etnomedicinales:** se le atribuyen propiedades narcóticas. Es venenosa (Verettoni, 1985).

**Actividad biológica:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Inhibición de ACE:** el valor de IC<sub>50</sub> del extracto etanólico fue de 0,06 mg/ml, demostrando una potente actividad inhibitoria de ACE.

- ***Lippia salsa* Griseb. (Verbenaceae)**

**Sinónimos:** no posee.

**Nombre vulgar:** “yerba del guanaco”, “yerba del ciervo”.

**Descripción botánica y distribución:**

Arbusto leñoso, ramas tetragonas. Hojas sésiles, de 1,9 x 0,8-1 cm, ovadas u oblongas, base obtusa, coriáceas. Los 4-6 nudos apicales fértiles, espigas capituliformes ca. 1 cm, pedúnculos de 0,5 cm; brácteas ca 4 mm, ovadas, acuminadas, las exteriores lobuladas; cáliz de 3 mm, tubuloso, sépalos soldados hasta la parte media, pubescente, persistente; corola blanca, tubo de unos 5 mm, lóbulos ca. 2 mm. Clusas de 2,5-3 mm, cara adaxial plana, cara abaxial convexa, ambas superficies lisas, zona apical adelgazándose, papilosa. Esta especie es endémica de la provincia del monte (Múlgura y col., 2003).



**Composición química:** se ha estudiado la composición del aceite esencial de la especie, pudiéndose identificar sólo un 20 % del mismo (Juliani y col., 2002).

**Usos etnomedicinales:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Actividad biológica:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Inhibición de ACE:** el valor de IC<sub>50</sub> del extracto etanólico fue de 0,83 mg/ml, por lo tanto se considera actividad de moderada a buena.

- ***Oxybasis macrosperma* (Hook. f.) S. Fuentes, Uotila & Borsch (Chenopodiaceae)**

**Sinónimos:** *Chenopodium halophilum* Phil., *Chenopodium macrospermum* Hook. f.f. subviride, *Blitum rubrum* (L.) C.A.Mey. var. *vulgaris*, *Chenopodium rubrum* L. var. *vulgaris*, *Chenopodium macrospermum* Hook. f. ssp. *macrospermum*,



*Chenopodium macrospermum* Hook. f. ssp. *crassicaule* (Moq.) Aellen, *Blitum rubrum* (L.) C.A.Mey. var. *crassicaule*, *Blitum rubrum* (L.) C.A.Mey. var. *macrosperma*, *Chenopodium rubrum* auct. non. L., *Chenopodium macrospermum* Hook. f. ssp. *salsum* (Phil.) A. Troncoso, *Blitum salsum* Phil., *Chenopodium halophilum* auct. non Phil., *Chenopodium macrospermum* Hook. f. ssp. *halophilum* (Phil.) Aellen, *Chenopodium macrospermum* Hook. f. var. *halophilum*.

**Nombre vulgar:** “quina”.

**Status:** nativa.

**Descripción botánica y distribución:** hierba anual, no aromática, más o menos glabra. Tallo erecto o ascendente, ramificado. Hojas alternas, pecioladas, algo carnosas, triangulares. Inflorescencia axilar y terminal, generalmente bracteada. Flores dimorfas, hermafroditas. Fruto con pericarpio membranoso libre o ligeramente unido a la semilla. Crece en las provincias de Chubut, Río Negro, Santa Cruz y Tierra del Fuego, y en sur de la provincia de Buenos Aires (Fuentes-Bazán y col., 2012). También se la puede encontrar en Chile, Uruguay y Paraguay (Zuloaga, 2008).

**Composición química:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Usos etnomedicinales:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Actividad biológica:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Inhibición de ACE:** se ha observado una actividad moderada con un porcentaje de inhibición de 44,2% a una concentración de 1 mg/ml para el extracto etanólico.

- ***Pseudognaphalium leucopeplum* (Cabrera) Anderb. (Asteraceae)**

**Sinónimos:** *Gnaphalium leucopeplum* Cabrera.

**Nombre vulgar:** no posee.

**Status:** nativa.

**Descripción botánica y distribución:** hierba perenne, erecta, de 40-100 cm de altura, con tallos simples o ramificados en la parte superior, densamente blanco-tomentosos, hojosos hasta la inflorescencia. Hojas alternas, oblanceolado-lineales, decurrentes en la base, densamente albotomentosas en ambas caras y sin pelos glandulosos, de 4-14 cm de largo por 4-12 mm de ancho. Capítulos numerosos, sésiles o casi sésiles, aglomerados en el ápice de los tallos. Involucro de 5-6 mm de altura, formado por bráctetas dispuestas en 4-5 series, hialinas, pajizas o blanquecinas. Receptáculo desnudo. Flores dimorfas: las marginales femeninas, filiformes, numerosas; las del disco hermafroditas, tubulosas, pocas. Androceo formado por cinco estambres insertos en el tubo de la corola, con filamentos libres y anteras sagitadas en la base y soldadas entre sí por sus bordes. Gineceo con ovario ínfero, bicarpelar, unilocular y uniovulado, con estilo simple, bífido en el ápice. Aquenios glabros, con pappus blanquecino, formado por pelos no soldados en la base. Se encuentra en Uruguay y Argentina en suelos rocosos o arenosos (Lamberto y col., 1997).



**Composición química:** se ha estudiado la composición del aceite esencial de la especie, identificando 25 compuestos, siendo el (*E*)-nerolidol y el ácido dodecanoico los componentes mayoritarios (Niemeyer y col., 2009).

**Usos etnomedicinales:** como depurativo, diaforético y anticatarral (Verettoni, 1985).

**Actividad biológica:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Inhibición de ACE:** el valor de IC<sub>50</sub> del extracto etanólico fue de 0,37 mg/ml, lo cual indicó que la inhibición de ACE fue significativa.

- ***Salsola kali* L. var. *kali* (Chenopodiaceae)**

**Sinónimos:** no posee.

**Nombre vulgar:** “cardo ruso”, “ardo del diablo”.

**Status:** adventicia.

**Descripción botánica y distribución:** Herbácea anual, glabra o hirsuta, muy ramificada, dándole a la planta un aspecto globoso, de hasta 1 m de altura. Hojas alternas, carnosas, siendo las inferiores largas y filamentosas, terminadas en el ápice en una punta rígida y punzante. Hojas florales más cortas, generalmente casi triangulares con márgenes blanco-escariosos, con base ensanchada y agudas en el ápice, punzante. Flores hermafroditas, bibracteadas, solitarias o unidas de a 2 ó 3 en las axilas de las hojas superiores, aunque una sola de estas flores produce semilla. Brácteas oval-lanceoladas poco más largas que el cáliz, terminadas en una espina. Sépalos 5 de forma oval, apenas unidos en la base, cartilagosos a la madurez, presentando apéndices transversales en forma de alas membranosas o pestañas cartilaginosas. Androceo con 5 estambres. Fruto rodeado por las piezas del cáliz. Es una especie cosmopolita. En las provincias de Mendoza, San Luis, La Pampa, Río Negro, Neuquén, Chubut y en el sur y oeste de la provincia de Buenos Aires es pionera en la colonización de médanos. También es invasora de cultivos (Lamberto y col., 1997).



**Composición química:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Usos etnomedicinales:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Actividad biológica:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Inhibición de ACE:** el extracto etanólico de las partes aéreas posee una actividad baja con un IC<sub>50</sub> mucho mayor a 1 mg/ml (inhibición de 24% a 1 mg/ml).

- ***Sarcocornia perennis* (Mill.) A.J.Scott (Chenopodiaceae)**

**Sinónimos:** *Salicornia ambigua* Michx., *Salicornia bergii* Lorentz & Niederl., *Salicornia corticosa* (Meyen) Walp. var. *nachtigallii* Niederl., *Salicornia doeringii* Lorentz & Niederl., *Salicornia fruticosa* (L.) L. var. *doeringii* (Lorentz & Niederl.) Speg., *Salicornia magellanica* Phil., *Salicornia perennis* Mill., *Salicornia peruviana* Kunth var. *doeringii* (Lorentz & Niederl.) Reiche.



**Nombre vulgar:** “jume”, “cuernito salado”.

**Status:** introducida.

**Descripción botánica y distribución:** subarbusto introducido, carnoso de hasta 80 cm de altura, de tallos erguidos. Las hojas son opuestas, soldadas entre sí por los bordes y al tallo, con la parte superior libre. Habita en las costas marinas y en los suelos salinos. Se distribuye desde el noroeste de Argentina hasta Tierra del Fuego y los países limítrofes de Chile y Uruguay.

**Composición química:** se ha comprobado la presencia de ácido ascórbico en la planta entera (Hagene y col., 1958).

**Usos etnomedicinales:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Actividad biológica:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Inhibición de ACE:** se determinó actividad inhibitoria casi nula para las partes aéreas de esta especie con un 18% de inhibición de ACE a 1 mg/ml para el extracto etanólico.

- ***Suaeda divaricata* Moq. (Chenopodiaceae)**

**Sinónimos:** *Lerchea divaricata* (Moq.) Speg.,  
*Salsola mendocinensis* Gill.

**Nombre vulgar:** “vidriera”.

**Status:** nativa.

**Descripción botánica y distribución:** Planta arbustiva perenne, dioica, con ramas divergentes y una altura que varía de 1 a 3 m. Hojas semicilíndricas con las bases atenuadas, las inferiores de hasta 5 cm de largo y 1 cm las superiores, se disponen espaciadas y formando ángulos abiertos con el tallo. Flores agrupadas de 3-5, sésiles en las axilas de las hojas, las masculinas con 5 estambres y gineceo atrofiado, las femeninas más pequeñas que las masculinas. Cáliz con 5 sépalos, soldados en la base. Fruto rodeado por el cáliz carnosos. Semilla vertical. Vive en suelos salobres, en las provincias patagónicas y centrales, desde Chubut hasta Jujuy. No es abundante en el sur de la provincia de Buenos Aires (Lamberto y col., 1997).



**Composición química:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Usos etnomedicinales:** la planta entera es empleada como antiofídico en el norte de Argentina (Barboza y col., 2006).

**Actividad biológica:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Inhibición de ACE:** la actividad del extracto etanólico de las partes aéreas fue significativa con un 45% de inhibición a una concentración de 1 mg/ml.

Luego de la búsqueda bibliográfica actualizada de cada una de las especies, se evaluaron los datos preliminares de inhibición de ACE a fin de seleccionar aquellas especies que no sólo presentaran actividad significativa sino que además, no hubieran

sido estudiadas previamente o que fuesen fuente potencial de metabolitos secundarios con estructuras novedosas, y que resultaran abundantes con el propósito de obtener material suficiente para llevar a cabo el trabajo. Considerando lo anterior, se seleccionaron las especies *Habranthus jamesonii*, *Allenrolfea patagonica*, *Heterostachys olivascens*, *Flaveria bidentis* y *Lippia salsa*. El estudio se enfocó en su actividad inhibitoria de colinesterasa y en los metabolitos responsables de la actividad detectada.

Adicionalmente, durante el desarrollo de la tesis, se decidió continuar un trabajo previo y seleccionar la especie *Habranthus tubispathus* como objeto de estudio. Su descripción botánica, fitoquímica, de usos etnomedicinales y actividades biológicas testeadas hasta el momento también se presenta en esta sección.

- ***Habranthus tubispathus* (L'Hér.) Traub (Amaryllidaceae)**

**Sinónimos:** *Amaryllis andersonii* (Herb. Ex Lindl.) Griseb, *Amaryllis tubispatha* L'Hér., *Habranthus andersonii* Herb. ex Lindl., *Habranthus andersonii* Herb. ex Lindl. var. *texanus*, *Habranthus tubispathus* (L'Hér) Traub ssp. *macranthus* Ravenna, *Habranthus tubispathus* (L'Hér.) Traub ssp. *variabilis*



Ravenna, *Habranthus variabilis* (Ravenna) Ravenna, *Habranthus variabilis* (Ravenna) Ravenna var. *bicolor*, *Habranthus variabilis* (Ravenna) Ravenna var. *roseus*, *Hippeastrum tubispathum* (L'Hér.) Baker, *Zephyranthes andersonii* (Herb. ex Lindl.) Benth. & Hook. f., *Zephyranthes commersoniana* Herb., *Habranthus tubispathus* (L'Hér) Traub f. *bicolor*, *Habranthus tubispathus* (L'Hér.) Traub f. *roseus*.

**Nombre vulgar:** “flor anaranjada”.

**Status:** nativa.



**Descripción botánica y distribución:** hierba bulbífera, bulbo ovoideo o subesférico de 2-2,5 cm de diámetro. Hojas pocas basales de 12-15 cm, posteriores a la floración. Escapo unifloro de 6-15 cm de longitud rojizo. Espata única de 2-3 cm de largo, bífida en el ápice; perigonio anaranjado, amarillo o amarillento, de 3-3,5 cm de largo, tépalos unidos en la base. Fruto cápsula esférica deprimida, trilobulada de 1 cm de diámetro. Se la encuentra comúnmente en la estepa clímax y en las sierras bonaerenses; florece en verano durante un día (Lamberto y col., 1997).

**Composición química:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Usos etnomedicinales:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Actividad biológica:** no se hallaron antecedentes en bibliografía.

**Inhibición de ACE:** su extracto etanólico demostró buena inhibición de ACE con un 58% de inhibición a una concentración de 1 mg/ml.

Los resultados obtenidos se encuentran divididos según las familias de plantas estudiadas. En cada parte se hallará una breve introducción, los resultados obtenidos, una discusión de los mismos y una conclusión parcial.

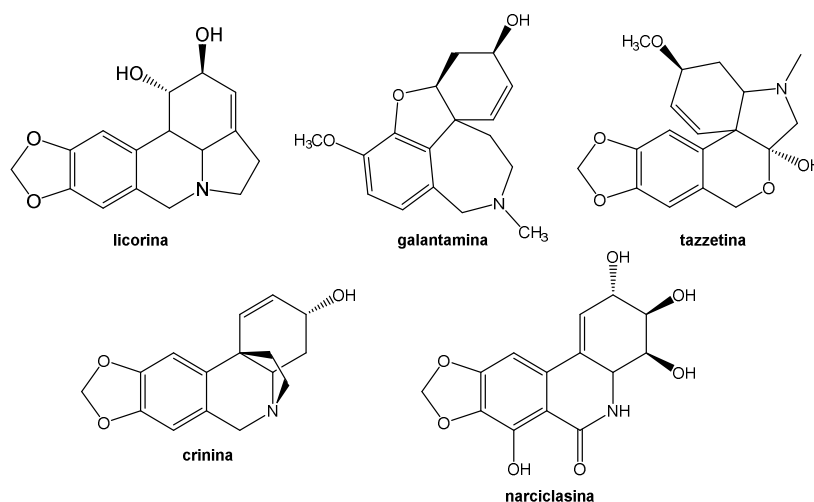
### **III.2 Familia Amaryllidaceae**

Las amarilidáceas son una familia de plantas bulbosas compuesta por alrededor de 1100 especies en todo el mundo, ubicadas en regiones tropicales y subtropicales, con tres centros principales de distribución: América del Sur, sur de África y región mediterránea de Europa y norte de África (Meerow y col., 1998).

Por muchos años, no sólo han sido cultivadas como plantas ornamentales por sus flores coloridas y exquisitos perfumes, sino que también han sido utilizadas ampliamente como medicinas tradicionales y como alimentos en distintos lugares del mundo.

Una característica particular de las amarilidáceas es la presencia de un grupo de alcaloides isoquinolínicos, llamados comúnmente alcaloides de Amaryllidaceae (AAm). Debido a que éstos se encuentran casi únicamente en esta familia de plantas, tienen una considerable importancia quimiotaxonómica. Su característica común es la presencia de un sistema de anillos compuesto por una unidad C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> derivada del aminoácido fenilalanina y una unidad N-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> derivada del aminoácido tirosina. Estos alcaloides se clasifican en grupos de acuerdo a su esqueleto principal y se nombran según un alcaloide representativo del mismo. Los subgrupos más conocidos incluyen los del tipo licorina, galantamina, tazzetina, crinina y narciclasina (Figura 22). Desafortunadamente, no existe consenso con respecto a la cantidad de subgrupos y sus nombres. A medida que el número de AAm aumenta, se descubren nuevas estructuras y la preferencia por una categorización particular se ve influenciada por el tipo de especie estudiada.

Hasta el momento, se han aislado alrededor de 500 alcaloides de plantas pertenecientes a esta familia (Jin y col., 2013), los cuales han llamado la atención de la comunidad científica principalmente por el uso clínico de galantamina como inhibidor de colinesterasa en el tratamiento sintomático de la EA.



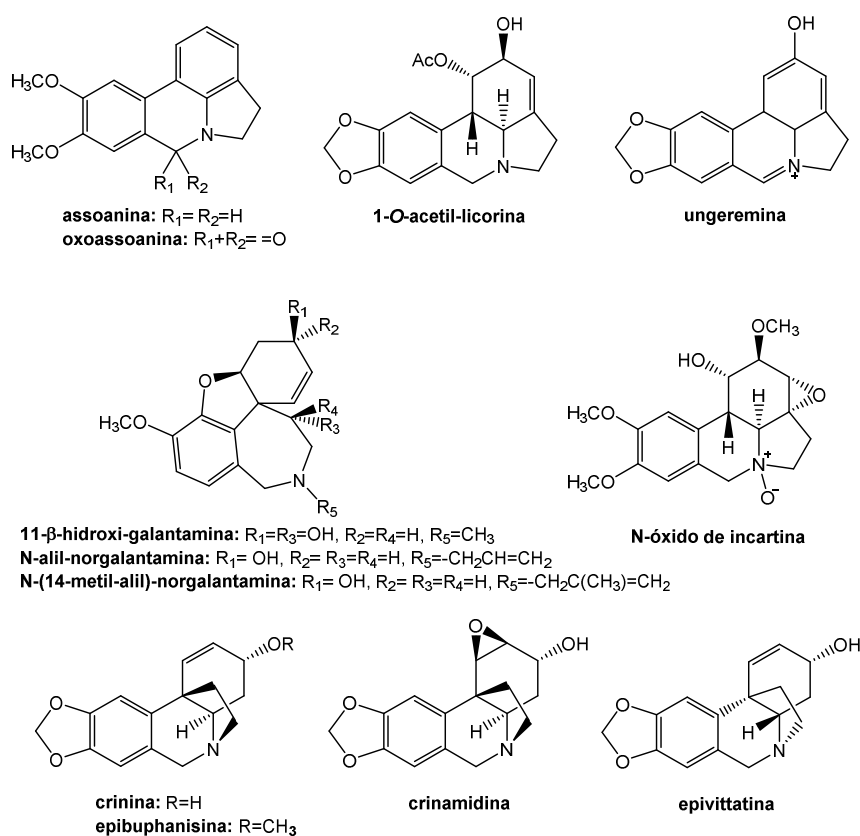
**Figura 22:** Clasificación de AAm.

En cuanto a la actividad inhibitoria de ACE, los compuestos más activos, con valores de  $IC_{50}$  cercanos a  $10^{-6}$  M, son aquellos con esqueleto tipo galantamina (Figura 23). Pueden mencionarse dentro de este subgrupo 11- $\beta$ -hidroxigalantamina con un  $IC_{50}$  de 14,5  $\mu$ M y los derivados *N*-alquilados, *N*-alil-norgalantamina y *N*-(14-metilalil)-norgalantamina con valores de  $IC_{50}$  de 0,18  $\mu$ M y 0,16  $\mu$ M respectivamente, resultando diez veces más potentes que galantamina (Murray y col., 2013). Estudios de relación estructura-actividad *in vitro* de análogos sintéticos de galantamina, indican que grupos hidrofílicos propiamente ubicados en la estructura de galantamina contribuyen a su unión efectiva a la enzima ACE favoreciendo su inhibición (Bores y col., 1996).

Entre las otras subclases de AAm, los inhibidores que siguen en potencia parecen pertenecer al tipo licorina (Figura 23). Assoanina ( $IC_{50}$ =3,87  $\mu$ M), oxoassoanina ( $IC_{50}$ =47,2  $\mu$ M) y 1-*O*-acetil-licorina ( $IC_{50}$ =0,92  $\mu$ M), son inhibidores importantes y su potencia se atribuye a la presencia de un anillo aromático C, para assoanina y oxoassoanina, y a los sustituyentes acetilo e hidroxilo unidos a C-1 y C-2 de 1-*O*-acetillicorina. Ungeremina, un alcaloide tipo licorina con nitrógeno cuaternario y anillo C aromático, demostró un  $IC_{50}$  de 0,35  $\mu$ M. El átomo de nitrógeno cuaternario resulta importante para una unión apropiada e inhibición de la enzima, también demostrado en otros alcaloides como berberina. Además, los grupos epoxi y metilo presentes en el

*N*-óxido de incartina ( $IC_{50}=34,5 \mu M$ ) también favorecen la inhibición de ACE dentro de este grupo (Konrath y col, 2013).

Dentro de los otros subgrupos estructurales en general se observa menor actividad inhibitoria de ACE con valores cercanos a  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  M. Varios alcaloides tipo crinina (Figura 23) han sido aislados de plantas de la familia Amarillydaceae y evaluados por su actividad antiACE como crinina ( $IC_{50}= 461 \mu M$ ), epibufanisina ( $IC_{50}= 547 \mu M$ ), crinamidina ( $IC_{50}= 300 \mu M$ ), epivittatina ( $IC_{50}= 239 \mu M$ ), entre otros, mostrando actividad casi nula (Adewusi y col., 2012) (Figura 23).



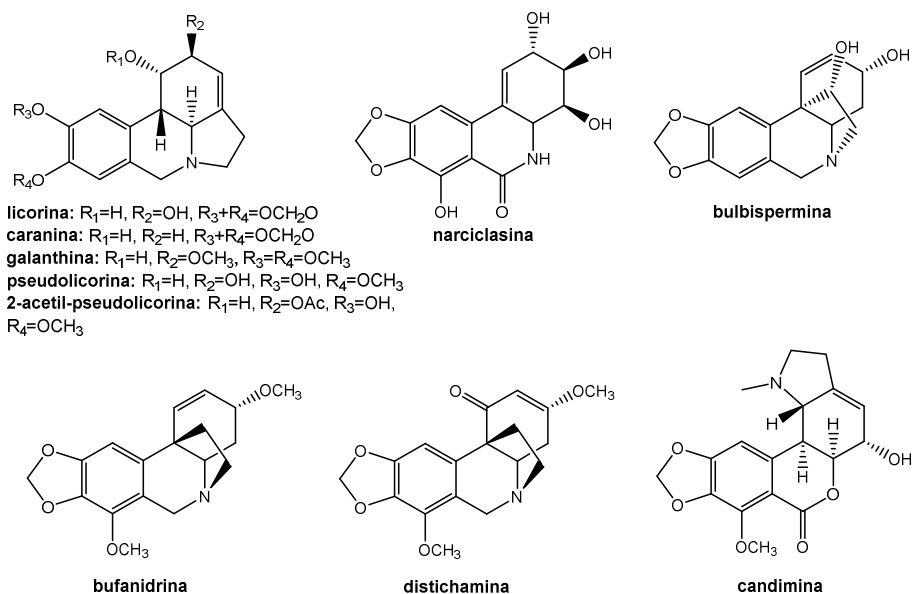
**Figura 23:** AAm con actividad inhibitoria de ACE.

Además de actividad inhibitoria de ACE, se han descrito otras actividades farmacológicas para este tipo de compuestos. Entre ellas, una de las más destacadas es la actividad anticáncer. Se ha demostrado, que licorina es un inhibidor potente de la biosíntesis del ácido ascórbico así como también del crecimiento y división celular,

incluyendo actividad antitumoral en líneas celulares humanas y animales (Wang y col., 2014). Otros alcaloides de este tipo, como caranina, galantina, pseudolicorina y 2-acetilpseudolicorina (Figura 24) también se han encontrado activos frente a una gran variedad de líneas celulares cancerígenas (Tako y col., 2013). Narciclasina (Figura 24) está demostrando efectos anticáncer muy promisorios frente al glioblastoma multiforme humano (GBM) en modelos animales preclínicos (Lefranc y col., 2009). Este tipo de tumor cerebral maligno se caracteriza por invasión agresiva de tejidos cerebrales normales y resistencia a las terapias convencionales que desencadenan la apoptosis. Narciclasina deteriora el crecimiento de tumores de GBM y extiende significativamente el tiempo de vida de ratones infectados. Estos experimentos también demostraron la habilidad de narciclasina de cruzar la barrera hematoencefálica, una característica que usualmente carecen muchos compuestos activos. Más recientemente, se ha evidenciado actividad citostática de un alcaloide tipo crinina, bulbispermina (Figura 24), frente a un panel de líneas celulares de cáncer cerebral resistentes a la apoptosis (Tako y col., 2013). Entre otras actividades testeadas para los AAm, pueden destacarse los alcaloides bufanidrina y distichamina (Figura 24) con actividad antibacterial de amplio espectro frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Candimina y una serie de derivados de licorina (Figura 24) han mostrado importante actividad frente al parásito *Trichomonas vaginalis* (Jin, 2013).

Entre las amarilidáceas que han sido citadas en nuestro país se encuentran los géneros *Amaryllis*, *Brunsvigia*, *Chlidanthus*, *Clinanthus*, *Crinum*, *Eithea*, *Famatina*, *Habranthus*, *Hieronymiella*, *Hippeastrum*, *Phycella*, *Placea*, *Pyrolirion*, *Rhodophiala*, *Traubia* y *Zephyranthes*, con un total de 124 especies presentes en el territorio argentino (Zuloaga y col., 2008).

El género *Habranthus* en particular, se encuentra representado por 30 especies (Hunziker y col., 1984; Ravenna, 1988; Arroyo-Leuenberger, 1996; Rotman y col., 2006) de las cuales, *Habranthus tubispathus* (L'Her) Traub y *Habranthus jamesonii* (Baker) Ravenna son las únicas presentes en el sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Lamberto y col., 1997).



**Figura 24:** AAm con otras actividades biológicas.

La especie *H. jamesonii* del Salitral de la Vidriera fue elegida para este trabajo de tesis en base a la actividad inhibitoria de ACE observada para su extracto etanólico en un ensayo preliminar. El hecho de que existiera previamente un trabajo realizado por Ortiz y colaboradores (Ortiz y col., 2012), en donde se observan diferencias significativas en la actividad inhibitoria de ACE y composición de alcaloides entre ejemplares de la especie recolectados en dos lugares geográficos distintos de nuestro país, nos alentó en su elección, para determinar si la población de *H. jamesonii* del sudoeste de la provincia de Buenos Aires también presentaba diferencias en la producción de metabolitos secundarios debido a su crecimiento en condiciones de estrés en una zona de alta salinidad.

La especie *H. tubispathus*, que había sido objeto de estudio durante un trabajo previo (Cavallaro, 2010), y de la cual sólo había sido posible el aislamiento del alcaloide mayoritario licorina, se retomó a partir de la investigación de *H. jamesonii*. Esto permitió concluir la identificación de la composición de alcaloides de esta especie y completar el estudio del género presente en el sudoeste de la provincia de Buenos Aires, aunque la misma no se haya detectado en el Salitral de la Vidriera, zona de estudio de este trabajo de tesis.

A continuación, se describe el estudio de los metabolitos secundarios inhibidores de colinesterasa realizado para las especies *H. jamesonii* y *H. tubispathus* de la zona de Bahía Blanca.

### **III.2.1 Alcaloides presentes en *H. jamesonii* y su actividad inhibitoria de colinesterasa**

#### **III.2.1.1 Aislamiento bioguiado**

Considerando los antecedentes bibliográficos de alcaloides como inhibidores de colinesterasa en especies de amarilidáceas (Houghton y col., 2004; Pagliosa y col., 2010; Cahliková y col., 2011; Konrath y col., 2013), se asumió que la actividad observada en el extracto etanólico de *H. jamesonii* se debía principalmente a la presencia de los mismos. Por el hecho de contar con material suficiente y tratando de aportar mayor información a la ya publicada sobre la especie, se decidió estudiar bulbos y partes aéreas por separado.

Se procedió entonces a realizar una extracción ácido-base para alcaloides de cada una de las partes por separado. Los extractos etanólicos obtenidos de los bulbos (EE<sub>b</sub>) y partes aéreas (EE<sub>pa</sub>) de la planta fresca fueron suspendidos en HCl, filtrados, basificados hasta pH 9 con NaHCO<sub>3</sub> y extraídos sucesivamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dando origen a los extractos de alcaloides de bulbos (EA<sub>b</sub>) y partes aéreas (EA<sub>pa</sub>) respectivamente. La presencia de alcaloides tanto en los extractos etanólicos como en los extractos de

alcaloides fue detectada mediante TLC utilizando el reactivo de Dragendorff como agente revelador. La cuantificación de la actividad inhibitoria de colinesterasa se realizó mediante el método de Ellman, obteniendo los valores que se muestran a continuación (Tabla 1).

**Tabla 1:** Inhibición de ACE y BuCE de extractos de *H. jamesonii*.

Muestra	IC <sub>50</sub>	
	ACE <sup>a</sup>	BuCE <sup>a</sup>
EE <sub>b</sub>	34,4 µg/ml	> 2,5 mg/ml
EE <sub>pa</sub>	29,6 µg/ml	> 2,5 mg/ml
EA <sub>b</sub>	1,3 µg/ml	20,8 µg/ml
EA <sub>pa</sub>	0,7 µg/ml	6,7 µg/ml
<b>Tacrina<sup>b</sup></b>	29,4 nM	3,80 nM

<sup>a</sup> los resultados son la media de tres réplicas independientes.

<sup>b</sup> inhibidor de referencia.

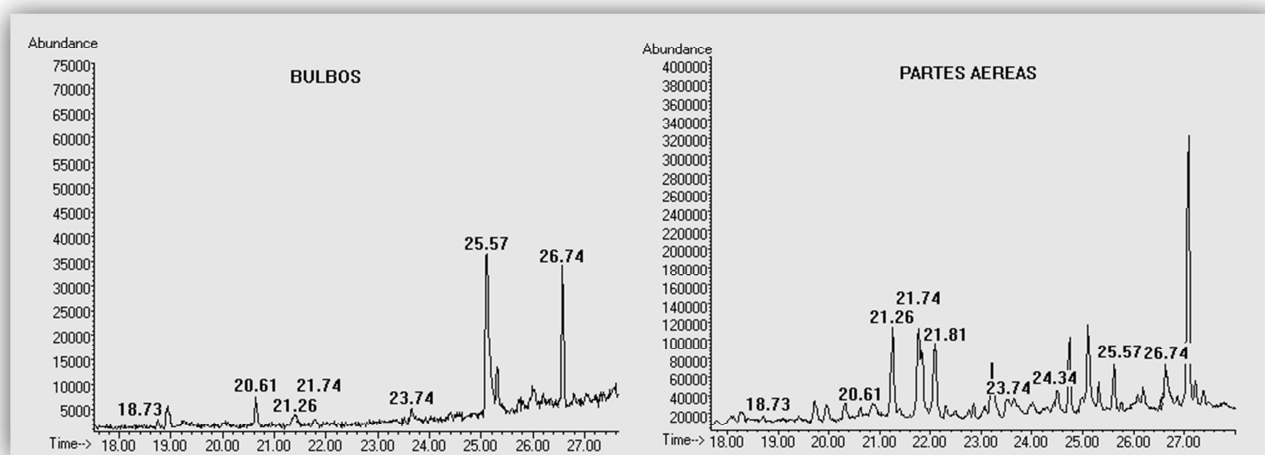
Los EAs presentaron una importante inhibición tanto de ACE como de BuCE confirmando la hipótesis de que los AAm son los responsables de la actividad observada.

Alentados por los excelentes resultados de Kreh y colaboradores, se decidió someter a los extractos de alcaloides, sin derivatización previa, al análisis por CG-EM (Kreh y col., 1995). Estos autores informan que el patrón de fragmentación característico de los diferentes grupos estructurales de AAm y la alta sensibilidad de la CG-EM permiten una rápida identificación, aún de componentes minoritarios, en una mezcla de AAm dejando de lado los laboriosos procedimientos de aislamiento. También demostraron que la derivatización de los AAm, en la mayoría de los casos, no mejora la separación por CG.

Todos los alcaloides presentes en los extractos de *H. Jamesonii* excepto uno, fueron identificados al comparar sus espectros de masa con aquellos hallados en



literatura o bien en la base de datos del espectrómetro (Figura 25). En principio, el pico del cromatograma con  $t_r=23,74$  min no pudo ser identificado mediante comparación de su espectro de masa. Los intentos por aislarlo del EA fueron fallidos debido a la poca cantidad de material con la que se contaba. Posteriormente, se lo identificó como hippeastidina (**6**), al aislarlo de la especie *H. tubispathus*. Los detalles de su aislamiento y elucidación estructural se especifican más adelante en esta tesis (Ver punto III.2.2).



**Figura 25:** Extractos de cromatogramas de los EA de *H. jamesonii*.

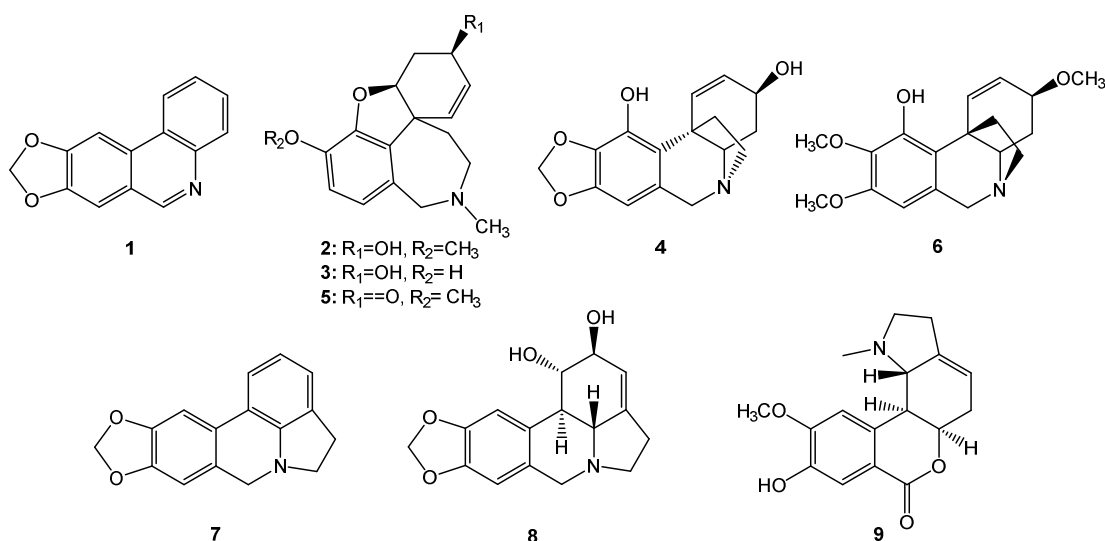
En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos, los picos característicos de cada alcaloide, así como su presencia en bulbos y/o partes aéreas.

Los alcaloides detectados tanto en bulbos como en partes aéreas de *H. Jamesonii* fueron: trisfaeredina (**1**), galantamina (**2**), sanguinina (**3**), vittatina (**4**), narwedina (**5**), hippeastidina (**6**) licorina (**8**) y 8-*O*-demetilhomolicorina (**9**) (Tabla 2, Figura 26). En las partes aéreas se identificó además anhidrolicorina (**7**). Estos alcaloides ya han sido identificados en distintas especies de amarilidáceas (Kreh y col., 1995, de Andrade y col., 2012).

**Tabla 2:** Datos de masa de alcaloides identificados en *H. jamesonii*.

Alcaloide	$t_R$ (min)	$M^+$ y $m/z$ (int. rel.)	Cant. relativa %		Referencia datos EM
			<i>bulbos</i>	<i>p.a.</i>	
<b>Trisfaeridina (1)</b>	18,73	223(100), 222(40), 167(15), 165(14), 164(20), 138(32)	< 1	< 1	<i>Berkov 2008</i>
<b>Galantamina (2)</b>	20,61	287(80), 286(100), 270(11), 244(19), 230(15), 216(37)	18,5	3,5	<i>Berkov 2008</i>
<b>Sanguinina (3)</b>	21,26	273(100), 272(85), 256(22), 202(41), 160(50)	10,9	21,9	<i>Berkov 2008</i>
<b>Vittatina (4)</b>	21,74	271(100), 252(29), 199(68), 187(65), 173(26)	< 1	20,6	<i>Berkov 2008</i>
<b>Narwedina (5)</b>	21,81	285(84), 284(100), 242(23), 228(12), 216(30), 199(27)	< 1	14,7	<i>Berkov 2008</i>
<b>Hippeastidina (6)</b>	23,74	319(100), 304(18), 288(39), 258(20), 233(84), 218(30), 206(27), 163(16), 115(14)	< 1	< 1	<i>Pacheco 1978</i>
<b>Anhidrolicorina (7)</b>	24,34	251(66), 250(100), 192(14), 191(15), 165(5), 164(3), 139(3), 124(4)	-	4,5	<i>de Andrade 2012</i>
<b>Licorina (8)</b>	25,57	287(23), 286(13), 268(20), 250(13), 227(63), 226 (100)	33,8	9,1	<i>Berkov 2008</i>
<b>8-O-demetilhomolicorina (9)</b>	26,74	301(-), 192(1), 164(5), 110(9), 109(100), 108(31), 94(6), 82(7)	29,8	22,8	<i>de Andrade 2012</i>

Es notable destacar que los perfiles de alcaloides difieren bastante entre los bulbos y las partes aéreas de *H. jamesonii*. Sanguinina, vitattina, narwedina, 8-*O*-demetilhomolicorina y licorina resultaron ser los alcaloides mayoritarios en las partes aéreas de *H. jamesonii*, mientras que los bulbos se encontraron enriquecidos en licorina, 8-*O*-demetilhomolicorina, galantamina y sanguinina.



**Figura 26:** Alcaloides identificados en *H. jamesonii*.

Se observan ciertas diferencias en las cantidades relativas de cada alcaloide en los extractos, por ejemplo, los alcaloides vittatina y narwedina, presentes sólo en trazas en los bulbos, se detectaron en altas proporciones en las partes aéreas. De modo similar, mientras que los bulbos de *H. jamesonii* resultaron ricos en galantamina y licorina, estos alcaloides fueron constituyentes minoritarios en las partes aéreas de la planta. Es interesante destacar que nuestros resultados difieren notablemente de aquellos obtenidos por Ortiz y colaboradores para los bulbos de *H. jamesonii* recolectados en las provincias de San Juan y Mendoza (Ortiz y col., 2012). Los resultados de este trabajo confirman el hecho que los contenidos de alcaloides dependen de la distribución geográfica de las poblaciones de *H. jamesonii*. La diferencia más importante, es quizás, los niveles más altos de galantamina y sanguinina detectados en los bulbos de los especímenes del Salitral de la Vidriera.

Diferencias en la composición química de alcaloides en poblaciones vegetales recolectadas en distintas zonas geográficas ya han sido reportadas por Berkov y colaboradores para especímenes de *Leucojum aestivum* en distintas zonas de Bulgaria (Berkov y col., 2013).

### **III.2.1.2 Actividad inhibitoria de alcaloides identificados en *H. jamesonii***

La importante actividad inhibitoria de ACE observada para los extractos de *H. Jamesonii* puede justificarse, principalmente, por la presencia de los compuestos **2** y **3**. Como se ha mencionado anteriormente, el alcaloide galantamina (**2**) ha demostrado una potente actividad inhibitoria de ACE con un  $IC_{50}= 1,07 \mu M$ , siendo uno de los medicamentos de uso actual para el tratamiento de la EA. Sanguinina (9-O-demetilgalantamina, **3**), aislada por primera vez de *Lycoris sanguinea* (Kobayashi y col., 1976), es un inhibidor diez veces más potente que **2**, con un  $IC_{50}=0,10 \mu M$ . La mayor proporción de sanguinina en las partes aéreas de la planta, puede explicar la mejor actividad observada de este extracto con respecto al de bulbos (Tabla 1).

La estructura cristalina de galantamina unida al sitio activo de TcACE demostró que su fuerte unión se debe a la suma de varias interacciones, de moderadas a débiles, incluyendo enlaces puente de hidrógeno (Greemblat y col., 1999). En consecuencia, el grupo hidroxilo extra de sanguinina, disponible para potenciales interacciones con ACE, puede explicar la importante actividad de este alcaloide.

De los demás alcaloides identificados en los extractos, sólo hippeastidina (**6**) y licorina (**8**) son activos, siendo su actividad de moderada a baja, y por lo tanto su contribución a la actividad total, mínima en comparación con **2** y **3**.

Hasta el desarrollo de esta tesis, no se han encontrado estudios de actividad inhibitoria de colinesterasa (ACE o BuCE) para el resto de los alcaloides presentes en *H. jamesonii*.

### III.2.2 Identificación de compuestos activos en *H. tubispathus*

A modo comparativo, se siguió el mismo procedimiento descrito para *H. jamesonii*. Se realizó un extracto etanólico de bulbos y una extracción ácido-base para alcaloides, obteniendo así un extracto crudo de alcaloides (AE). Los resultados de la cuantificación de la actividad inhibitoria de ACE y BuCE para los extractos se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Inhibición de ACE y BuCE de extractos de *H. tubispathus*.

Muestra	IC <sub>50</sub>	
	ACE <sup>a</sup>	BuCE <sup>a</sup>
EE	0,9 mg/ml	> 1 mg/ml
EA	12,5 µg/ml	62,8 µg/ml
Tacrina <sup>b</sup>	29,4 nM	3,80 nM

<sup>a</sup> los resultados son la media de tres réplicas independientes.

<sup>b</sup> inhibidor de referencia.

Utilizando las mismas condiciones que en el caso anterior para el análisis por CG-EM pudieron detectarse nueve alcaloides, siete de los cuales fueron claramente identificados mediante comparación de sus espectros de masa con aquellos encontrados en literatura o en la base de datos del espectrómetro (Figura 27). Estos fueron: maritidina (**10**), montanina (**11**), haemanthamina (**12**), tazzetina (**13**), haemanthidina (**14**), licorina (**8**) y pseudolicorina (**15**) (Figura 28). Su presencia en especies de la familia Amaryllidaceae ya ha sido informada por otros autores (Kreh y col., 1995; de Andrade y col., 2012). Las estructuras de los alcaloides identificados y sus datos de espectrometría de masas se encuentran en la Figura 28 y Tabla 4, respectivamente.

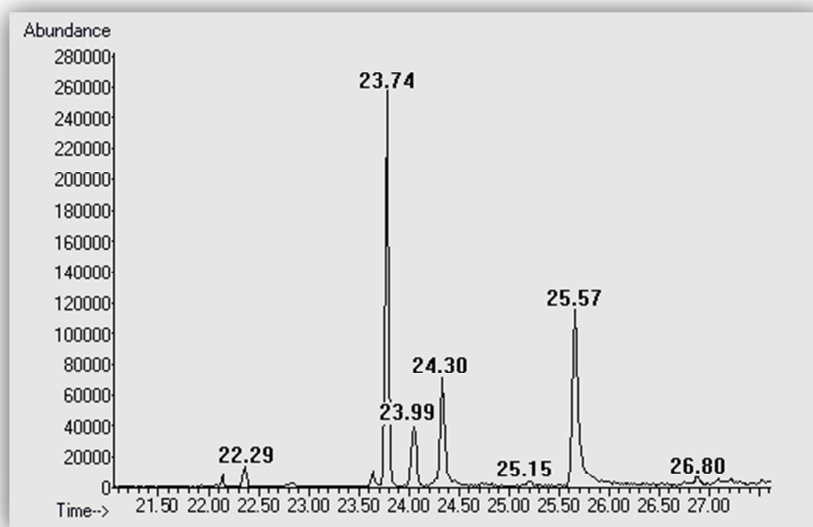


Figura 27: Extracto del cromatograma del EA de *H. tubispathus*.

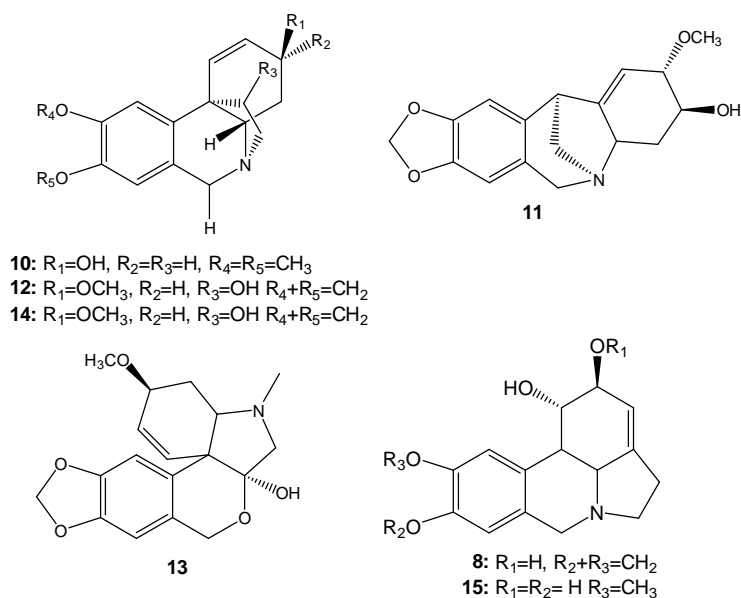
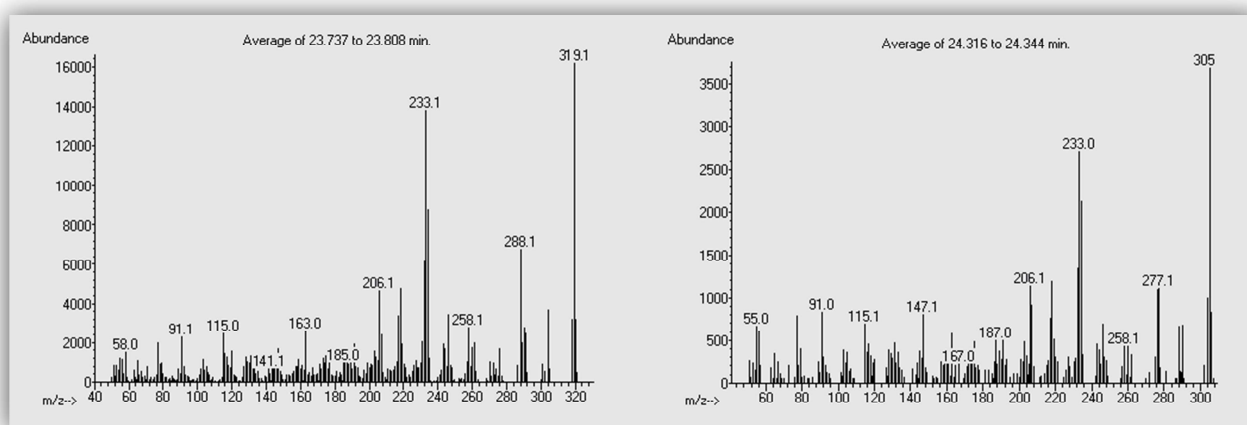


Figura 28: Alcaloides identificados en *H. tubispathus*.

**Tabla 4:** Datos de masa de alcaloides identificados en *H. tubispathus*

Alcaloide	$t_R$ (min)	$M^+$ y $m/z$ (int. rel.)	Cantidad relativa(%)	Referencia datos EM
<b>Maritidina (10)</b>	22,29	287(91), 268(8), 244(34), 215(100), 203(61), 189(24), 128(24), 115(30), 71(2), 56(20)	2,1	<i>de Andrade 2012</i>
<b>Montanina (11)</b>	23.79	301(100), 270 (82), 257(7), 252(26), 223(26)	< 1	<i>Berkov 2008</i>
<b>Hippeastidina (6)</b>	23,74	319(100), 304(18), 288(39), 258(20), 233(84), 218(30), 206(27), 163(16), 115(14)	42,6	<i>Pacheco 1978</i>
<b>Haemanthamina (12)</b>	23,99	301(13), 272 (100), 240(24), 225(11), 211(21)	8,6	<i>Berkov 2008</i>
<b>Tazettina (13)</b>	24,27	331(22), 316(8), 298(22), 247(100), 230(12)	< 1	<i>Berkov 2008</i>
<b>3-O-demetilhippeastidina (16)</b>	24,33	305 (100), 304 (26), 290(17), 288(18), 277(28), 276(28), 246(17), 234(50), 233(72), 232(33), 218(28), 217(20), 206(30), 115(16), 91(18)	15,0	-
<b>Haemanthidina (14)</b>	25,15	317(63), 284(57), 233(62), 211(64), 201(93), 199(90), 181(52), 173(66), 115(100), 56(46)	< 1	<i>de Andrade 2012</i>
<b>Licorina (8)</b>	25,57	287(23), 286(13), 268(20), 250(13), 227(63), 226 (100)	28,6	<i>Berkov 2008</i>
<b>Pseudolicorina (15)</b>	26,80	289(26), 288(15), 270(18), 252(7), 230 (10), 229(67), 228 (100)	< 1	<i>Berkov 2008</i>

El análisis de CG-EM reveló la presencia de dos alcaloides, **6** y **16**, con iones moleculares  $m/z$  319 y 305, respectivamente (Figura 29), cuyos patrones de fragmentación de masa no pudieron identificarse por comparación con datos de literatura. Mediante cromatografía en columna de sílica gel con mezclas  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  fue posible el aislamiento del alcaloide ya identificado licorina (**8**) ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (90:10)) y el compuesto **6** (5,1 mg) que eluyó de la columna con la mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (87,5:12,5). La fracción conteniendo al compuesto **16** se repurificó mediante cromatografía analítica preparativa con la fase móvil  $n\text{-BuOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$  (12:3:5) obteniendo 3,6 mg del mismo.



**Figura 29:** Espectros de masa de los alcaloides **6** ( $t_R$  23,74 min) y **16** ( $t_R$  24,33 min).

### III.2.2.1 Determinación estructural e identificación de los alcaloides **6** y **16**

El espectro de masa de **6** mostró un ion molecular  $m/z$  319 (100%) indicando una fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_4$  (Figura 29). Para determinar la estructura de **6** (Figura 30), se obtuvieron sus espectros de RMN 1D y 2D (Tabla 5).



Tabla 5: Datos de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos **6** y **16** en metanol- $d_4$ .  $\delta$  en ppm.

Posición	<b>6</b>		<b>16</b>	
	$\delta_c$	$\delta_H$ mult (J en Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ mult (J en Hz)
<b>1</b>	25,9 t	1,76 t (14,5;4,2) 3,28 d (14,5)	26,4 t	1,79 m 3,27 d (14,4)
<b>2</b>	26,9 t	1,42 m 2,02 d (13,2)	30,3 t	1,52 m 1,91 os
<b>3</b>	76,7 d	3,22 m	67,6 d	3,57 m
<b>4<math>\beta</math></b>	31,6 t	1,27 dd (23,7; 11,6)	35,6 t	1,33 dd
<b>4<math>\alpha</math></b>		2,23 dd(23,7; 11,2)		2,08 br s
<b>4a</b>	68,1 d	3,38 d (11,6)	67,8 d	3,19 t
<b>6<math>\beta</math></b>	59,9 t	4,00 d (15,8)	60,7 t	3,86 d (15,4)
<b>6<math>\alpha</math></b>		4,59 d (15,8)		4,49 d (15,4)
<b>6a</b>	123,7 s		124,9 s	
<b>7</b>	101,2 d	6,23 s	100,8 d	6,22 s
<b>8</b>	135,5 s		135,0 s	
<b>9</b>	151,7 s		151,2 s	
<b>10</b>	148,1 s		147,8 s	
<b>10a</b>	124,2 s		126,6 s	
<b>10b</b>	44,1		43,4	
<b>11endo</b>	34,2 t	1,98 os	34,9 t	1,95 os
<b>11exo</b>		2,44 m		2,38 m
<b>12endo</b>	51,8 t	3,13 m	51,4 t	2,96 br s
<b>12exo</b>		3,67 t (12,2; 11,8)		3,53 os
<b>3-OCH<sub>3</sub></b>	54,9 c	3,35 s		
<b>8-OCH<sub>3</sub></b>	59,9 c	3,72 s	59,7 c	3,77 s
<b>9-OCH<sub>3</sub></b>	55,1 c	3,77 s	54,8 c	3,79 s

\*os= señal superpuesta, br s= singulete ancho

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostró 18 señales correspondientes a tres grupos metoxilo a  $\delta$  54,9, 55,1 y 59,9 ppm, seis metilenos a  $\delta$  25,9, 26,9, 31,6, 34,2, 51,8 y 59,9 ppm, tres metinos a  $\delta$  68,1, 76,7 y 101,2 ppm, y seis carbonos cuaternarios a  $\delta$  44,1, 123,7, 124,2, 135,5, 148,1 y 151,7 ppm. El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostró tres singuletes a  $\delta$  3,77, 3,72 y 3,35 ppm, correlacionando con  $\delta$  55,1, 59,9 y 54,9 respectivamente, en el espectro HSQC (Figura 31), confirmando la presencia de tres grupos metoxilo, dos unidos a un anillo aromático y el restante unido a un carbono saturado. Los dos dobletes a  $\delta$  4,59 y 4,00 ppm se atribuyeron al sistema AB de la posición bencílica. Se observó sólo una señal aromática a  $\delta$  6,23 (s) asignada al H-7 debido a su correlación con C-7, su correlación en el espectro HMBC con C-6a ( $\delta$  123,7 ppm) y C-8 ( $\delta$  135,5 ppm) (Figura 32) y las correlaciones espaciales observadas en el espectro NOESY con el grupo metoxilo de C-8 y con el H-6 $\beta$  (Figura 33). El espectro NOESY presentó señales correlacionando el H-4 $\beta$  ( $\delta$  1,27) con H-11 $_{exo}$  ( $\delta$  2,44; m) y H-12 $_{exo}$  ( $\delta$  3,67; t); H-6 $\alpha$  ( $\delta$  4,59; d) con H-4a ( $\delta$  3,38; d), y H-6 $\beta$  ( $\delta$  4,00; d) con H-12 $_{endo}$  ( $\delta$  3,13; m), permitiendo diferenciar los protones metilénicos unidos a C-4, C-6, C-11 y C-12 (Figura 33). Además, pudieron observarse los desplazamientos de las señales de H-6 $\alpha$  ( $\delta$  4,59; d) y H-12 $_{exo}$  ( $\delta$  3,67; t) a campos menores debido a la presencia del par de electrones sin compartir del nitrógeno.

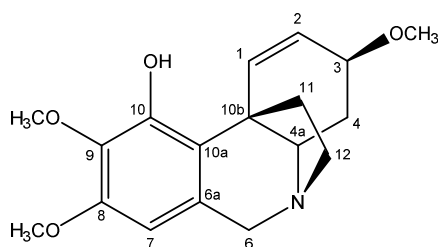


Figura 30: Compuesto 6.

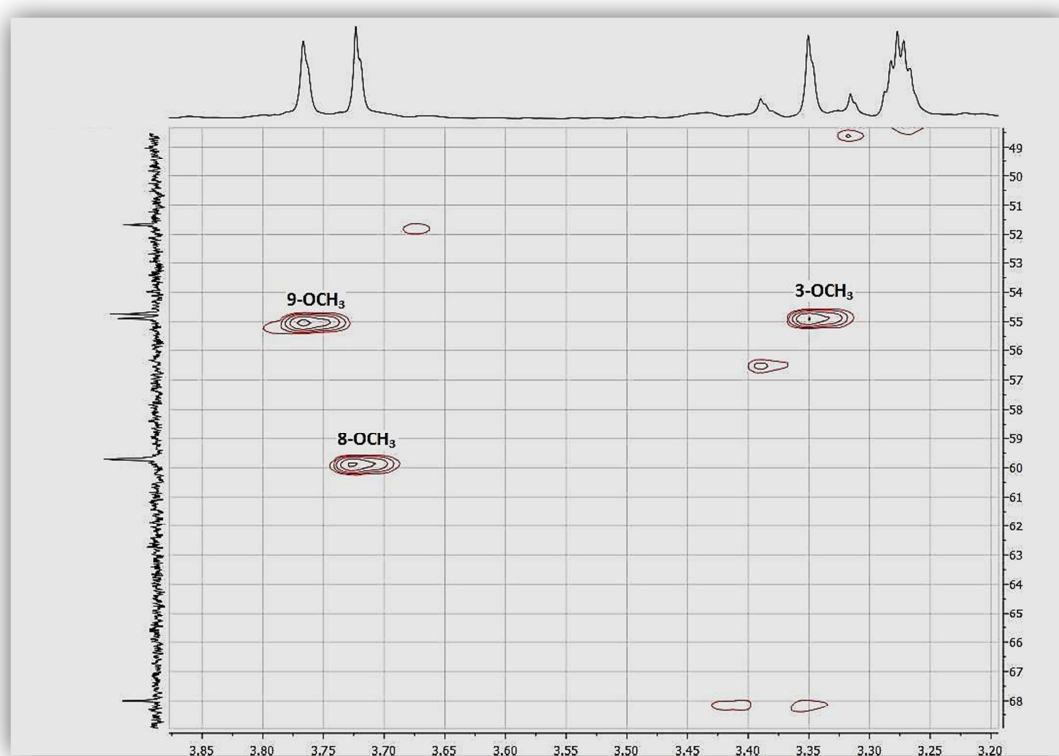


Figura 31: Sección del espectro HSQC del compuesto 6.

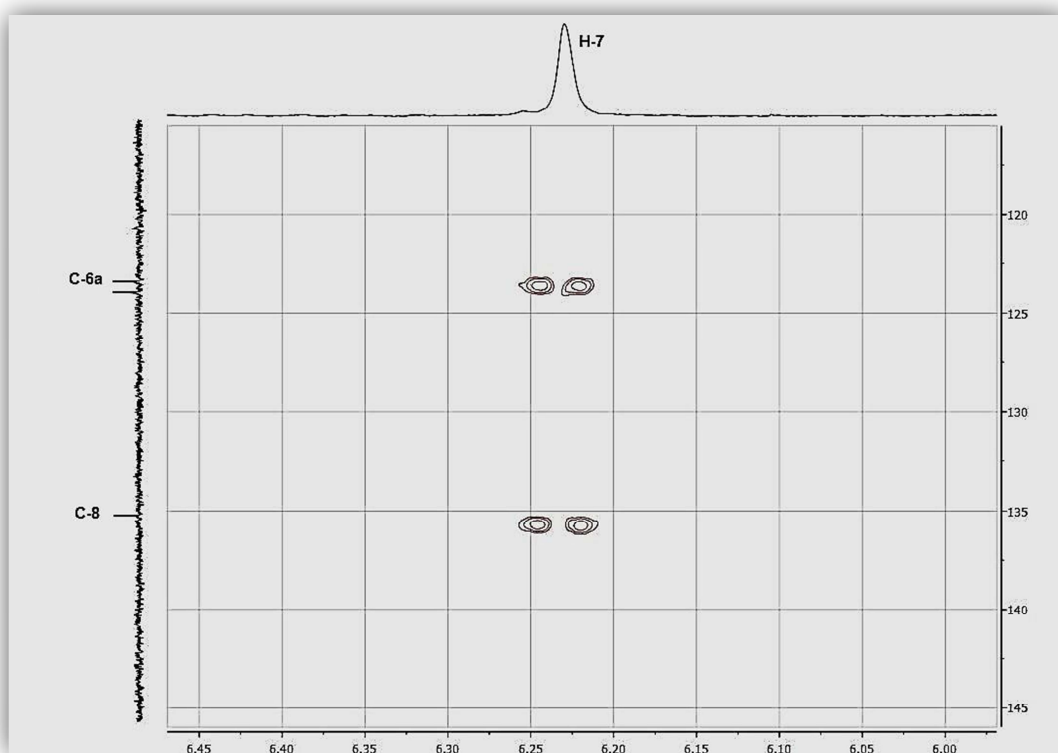
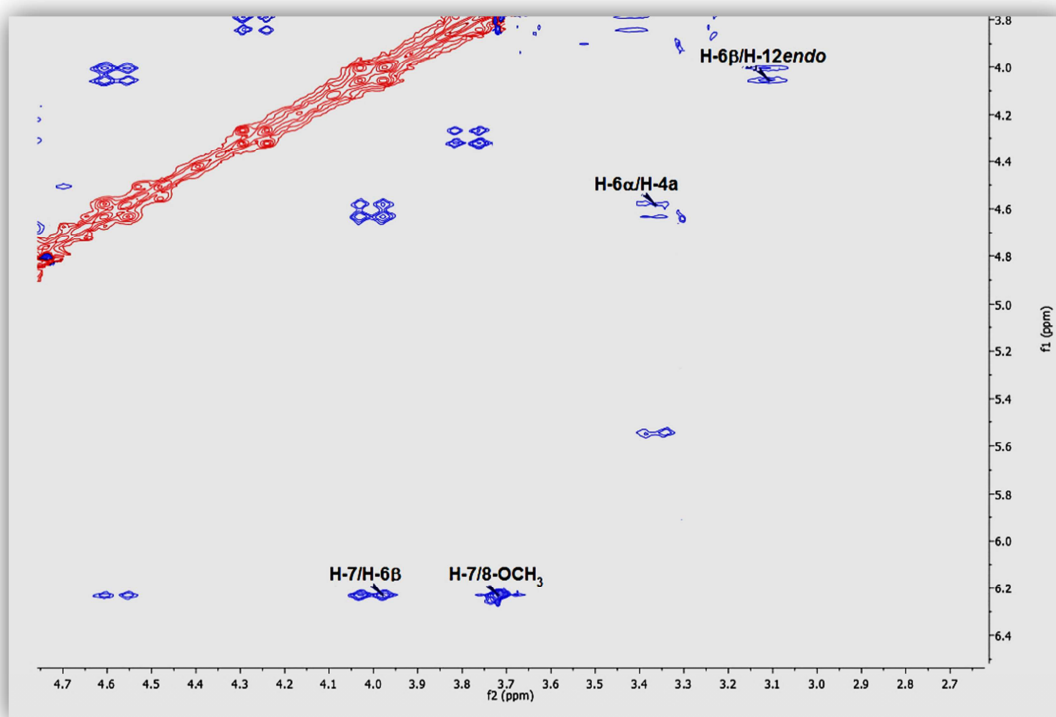


Figura 32: Sección del experimento HMBC del compuesto 6.



**Figura 33:** Sección del espectro NOESY del compuesto **6**.

Los datos espectroscópicos obtenidos para **6** resultaron concordantes con la estructura de hippeastidina propuesta por Pacheco y colaboradores (Pacheco y col., 1978) y confirmada luego por Watson (Watson y col., 1982) mediante rayos X. Los datos de RMN reportados hasta el momento, en  $\text{CDCl}_3$ , sólo presentaban pocas resonancias del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en baja resolución (100 MHz), entre ellas el singlete del protón aromático a  $\delta$  6,10 ppm. Debido a que el alcaloide aislado de *H. tubispathus* fue caracterizado en MeOD, se intentó obtener su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  para compararlo con la escasa información disponible en la literatura. No se obtuvieron resultados positivos debido a la poca solubilidad de **6** en este solvente deuterado. De todas formas, fue posible observar la señal a  $\delta$  6,10 ppm que correspondía al H-7, confirmando de esta manera el patrón de sustitución propuesto para el anillo aromático. En conclusión, el alcaloide **6** aislado de *H. tubispathus* fue identificado como hippeastidina (Figura 30), logrando su completa caracterización mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  por primera vez.

El otro alcaloide no identificado aislado de *H. tubispathus*, **16**, mostró un ión molecular a  $m/z$  305 (100%) en su espectro de masa, sugiriendo una fórmula molecular  $C_{17}H_{23}NO_4$  (Figura 29). Los espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  resultaron ser muy similares a los del alcaloide **6**, excepto por la ausencia de las señales correspondientes al grupo metoxilo unido al C-3, y diferencias en los desplazamientos químicos de las señales de las posiciones 2 y 4 tanto en el espectro de  $^1H$ -RMN como en el de  $^{13}C$ -RMN. Basados en esta información, el compuesto **16** fue identificado como 3-*O*-demetilhippeastidina (Figura 34). Este alcaloide fue aislado anteriormente, al igual que hippeastidina, de *H. añañuca* (Pacheco y col., 1982), pero en este caso la identificación se basó únicamente en cuatro resonancias en el espectro RMN de  $^1H$  y dos fragmentaciones del ión molecular en su espectro de masa. Esta tesis representa el primer reporte completo de los datos espectroscópicos de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  y espectrometría de masa del alcaloide 3-*O*-demetilhippeastidina.

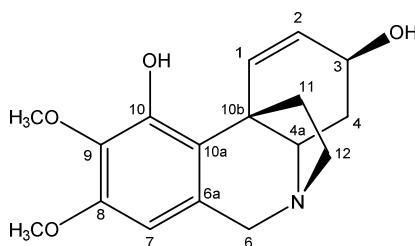


Figura 34: compuesto **16**.

### III.2.2.2 Actividad inhibitoria de colinesterasa de los compuestos identificados y aislados de *H. tubispathus*

El compuesto **6** demostró una moderada inhibición de ACE ( $IC_{50}=104,6 \mu M$ ) y baja inhibición de BuCE ( $IC_{50}=200,8 \mu M$ ), mientras que el compuesto **16**, de estructura muy similar, resultó ser inactivo frente a las dos enzimas ( $IC_{50} \gg 200 \mu M$ ).

Estos dos alcaloides con estructura tipo crinina, con la característica inusual de poseer un grupo OH en C-10, siguen las tendencias de actividad del grupo estructural al que pertenecen. Elgorashi y colaboradores en su estudio de AAm y su actividad

inhibitoria de ACE observaron que los alcaloides con esqueleto tipo crinina presentan, en general, actividad de moderada a débil, siendo la estereoquímica del puente 5,10-etano un factor poco importante para la actividad. Sin embargo, notaron que los grupos unidos al esqueleto básico de 15 átomos de carbono sí resultaban factores determinantes para su unión con la enzima (Elgorashi y col., 2004). Podría inferirse en el caso de hippeastidina, que la falta de doble enlace en C-1 y la presencia de un grupo hidroxilo unido a C-10, serían factores importantes para la actividad, debido a que sus compañeros de grupo, reportados hasta el momento, que no presentan estas características estructurales han demostrado actividad mucho menor. Debido a las diferencias estructurales entre **6** y **16** podría concluirse además, que el grupo metilo del C-3 es de importancia en la unión en el sitio activo de la enzima y por lo tanto, en su inhibición.

La inhibición de ACE del compuesto **6** justifica, al menos en parte, la actividad observada en el EE y EA de *H. tubispathus*. Entre los otros alcaloides identificados, tazettina (**13**) y haemanthidina (**14**) han sido considerados inactivos (Elgorashi y col., 2004), mientras que montanina (**11**), haemanthamina (**12**), licorina (**8**) y pseudolicorina (**15**) han demostrado inhibir la enzima ACE con valores de IC<sub>50</sub> entre 152 y 450 μM (López y col., 2002; Houghton y col., 2004; Pagliosa y col., 2010). Podría suponerse que la actividad inhibitoria de ACE observada en los extractos de esta especie puede deberse a un efecto sinérgico de los alcaloides, siendo hippeastidina el más activo.

Si bien existen numerosos trabajos que reportan la actividad inhibitoria de BuCE de especies de amarilidáceas, sólo se informa la actividad de extractos y/o fracciones, siendo escasos los datos sobre compuestos puros (Cahlíková y col., 2011; Ortiz y col., 2012). Hasta el momento, no se ha encontrado información disponible en cuanto a la inhibición de BuCE de los alcaloides identificados en *H. tubispathus*. La actividad frente a BuCE del alcaloide **6** se considera baja, pero representa un punto de partida para la comparación de este tipo de actividad entre los numerosos AAm que existen.

Esta tesis constituye el primer trabajo de estudio fitoquímico y actividad biológica de la especie *H. tubispathus*.

### III.3 Familia *Chenopodiaceae*

Las quenopodiáceas, son una familia grande y diversa, con alrededor de 100 géneros y más de 1500 especies en todo el mundo. La mayoría de las especies están adaptadas a vivir en zonas áridas, desérticas, y hábitats costeros y de alta salinidad, donde las características del suelo influyen en la vegetación, más que cualquier otro rasgo ambiental.

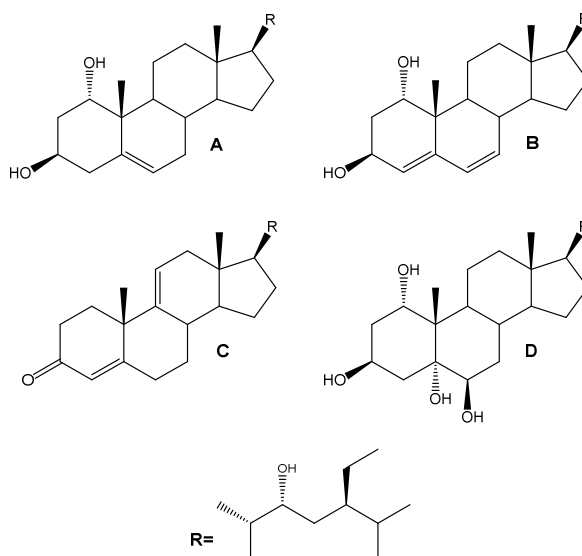
Esta familia en particular, está muy relacionada con la vida diaria de las personas. Por ejemplo, *Beta vulgaris* es una de las fuentes más importantes de azúcar, *Chenopodium quinoa* es un cereal de alto valor alimenticio, *Spinacia oleraceae* es un vegetal de uso común, *Dysphania ambrosioides* y *Salsola collina* son plantas utilizadas medicinalmente para el tratamiento de asma y presión arterial alta, respectivamente, *Anabasis aphylla* se utiliza como insecticida, además de muchos otros ejemplos.

Debido a su amplia distribución, muchas especies de esta familia no han sido estudiadas o su estudio es limitado. Los compuestos más característicos aislados de quenopodiáceas son saponinas triterpénicas (Dini y col., 2001; Kuljanabhadgavad y col., 2008; Wang Q y col., 2012) y flavonoides glicosilados (Ferrerres y col., 1997; Kamel y col., 2001; Liu y col., 2010). Además, se han encontrado como metabolitos secundarios, terpenos (Ahmed y col., 2000), alcaloides (El-Shazli y col., 2005; Tundis y col., 2009), esteroides (Hussain y col., 2006), cumarinas (Miftakhova y col., 2001), entre otros. Varias especies han sido estudiadas ampliamente por su alto contenido de fitoecdisteroides, análogos de hormonas esteroidales de invertebrados en las plantas (Dinan y col., 1998; Kumpun y col., 2011).

Dentro de la familia encontramos numerosas actividades biológicas evaluadas, tanto de extractos y aceites esenciales, como de compuestos puros. Pueden destacarse actividad antioxidante (Liu y col., 2010; Awaad y col., 2012), anticáncer (Oueslati y col., 2012), antimicrobiana (Liu y col., 2010) e insecticida (Dang y col., 2010).



Existen algunos estudios de actividad inhibitoria de colinesterasa dentro de esta familia; los extractos de alcaloides de las especies *Salsola oppositifolia*, *Salsola soda* y *Salsola tragus* mostraron inhibición de ACE y BuCE con valores de IC<sub>50</sub> de entre 26,5 y 70,0 µg/ml (Tundis y col., 2009). El extracto metanólico de *Suaeda monica* recolectada en las costas indias presentó actividad antiACE con un IC<sub>50</sub> de 1,42 mg/ml (Suganthi y col., 2009). Una subespecie de *Beta vulgaris*, conocida comúnmente como acelga, fue evaluada por su capacidad antioxidante e inhibitoria de ACE presentando para esta última moderada potencia (IC<sub>50</sub>= 14,4 µg/ml) (Sacan y col., 2010). En un *screening* de plantas medicinales de Algeria el extracto acuoso de *Atriplex halimus* mostró significativa actividad antiACE, inhibiendo el 50 % de la enzima a 150 µg/ml (Benamar y col., 2010). Mediante aislamiento guiado por la actividad inhibitoria de colinesterasas, de la planta medicinal india, *Haloxylon recurvum*, fue posible el aislamiento de los esteroides A-D (Figura 35) con importante actividad (IC<sub>50</sub> entre 0,85 y 25,5 µM para ACE, y entre 1,0 y 19,0 µM para BuCE) (Ahmed y col., 2006).



**Figura 35:** Esteroides A-D aislados de *Haloxylon recurvum*.

En la Argentina se hallan representados 14 géneros con aproximadamente 121 especies de quenopodiáceas, de las cuales 59 son endémicas y 35 introducidas. En general, son hierbas o arbustos anuales o perennes, muy raramente pequeños árboles.

El género *Heterostachys* está constituido por dos especies, *H. olivascens* (Speg.) Speg., cuya área de distribución se limita al litoral sur de Buenos Aires y Río Negro, y *H. ritteriana* (Moq.) Moq. que habita en suelos salados desde Salta hasta el norte de Chubut.

El género *Allenrolfea* contiene tres especies. *A. occidentalis* (S. Watson) Kuntze habita en América del Norte, mientras que *A. patagonica* (Moq.) Kuntze y *A. vaginata* (Griseb.) Kuntze habitan exclusivamente en nuestro país. *A. patagonica* habita en suelos salados, desde Salta hasta el sur de la provincia de Buenos Aires, mientras que *A. vaginata* se restringe sólo al noroeste del país (Cuadra y col., 2007).

Debido a la disponibilidad de grandes cantidades de material, a la ausencia de datos fitoquímicos y/o de actividad biológica de las especies y a la actividad inhibitoria de ACE que presentaron sus extractos etanólicos, se eligieron las especies *H. olivascens* y *A. patagonica* para su estudio.

A continuación se detalla el estudio de inhibición de colinesterasa, así como de aislamiento de los metabolitos responsables de la actividad, de las quenopodiáceas elegidas.

### **III.3.1 Extracción de metabolitos secundarios y actividad inhibitoria de ACE**

Ambas especies fueron recolectadas, cortadas en pequeños trozos y maceradas en etanol durante dos semanas a temperatura ambiente. Teniendo en cuenta que existen reportes de alcaloides como responsables de la actividad inhibitoria de ACE en otras especies de la misma familia (Tundis y col., 2009) y el revelado positivo con el reactivo de Dragendorff en cromatofolios de silicagel, ambos extractos se trataron con HCl y se particionaron con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (**FA**). Luego de alcalinización con NH<sub>4</sub>OH (pH 9), se particionaron con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (**FB**) y *n*-BuOH (**FC**). Posteriormente se realizaron sobre las fracciones el ensayo cualitativo de inhibición de ACE sobre cromatofolios y el revelado para la detección de alcaloides. Además, se midió cuantitativamente la actividad

inhibitoria de ACE. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 6).

Cabe destacar que ninguna de las dos especies mostró actividad inhibitoria de BuCE significativa, por lo que el estudio se enfocó únicamente en la inhibición de ACE.

**Tabla 6:** Inhibición de ACE de extractos y fracciones de *H. olivascens* y *A. patagonica*.

Especie	Fracción	Ensayo ACE cualitativo	PI (1 mg/ml)*	Detección alcaloides
<i>H. olivascens</i>	E. etanólico	+	35%	+
	FA	+	n/d	-
	FB	+	n/d	+
	FC	+	51%	+
	FH <sub>2</sub> O	-	9%	-
<i>A. patagonica</i>	E. etanólico	+	12%	+
	FA	+	n/d	-
	FB	+	72%	+
	FC	-	10%	-
	FH <sub>2</sub> O	-	12%	-

n/d: no determinado debido a insolubilidad.

\* los resultados son la media de tres réplicas.

### III.3.1.1 Aislamiento de metabolitos de *H. olivascens*

De acuerdo a los resultados obtenidos, se procedió a aislar y purificar los metabolitos activos de cada una de las fracciones de *H. olivascens*.

La **FA** se sometió a dos cromatografías en columna de sílica gel sucesivas con mezclas hexano:AcOEt y hexano:Et<sub>2</sub>O, logrando el aislamiento de un compuesto mayoritario, no alcaloide, que coincidía con las manchas de inhibición en el ensayo cualitativo en cromatofolios. De acuerdo a las señales presentes en los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, se llegó a la conclusión de que en realidad el compuesto no estaba

puro, sino que se trataba de una mezcla de ácidos grasos (AGs). Luego de la derivatización de la muestra a los correspondientes trimetilsilil ésteres y análisis mediante CG-EM se determinó que se trataba de una mezcla de ácido palmítico (mayoritario) (**17**), ácido oleico (**18**) y ácido esteárico (**19**) (Figura 36). Debido al tratamiento ácido que se realizó sobre el extracto total, cabe la posibilidad de que los ácidos grasos no se hayan encontrado libres, sino esterificados con diversos alcoholes, en el extracto etanólico y por ende en la planta.

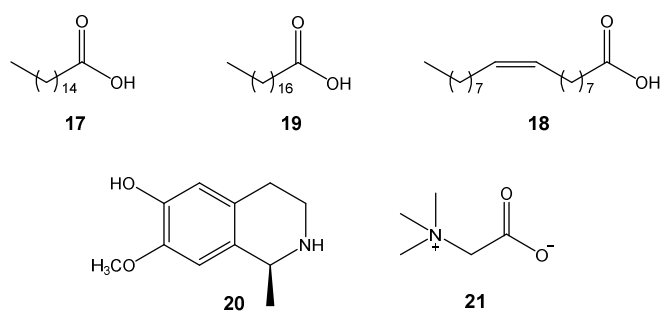
Los AGs representan una importante reserva de energía y son componentes esenciales de las membranas lipídicas de todos los organismos vivos. En las plantas, las rutas metabólicas de los AGs juegan un papel muy importante en la defensa ante patógenos. De hecho, existe cada vez más evidencia que implica a los AGs y sus derivados como moléculas “señal”, modulando las respuestas fisiológicas normales y anormales relacionadas con enfermedades en microbios, insectos, animales y plantas (Kachroo y col., 2009). Entre las actividades biológicas testeadas para AGs, Fang y colaboradores cuantificaron la actividad inhibitoria de ACE de **17**, al encontrarlo como un constituyente del alga roja *Gloiopeltis furcata*. Se informó en ese trabajo un IC<sub>50</sub> de 8,69 µg/ml para ACE, e inactividad frente a BuCE (Fang y col., 2010). Se asumió entonces, que la actividad observada para la fracción menos polar de *H. olivascens* se debía principalmente a la presencia del ácido palmítico (**17**).

La fracción diclorometánica (**FB**) se sometió a cromatografía en columna con sílica gel para intentar aislar los componentes activos. Sólo fue posible el aislamiento del compuesto **20** (Figura 36) que eluyó con la mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 85:15. Fue identificado como salsolina mediante la comparación de su espectro de masa, y sus espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C con los encontrados en literatura (Ghosal y col., 1973).

Este alcaloide, perteneciente a la familia de los alcaloides tetrahidroisoquinolínicos, ha sido aislado de la especie *Salsola coliina*, mostrando importante actividad antibacterial y moderada actividad antiviral frente a los virus de influenza A y B (Wang y col., 2004). En cuanto a su actividad inhibitoria de ACE, se lo ha encontrado inactivo en el ensayo de Ellman, aunque su derivado *N*-metilado si ha

demostrado actividad no selectiva frente ACE y BuCE (Basova y col., 2006). Los resultados de actividad del alcaloide aislado no explican lo observado para esta fracción, por lo cual es lógico suponer que debe haber algún otro compuesto minoritario en esta fracción, que no ha podido ser aislado, que explique la actividad observada.

De la **FC** se aisló glicinbetaína (**21**) (Figura 36), luego de cromatografía en columna de Sephadex LH-20 y purificación por HPLC. Su identificación se realizó mediante comparación de sus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con los de literatura (Motohashi y col., 1976). Su presencia en plantas de la familia Quenopodiaceae ya ha sido reportada anteriormente (Adrian-Romero y col, 1998).



**Figura 36:** Metabolitos secundarios aislados de *H. olivascens*.

El compuesto **21**, así como otras betaínas, es un osmolito orgánico muy importante. Sus niveles aumentan en ciertas especies vegetales como respuesta al estrés ambiental (sequía, salinidad, temperaturas extremas, etc.), acumulándose en grandes cantidades. Aunque su rol en la osmotolerancia de plantas es controversial, se piensa que tiene efectos positivos en la integridad de membranas así como en la adaptación, realizando pequeños ajustes osmóticos, en plantas que crecen bajo condiciones de estrés (Ashraf y col., 2007). No resulta extraño entonces, encontrarlo en importantes cantidades en *H. olivascens*, debido a que esta planta crece en zonas de alta salinidad.

La actividad inhibitoria de ACE de este compuesto ha sido reportada, y aunque

no se ha cuantificado, Lisa y colaboradores observaron una marcada inhibición no competitiva, evidenciando la unión de **21** al PAS de la enzima (Lisa y col., 1983). Este hecho justifica, al menos en parte, la actividad observada para la fracción butanólica de *H. olivascens*. Por tratarse de un compuesto con una estructura poco novedosa se decidió no continuar trabajando con el mismo.

Esta tesis constituye el primer reporte de metabolitos secundarios y actividad biológica de la especie *H. olivascens*.

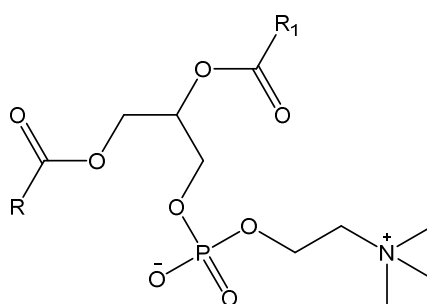
### **III.3.1.2 Aislamiento de metabolitos de *A. patagonica***

En el caso de *A. patagonica* la **FA** fue sometida a cromatografía en columna de sílica gel con mezclas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH de polaridad creciente, permitiendo obtener dos fracciones activas las cuales, de acuerdo con sus espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, fueron identificadas como mezclas de ácidos grasos. Se supuso entonces, que al igual que en *H. olivascens*, la actividad de esta fracción se debía principalmente al ácido palmítico y no se continuó trabajando con ellas.

La **FB** también fue sometida a cromatografía en columna de sílica gel, dando tres fracciones activas. Analizando los espectros de RMN de <sup>1</sup>H de las fracciones se observaron señales correspondientes a los H en las posiciones sn-2 y, sn-1 y sn-3 del glicerol, alrededor de 5,3 ppm y 4,2 ppm, respectivamente. Se observaron además señales típicas de cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos entre 0,5 y 2,5 ppm. Se supuso entonces, que las estructuras presentes en las fracciones podían ser lípidos. Se realizó el desarrollo de estas fracciones en TLC con distintas fases móviles y comparación de los R<sub>f</sub> con la tabla de movilidades en TLC de lípidos de betaína, galactolípidos y fosfolípidos en distintos sistemas de solventes reportada por Dembitsky (Dembitsky, 1996), pudiendo identificar fosfatidilcolinas (FCs) en las fracciones activas. Se emplearon cromatofolios de sílica gel 60 con las siguientes fases móviles CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (65:25:4), CHCl<sub>3</sub>:AcOH:MeOH:H<sub>2</sub>O (75:25:5:2,2) y CHCl<sub>3</sub>:Acetona:MeOH: AcOH:H<sub>2</sub>O (100:40:20:30:10). Los R<sub>f</sub> de las manchas positivas al

revelado con el reactivo de Dragendorff y al ensayo cualitativo de actividad enzimática sobre cromatofolios correspondieron a los valores reportados en esas fases móviles para FCs. Debido a la poca novedad estructural de estos compuestos no se consideró necesario realizar la identificación estructural de cada una de las FCs.

Las FCs son los fosfolípidos más abundantes en animales y plantas y son los bloques fundamentales que forman la doble capa de las membranas celulares. Se caracterizan por sus estructuras químicas particulares: están compuestas de dos ácidos grasos unidos mediante enlace covalente éster a un glicerol en las posiciones sn-1 y sn-2. El tercer carbono del glicerol se encuentra esterificado con un grupo fosforilcolina (Figura 37). En general en las plantas, se observa predominio de ácidos grasos saturados en la posición sn-1 y ácidos grasos insaturados en la posición sn-2 (Devor y col., 1971). Estos lípidos poseen un grupo trimetilamonio cargado positivamente y un grupo fosfato cargado negativamente, por lo tanto a pH neutro son iones dipolares. Las FCs han ganado el interés de los investigadores debido a la gran demanda de estos compuestos en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica (Van Nieuwenhuyzen y col., 1981). Existe un amplio campo de aplicación para FCs en la industria alimenticia, especialmente por sus propiedades emulsionantes (Kim y col., 2009; Rodríguez Patino y col., 2009).



R, R<sub>1</sub>= ácidos grasos

**Figura 37:** Estructura general de fosfatidilcolinas.

En cuanto a su actividad inhibitoria de ACE, Chung y colaboradores reportaron un incremento en los niveles de colina y acetilcolina, y por lo tanto una mejora en la memoria, al administrarles fosfatidilcolina de huevo a ratones con demencia (Chung y

col., 1995). Más recientemente, Nagata y colaboradores informaron que una ingesta conjunta de distintas fosfatidilcolinas mejoró el aprendizaje espacial y deterioro de la memoria en ratas tratadas con escopolamina, el aprendizaje espacial y la capacidad de memoria en ratas normales y disminuyó el deterioro cognitivo y demencia leve en seres humanos, previniendo y mejorando los casos de demencia con eficacia prometedora (Nagata y col., 2011). Estos resultados se suman a los de Nishizaki, en donde los autores encuentran evidencia que soporta el efecto anti-demencia de dos tipos de fosfatidilcolinas administrados a pacientes con deterioro cognitivo y demencia utilizando el mini-exámen del estado mental (test MMSE). Demostrando también, que las fosfatidilcolinas podrían ser un agente terapéutico promisorio para distintos tipos de demencia, incluyendo EA (Nishizaki y col., 2013).

Este trabajo resulta la primera investigación de la especie *A. patagonica*, sus metabolitos secundarios y su actividad inhibitoria de colinesterasa.



### III.4 Familia Asteraceae

Las asteráceas, también llamadas compuestas, son una de las familias de plantas angiospermas más grandes entre las dicotiledóneas, con un gran número de especies (1.620 géneros y 23.600 especies) que representan a esta familia de distribución cosmopolita (Funk y col., 2005). Las asteráceas constituyen alrededor del 10% de las plantas con flores en todo el mundo, y son abundantes en las latitudes subtropicales y de temperaturas templadas. Esta familia es importante económicamente ya que algunas de ellas producen aceites, como el de girasol y cártamo, vegetales comestibles, como alcachofas y lechuga, y otras son de uso ornamental, como dalias, girasoles, margaritas y crisantemos, o medicinal, como caléndula y manzanilla. Algunas asteráceas son consideradas malezas, como diente de león, senecio, etc. (Heywood y col., 2007).

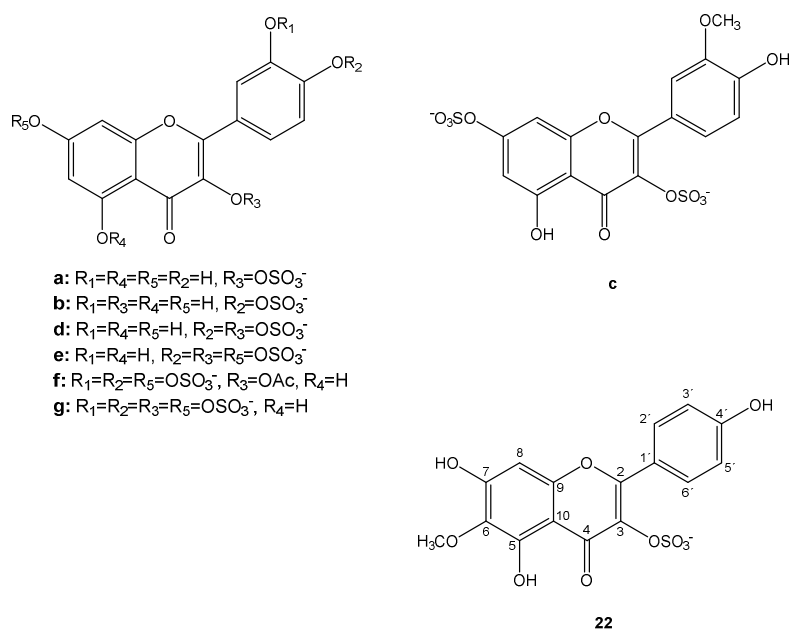
Plantas de esta familia han sido utilizadas tradicionalmente como astringentes, antipiréticas, antiinflamatorias, hepatoprotectivas, diaforéticas y laxantes, y para el tratamiento de heridas, hemorragias, dolores de cabeza, lumbago, dispepsia y gangrena ulcerosa, entre otras (Achika y col., 2014).

Las investigaciones fitoquímicas han revelado la presencia de muchos constituyentes con importante bioactividad. Los principales metabolitos secundarios aislados hasta el momento son flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, terpenoides y esteroides (Achika y col., 2014).

*Flaveria* es un género esencialmente americano que comprende 21 especies, la mayoría de las cuales son nativas del hemisferio norte (Powell, 1978). Sólo *F. bidentis* y *F. haumanii* han sido citadas en la República Argentina (Zuloaga y col., 2008)

*F. bidentis* (L.) Kuntze ha sido utilizada tradicionalmente como digestiva, estimulante del sistema nervioso, antihelmíntica y en molestias menstruales (Verettoni, 1985). Se le ha comprobado prometedora actividad insecticida (Broussalis y col., 1999) e importante actividad antimicrobiana frente a distintas bacterias y hongos (Rojas y col., 2003; Bardon y col., 2007).

Los principales metabolitos secundarios aislados de *F. bidentis* han sido flavonoides, siendo una de las únicas especies vegetales capaz de sintetizar estos compuestos con alto grado de sulfatación. Entre ellos pueden destacarse: 3-sulfato de quercetina (**a**), 4'-sulfato de quercetina (**b**), 3,7-disulfato de isoramnetina (**c**), 3,4'-disulfato (**d**), 3,7,4'-trisulfato de quercetina (**e**), 7,3',4'-trisulfato de 3-acetil-quercetina (**f**) y 3,7,3',4'-tetrasulfato de quercetina (**g**) (Cabrera y col., 1976; 1977; 1979; Pereyra y col., 1972) (Figura 38). Los dos últimos han demostrado significativas propiedades anticoagulantes, antitrombóticas y efectos inhibitorios en la agregación plaquetaria (Guglielmone y col., 2002; 2005; 2012).



**Figura 38:** Flavonoides sulfatados aislados de *F. bidentis*.

En base a la importante actividad inhibitoria de ACE que mostró su extracto etanólico ( $IC_{50}= 0,12$  mg/ml) y a la falta de estudios de esta actividad biológica en el género, la especie *F. bidentis* fue elegida para este trabajo de tesis.

El aislamiento bio guiado e inhibición de colinesterasas de la especie *F. bidentis* se presenta a continuación.

### III.4.1 Aislamiento bioguiado de *F. bidentis*

Considerando que la especie presenta mayoritariamente flavonoides sulfatados como metabolitos secundarios, se probó en primer lugar aislarlos para determinar si eran los responsables de la actividad. Para esto, se siguió un procedimiento ya descrito (Guglielmone y col, 2002). El extracto etanólico (**EE**) se suspendió en una mezcla hexano:H<sub>2</sub>O (50:50) y se extrajo sucesivamente con hexano. A las fracciones obtenidas, tanto hexánica (**FH**) como acuosa (**FA**), se les determinó el porcentaje de inhibición espectrofotométricamente y se comparó con el del **EE** (Tabla 7). **FA** presentó la mayor inhibición a la concentración ensayada, por lo que se la concentró y dejó reposar 24 h en la heladera. El compuesto **22** precipitó espontáneamente, puro y en buen rendimiento, disminuyendo drásticamente la actividad del sobrenadante. Su identificación se realizó en base a sus espectros de masa, y RMN mono y bidimensionales (Tablas 8 y 9).

**Tabla 7:** Actividad inhibitoria de ACE expresada como porcentaje de inhibición (PI%) de fracciones de *F. bidentis*.

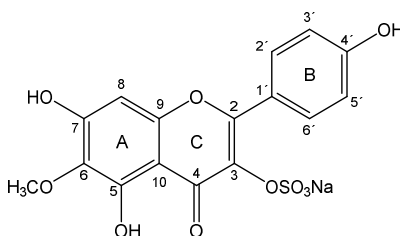
Fracción	ACE - PI % (0,12 mg/ml)*
<b>EE</b>	50,0
<b>FH</b>	5,7
<b>FA</b>	83,0
<b>Tacrina</b>	99

\*los resultados son la media de tres réplicas independientes.

### III.4.2 Determinación estructural e identificación del compuesto **22**

El espectro de masa de alta resolución de **22** mostró un ión molecular correspondiendo con una fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>SO<sub>10</sub>Na. Las escasas señales en el espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Tabla 8) indicaban un esqueleto flavonoide con un grupo metoxilo a  $\delta$ 3.74 ppm. Se observaron en el espectro dos dobletes a  $\delta$ 6.85 ppm y 8.08 ppm correspondiendo a cuatro protones aromáticos en el anillo B y un singulete a  $\delta$

6.53 ppm indicando trisustitución en el anillo A. Se dedujo entonces que se trataba de una flavona pentasustituida (Figura 39). La señal a  $\delta$ 12,91 ppm se atribuyó al hidrógeno del grupo hidroxilo posicionado en C-5 que interacciona electrónicamente con el carbonilo en posición 4. En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabla 9) se observaron catorce señales correspondientes a diez carbonos cuaternarios, tres metinos y un metilo. Las señales a  $\delta$ 115,2 ppm y 130,8 ppm fueron asignadas a los carbonos 3' y 5', y 2' y 6' del anillo B, respectivamente. El metino restante, a  $\delta$ 93,8 ppm, se asignó al carbono no sustituido del anillo A. La correlación en el espectro de HMBC entre el carbono de  $\delta$  131,2 ppm y los hidrógenos a  $\delta$ 3,74 ppm permitió ubicar el grupo metoxilo en el anillo A.



**Figura 39:** Compuesto **22**.

**Tabla 8:** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  de los compuestos **22-25** en  $\text{DMSO}-d_6$ .  $\delta$  en ppm.

Posición	Compuesto			
	<b>22<sup>a</sup></b>	<b>23<sup>a</sup></b>	<b>24<sup>a</sup></b>	<b>25<sup>b</sup></b>
2' y 6'	8,08 d (8.9)	8,04 d (12)	8,08 d (6)	8,22 d (18)
3' y 5'	6,85 d (8.9)	6,92 d (12)	6,93 d (6)	7,04 d (18)
8	6,53 s	6,54 s	6,88 s	7,13 s
6 -OCH <sub>3</sub>	3,74 s	3,75 s	3,73 s	3,77 s
7 -OCH <sub>3</sub>			3,91 s	3,94 s
5 - OCH <sub>3</sub>				3,85 s
4' - OCH <sub>3</sub>				3,81 s

<sup>a</sup> realizado a 600 MHz; <sup>b</sup> realizado a 400 MHz.

**Tabla 9:** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos **22-25** en DMSO- $d_6$ .  $\delta$  en ppm.

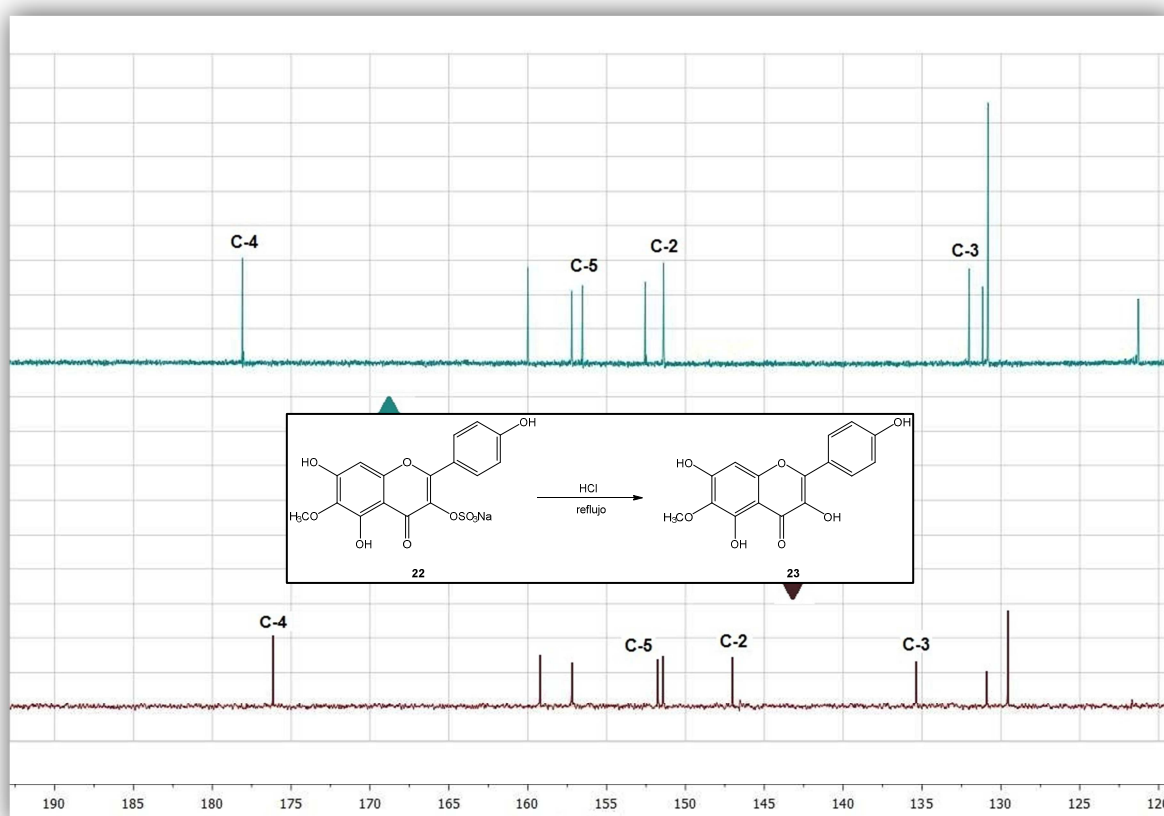
Posición	Compuesto							
	<b>22<sup>a</sup></b>		<b>23<sup>a</sup></b>		<b>24<sup>a</sup></b>		<b>25<sup>b</sup></b>	
1'	121,3	s	121,7	s	121,7	s	123,3	s
2'y 6'	130,8	d	129,6	d	129,6	d	130,2	d
3'y 5'	115,2	d	115,5	d	115,5	d	113,5	d
4'	159,9	s	159,3	s	159,4	s	160,6	s
2	151,4	s	147,0	s	147,4	s	151,4	s
3	132,0	s	135,4	s	135,8	s	139,3	s
4	178,1	s	176,2	s	176,2	s	178,7	s
5	156,5	s	151,8	s	151,1	s	152,7	s
6	131,2	s	130,9	s	131,3	s	134,4	s
7	157,2	s	157,2	s	158,6	s	157,1	s
8	93,8	d	93,8	d	91,3	d	96,8	d
9	152,6	s	151,5	s	151,6	s	152,9	s
10	104,6	s	103,5	s	104,4	s	112,4	s
6 -OCH <sub>3</sub>	60,1	c	60,0	c	60,2	c	61,0	c
7 -OCH <sub>3</sub>					56,5	c	56,4	c
5 - OCH <sub>3</sub>							61,9	c
4' - OCH <sub>3</sub>							55,3	c

<sup>a</sup> realizado a 150 MHz; <sup>b</sup> realizado a 100 MHz.

Debido a la dificultad para posicionar los sustituyentes en los anillos A y C, un grupo hidroxilo, un metoxilo y un sulfato, se decidió realizar transformaciones químicas sencillas sobre la estructura de **22** que permitieran obtener información sobre el patrón de sustitución del flavonoide.

Para obtener el derivado desulfatado, y así situar el grupo sulfato, el compuesto **22** se disolvió en una solución de HCl y se calentó a reflujo por 12 h. Luego de extracción con solvente y secado, se obtuvo el compuesto **23** con un 95% de rendimiento (Figura 40). El espectro de masa de alta resolución presentó un ión

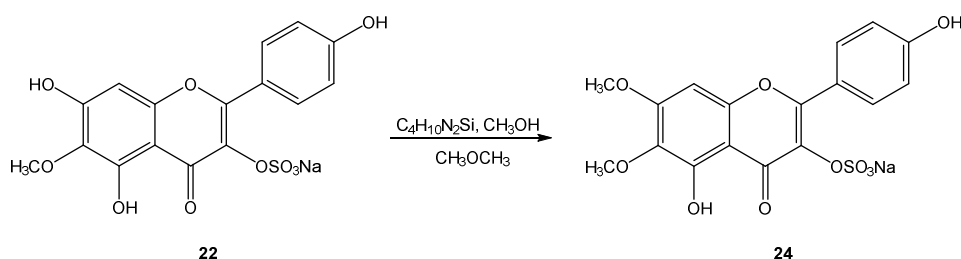
molecular correspondiente a una fórmula molecular  $C_{16}H_{12}O_7$ . En el espectro de RMN de  $^{13}C$  (Tabla 9) pudo observarse el importante corrimiento a campos mayores del carbono vecino (C-2), de  $\delta$  151,4 a  $\delta$  147,0 ppm. Asimismo, se observaron pequeñas diferencias en los desplazamientos químicos de los C-3, C-4 y C-5, posicionando al grupo sulfato unido a C-3 (Figura 39). Estas observaciones resultan concordantes con el desplazamiento a campos mayores esperado para carbonos con grupos sulfatos, y desplazamientos a campos menores en los carbonos vecinos al carbono unido al sulfato en esqueletos flavonoides (Dueñas y col., 2012).



**Figura 40:** Síntesis del derivado **23**. Variación del desplazamiento químico de carbonos seleccionados en compuestos **22** y **23**.

Con el fin de situar los dos sustituyentes restantes en el anillo A se realizaron metilaciones de los grupos hidroxilo en dos condiciones de reacción distintas. En

primer lugar, se obtuvo el derivado **24** con dos grupos metoxilo en su estructura, al hacer reaccionar al compuesto **22** con un mol de trimetilsilildiazometano y metanol en éter etílico hasta conversión total (Esquema 1). La estructura de **24** fue confirmada por espectrometría de masas de alta resolución al obtenerse una fórmula  $C_{17}H_{13}SO_{10}Na$ .



**Esquema 1:** Síntesis del derivado **24**.

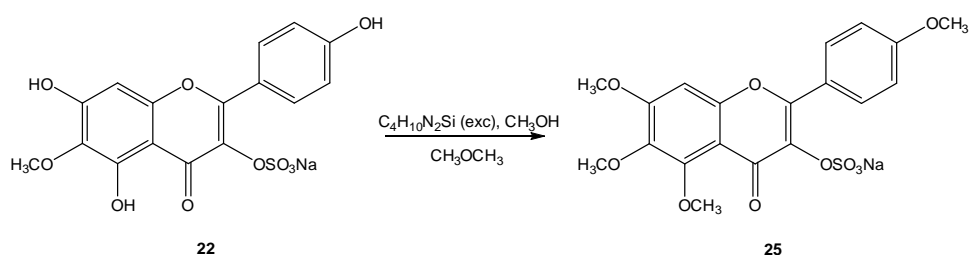
Tanto en el espectro de RMN de  $^1H$ , como en el de  $^{13}C$  (Tablas 8 y 9), se evidenció la presencia de una señal adicional atribuible al nuevo grupo metoxilo a  $\delta$  56,50 ppm y 3,91 ppm respectivamente. La correlación en el espectro HMBC entre los hidrógenos del nuevo metoxilo ( $\delta$ 3,91 ppm) y el C-7 ( $\delta$ 158,60 ppm) permitió definir su ubicación.

Sorpresivamente se observó el desplazamiento de las señales de C-2, C-3, C-4 y C-5 en el espectro de RMN de  $^{13}C$ , similar a lo observado para el compuesto **23**, indicando la desulfatación de la molécula durante la obtención del espectro en el solvente deuterado. Los espectros de RMN obtenidos corresponden entonces al 6,7-dimetoxikaempferol (**24-S**).

De forma similar, se realizó la reacción de **22** con un exceso de agente metilante manteniendo el resto de las condiciones, para obtener, luego de purificación por TLC preparativa, el compuesto **25** (Esquema 2).

El análisis espectroscópico de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (Tabla 8 y 9) permitió confirmar la presencia de tres grupos metoxilos adicionales en la estructura del compuesto de partida, mediante las señales a  $\delta$ 3,81, 3,85 y 3,94 ppm en el espectro de  $^1H$  y  $\delta$ 55,3, 56,4 y 61,9 ppm en el espectro de  $^{13}C$ . Las correlaciones en el espectro de HMBC

(Figura 41) entre los hidrógenos de los metoxilos 5-OCH<sub>3</sub> y C-5, y 4'-OCH<sub>3</sub> y C-4' dieron lugar a la confirmación de la presencia original de los hidroxilos en posiciones 5 y 4', y el grupo metoxilo en posición 6 en la estructura de **22**. Al igual que en el caso anterior, se comprobó la obtención del compuesto con el grupo sulfato mediante su espectro de masas de alta resolución (C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>SO<sub>10</sub>Na), observando luego, la pérdida del grupo sulfato en la molécula (**25-S**) en el solvente deuterado.



Esquema 2: Síntesis del derivado **25**.

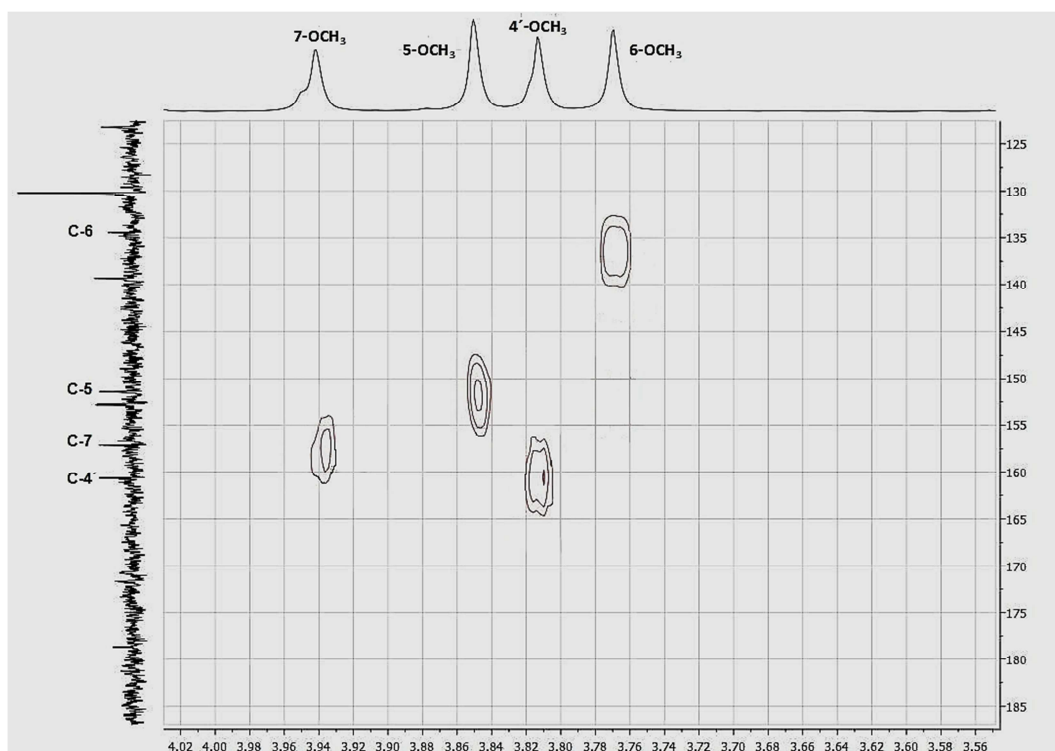


Figura 41: Sección del experimento HMBC del compuesto **25-S**.



El compuesto **22**, fue entonces identificado inequívocamente como 3-sulfato de 6-metoxikaempferol (Figura 39). Hasta el momento, la presencia de este compuesto en plantas sólo ha sido documentada en la especie *Flaveria chloraefolia* A. Gray (Barron y col., 1987). Su identificación se basó en los corrimientos de las bandas máximas de absorción en el espectro UV con el agregado en disolución de distintos aditivos ( $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$ ,  $\text{NaOAc}$ ,  $\text{NaOMe}$ ,  $\text{NaOAc}+\text{ácido bórico}$ ). Los autores informaron además, ciertas pérdidas características del ión molecular en el espectro de masa. Este trabajo aporta, por primera vez, la completa caracterización mediante RMN del compuesto **22**, así como también el primer estudio de actividad biológica del compuesto.

La sulfatación de moléculas en el reino vegetal puede correlacionarse con la inactivación de productos tóxicos mediante el incremento de su hidrosolubilidad. Los flavonoides, son las moléculas pequeñas con más derivados sulfatados reportados de plantas y flora marina, aunque existen algunos ejemplos de sulfatos naturales de ésteres del ácido hidroxicinámico, antraquinonas, fenoles, azúcares y cumarinas. Más de 150 flavonoides sulfatados (FS) naturales se han informado en trabajos científicos hasta el momento, y la mayoría pertenecen a los subgrupos de flavonoles y flavonas. Dada la alta distribución de este tipo de flavonoides en plantas que crecen en hábitats acuáticos y salinos, la sulfatación de flavonoides parece representar una adaptación ecológica. Por otra parte, los FS parecen desempeñar un rol importante en la co-pigmentación, ya que debido a su alta solubilidad en agua, forman complejos moleculares estables con pigmentos polifenólicos como las antocianinas, contribuyendo así a la intensificación de la coloración natural. En la última década, varias actividades biológicas como anticoagulante, antiplaquetaria, antiviral, antiinflamatoria, inmunomoduladora y antitumoral han sido descubiertas para los FS aislados de la naturaleza, ampliando así el interés de investigadores en su aislamiento y síntesis de moléculas pequeñas sulfatadas (Correia da Silva y col., 2013).

### III.4.3 Actividad inhibitoria de colinesterasas de compuestos 22-25

La actividad inhibitoria de colinesterasa de 3-sulfato de 6-metoxikaempferol (**22**) se cuantificó mediante el método de Ellman. Considerando que también se contaba con los derivados de **22** preparados para ayudar en la determinación de su estructura, se los incluyó en el análisis de la inhibición de ACE y BuCE. Los resultados observados se presentan en la Tabla 10.

**Tabla 10:** Actividad inhibitoria de ACE de los compuestos **22-25**.

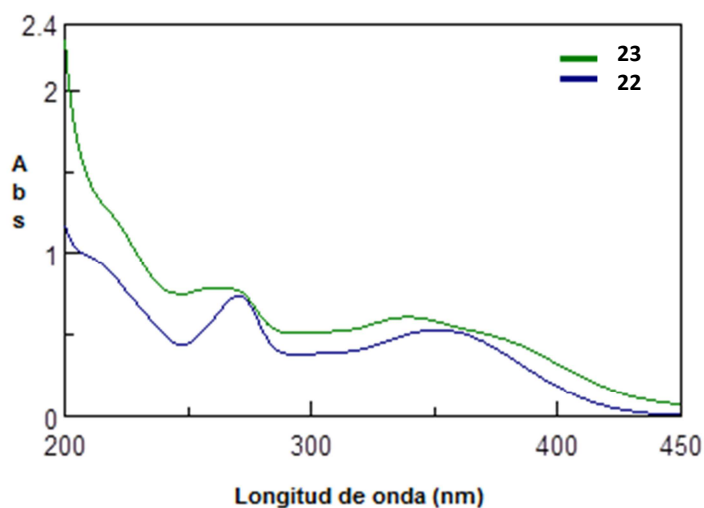
Compuesto	ACE - PI % (0.2mM)*
<b>22</b>	50
<b>23</b>	38,6
<b>24-S</b>	26,9
<b>25-S</b>	17,1
<b>Tacrina</b>	99

\*los resultados son la media de tres réplicas independientes.

Se observó que ninguno de los compuestos resultó activo frente a BuCE, mientras que su actividad frente a ACE es baja, siendo **22** el compuesto más activo.

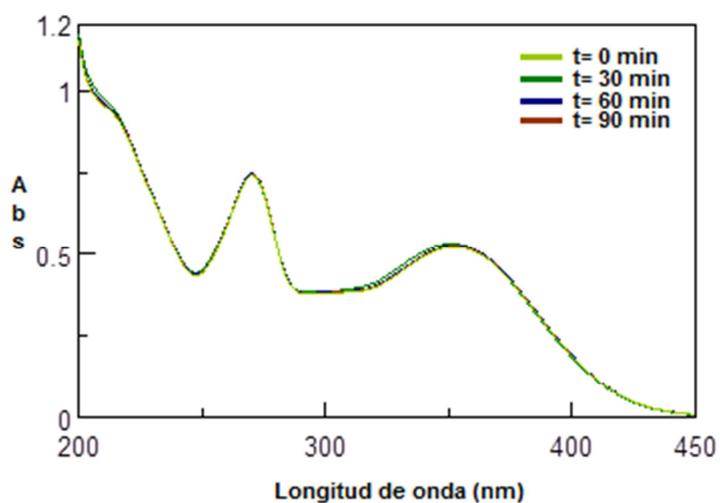
Teniendo en cuenta la labilidad del grupo sulfato observada en los compuestos **24** y **25**, se decidió establecer si la actividad inhibitoria de ACE observada era atribuible totalmente al compuesto **22** o si se debía parcialmente a su producto desulfatado. Para esto, se evaluó la estabilidad del 3-sulfato de 6-metoxikaempferol (**22**) en el buffer del ensayo con el paso del tiempo, considerando la duración del bioensayo.

En primer lugar se obtuvieron los espectros de absorción UV entre 200 y 450 nm de los compuestos **22** y **23** disueltos en el buffer fosfato utilizado para la determinación de la actividad inhibitoria de colinesterasa (Figura 42). Se puede observar el corrimiento en el máximo de absorción debido a la presencia del hidroxilo libre en el C-3 luego de la pérdida del grupo sulfato en el espectro del compuesto **23**.



**Figura 42:** Espectro UV de compuestos **22** y **23**.

Luego, se preparó una solución del compuesto **22** y se midió su espectro UV a tiempo 0, 30, 60 y 90 minutos luego de su disolución en el buffer (Figura 43).



**Figura 43:** Espectros UV del compuesto **22** en buffer con el paso del tiempo.

Las curvas muestran que en el tiempo transcurrido entre la preparación de la solución y la medición de la actividad no se observan cambios en la estructura del compuesto. Por lo que la mayor actividad es concordante con la presencia del grupo sulfato en la estructura del flavonoide. Este hecho indicaría que el grupo sulfato es

importante en la interacción con la enzima mejorando la inhibición de la misma. En el grupo de investigación se ha trabajado con derivados sulfatados de un triterpeno natural, calenduladiol (Figura 44), observando que la sulfatación de este compuesto no sólo mejora su solubilidad en el medio del ensayo, sino que además produce un aumento en la inhibición de la enzima pasando de un PI % de 31,2 a 94,1 a 0,5 mM (Vela Gurovic y col., 2009).

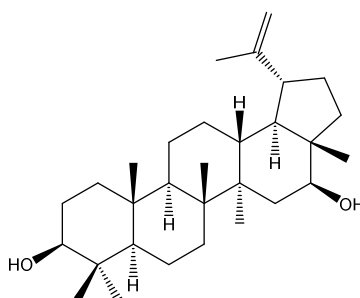


Figura 44: Estructura de calenduladiol.

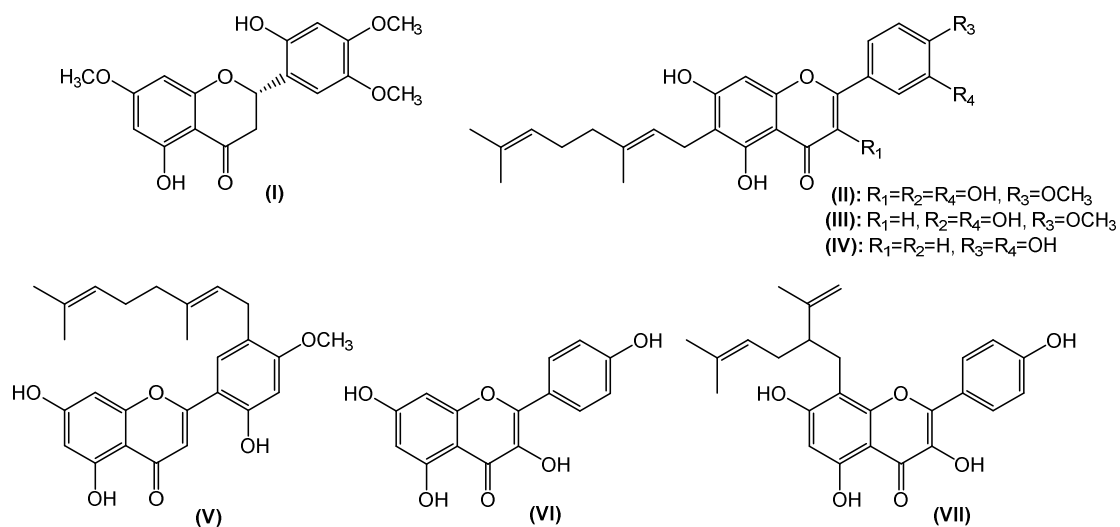
Cuando es posible medir la actividad de compuestos aislados, mediante un fraccionamiento bioguiado, generalmente se observa un incremento de actividad en comparación con el extracto del que provienen. Es razonable esperar, que el compuesto **22** puro sea mucho más activo que el extracto etanólico y que la fracción cruda de donde proviene, debido a que contienen muchos otros componentes además de **22**. Sin embargo, el compuesto puro puede que actúe sinérgicamente y que otros constituyentes aumenten la eficacia de la inhibición enzimática en el extracto y/o fracción activa. Esta puede ser la razón de que el valor de  $IC_{50}$  ( $225 \mu\text{M}$  ó  $94 \mu\text{g/ml}$ ) del compuesto **22** no sea tan bajo como se hubiera esperado, si bien es evidente el aumento de potencia a medida que nos acercamos al compuesto puro cuando se utilizan las mismas unidades de cuantificación. Así, se pasa de un porcentaje de inhibición de 50 % en el extracto a un 93,4 % para el compuesto puro a la misma concentración ( $120 \mu\text{g/ml}$ ). Puede suponerse también, que al encontrarse el flavonoide sulfatado en gran cantidad en el extracto (rendimiento 4% p/p) y tener un peso molecular no tan alto, el aumento de actividad no se refleje en el valor de  $IC_{50}$  en  $\mu\text{M}$ .

Los casos de flavonoides inhibidores de ACE no son tan numerosos como los de alcaloides u otro tipo de compuestos, siendo éste el primer reporte de un flavonoide sulfatado con inhibición de la enzima ACE.

Uno de los primeros trabajos de inhibición de ACE por flavonoides fue realizado por Ahmad y colaboradores (Ahmad y col., 2003) al investigar los constituyentes de *Onosma hispida*. El aislamiento bioguiado por la actividad inhibitoria enzimática, permitió aislar una nueva flavanona, hispidona (I) (Figura 45), con importante actividad inhibitoria no selectiva de ACE y BuCE ( $IC_{50}=11,6 \mu\text{M}$  y  $15,7 \mu\text{M}$  respectivamente) (Uriarte-Pueyo y col., 2011). A partir de los frutos de la especie *Paulonia tomentosa* se aislaron los flavonoides geranilados diplacona (II), 6-geranil-3',5,5',7-pentahidroxi-4'-metoxiflavona (III) y 6-geranil-3',5,5',7-tetrahidroxi-4'-metoxiflavanona (IV) (Figura 45) con potente actividad inhibidora de ACE y BuCE humana, con valores de  $IC_{50}$  entre 7,2 y 22,9  $\mu\text{M}$  para ACE y entre 1,4 y 6,4  $\mu\text{M}$  para BuCE, respectivamente. Ocho compuestos con estructuras relacionadas, aislados de la morácea *Morus lhou*, también demostraron potente actividad antiACE, siendo la flavona nueva 5'-geranil-4'-metoxi-5,7,2'-trihidroxiflavona (V) (Figura 45) el compuesto de mayor actividad, con un tipo de inhibición mixta ( $IC_{50}= 10,9 \mu\text{M}$ ). Los flavonoides presentes en la fabácea *Sophora flavescens* fueron testeados para distintas actividades biológicas relevantes para la EA, manifestando significativa actividad inhibitoria de ACE, BuCE y BACE 1. Entre ellos, kaempferol (VI) y 8-C-lavanduril-kaempferol (VII) (Figura 45), relacionados estructuralmente con **22**, mostraron valores de  $IC_{50}$  menores a 7  $\mu\text{M}$  (Murray y col., 2013).

El establecimiento de relaciones estructura-actividad para los flavonoides resulta dificultoso debido a la gran variedad de estructuras químicas que presentan. Algunos autores sugieren que no sólo la presencia de un grupo metoxilo en posición 4' es necesaria, sino que también un azúcar en posición 7 favorecería la inhibición de ACE. Se ha notado que en general, las flavanonas muestran menor actividad que las flavonas, sugiriendo que el doble enlace entre C-2 y C-3 desempeña un papel

importante. Respecto a los flavonoles, no existen patrones claros de relación estructura-actividad (Uriarte-Pueyo y col., 2011).



**Figura 45:** Flavonoides con actividad inhibitoria de ACE.

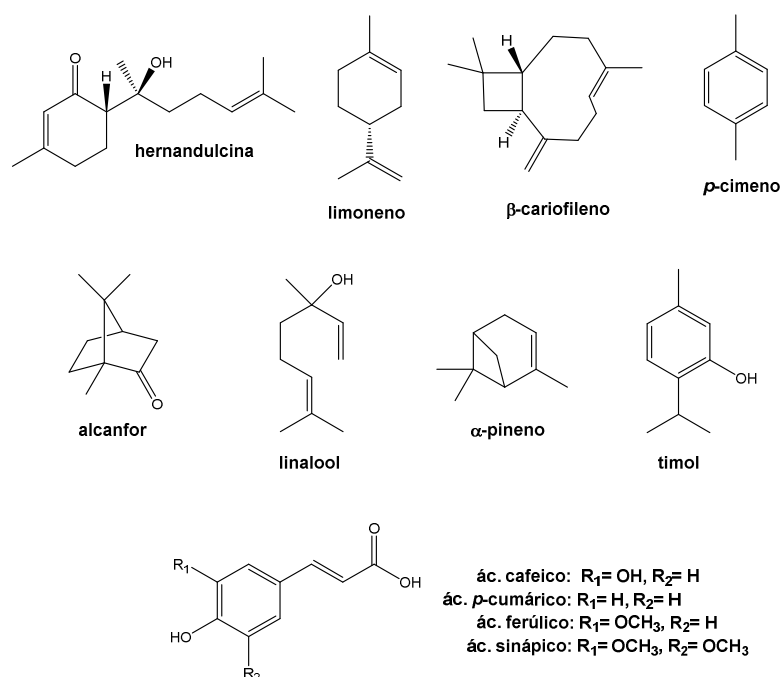
Esta tesis es el primer reporte de la presencia de **22** en *F. bidentis*, así como el primer trabajo completo de datos de RMN y actividad biológica de este compuesto.

### III.5 Familia Verbenaceae

Las verbenáceas presentan una distribución cosmopolita, con excepción del Ártico, la Antártida y desiertos secos. Esta familia posee 30 géneros y alrededor de 1100 especies a nivel mundial. Muchas de sus especies herbáceas tienen propiedades medicinales como por ejemplo el “cedrón” (*Aloysia citriodora*) con propiedades digestivas. Son productoras de aceites esenciales, principalmente los géneros *Duranta*, *Lantanea*, *Petraea* y *Lippia*. A su vez, la familia contiene cientos de géneros ornamentales como *Citharexylum*, *Glandularia*, *Verbena*, entre otros.

El género *Lippia* incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños. Las especies se encuentran distribuidas principalmente en países de América Central, América del Sur y África tropical. La mayoría de ellas son utilizadas tradicionalmente como remedios para problemas gastrointestinales y respiratorios. Además, las hojas se utilizan como condimentos en preparaciones gastronómicas. Relacionada con estas propiedades culinarias, es importante destacar la especie *Lippia dulcis* Trevir., una planta con sabor dulce, cuyo principal componente, (+)-hernandulcina (Figura 46), ha demostrado ser no tóxico y con propiedades endulzantes mil veces más potentes que la sacarosa (Pascual y col., 2001).

Existen pocos estudios respecto a la composición química y actividad farmacológica de este género. Las especies más investigadas han sido *L. multiflora* y *L. alba*. La composición química de aceites esenciales de varias especies de *Lippia* ha sido investigada mediante CG, siendo limoneno,  $\beta$ -cariofileno, *p*-cimeno, alcanfor, linalool,  $\alpha$ -pineno y timol los componentes más comunes (Figura 46). En cuanto a ácidos fenólicos, se han identificado una amplia variedad de derivados del ácido cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico (Figura 46). Es frecuente además, la presencia de gran cantidad de flavonoides, especialmente flavonas 6-hidroxiladas y metoxiflavonas. Finalmente, derivados triterpenoidales y esteroidales, usualmente en forma de saponinas, también han sido encontrados en este género (Pascual y col., 2001; Castellar y col., 2011).



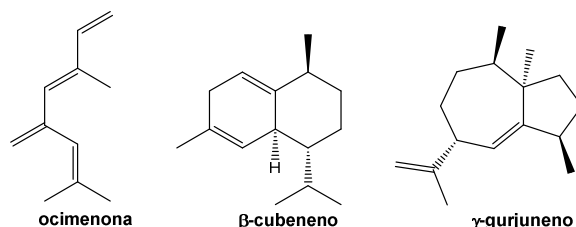
**Figura 46:** Compuestos aislados de especies estudiadas del género *Lippia*.

En cuanto a actividad farmacológica se refiere, podría decirse que existe una escasez de estudios detallados de bioactividad y aislamiento de metabolitos activos en el género *Lippia*. La mayoría de los trabajos han enfocado su atención en la actividad antimicrobiana, antifúngica, repelente y larvicida de los aceites esenciales o extractos (Pascual y col., 2001). Hasta el momento sólo se ha informado la investigación de *Lippia javanica* por su actividad inhibitoria de colinesterasas en un *screening* de plantas de Sudáfrica. El extracto etanólico demostró significativa actividad anti-ACE con un IC<sub>50</sub> de 0,36 mg/ml (Dzoyem y col., 2015).

En Argentina podemos encontrar 45 especies de *Lippia*. Dentro de ellas, *L. salsa* se encuentra ampliamente distribuida en norte y centro de nuestro país, generalmente en zonas cercanas a cursos de agua. El aceite esencial de *L. salsa* ha sido estudiado junto al de otras plantas aromáticas bajo la premisa de identificar plantas medicinales y aromáticas que presenten un potencial interés comercial para un futuro programa de cultivo y conservación (Juliani y col., 2002). Los autores informan que el contenido de aceite esencial es muy bajo, menor al 0,1%, convirtiendo a la especie en una de las únicas del género que parece no acumular compuestos volátiles en cantidades



significativas. Sólo un 20% de la composición del aceite fue identificado, incluyendo ocimenona (7%),  $\beta$ -cubebeno (1,4%),  $\gamma$ -gurjuneno (1,6%) y un sesquiterpeno desconocido como componente mayoritario (Figura 47).



**Figura 47:** Componentes mayoritarios del aceite esencial de *L. salsa*.

*L. salsa* fue elegida para este trabajo en base a la actividad inhibitoria de ACE demostrada por su extracto etanólico y a los escasos antecedentes de estudios químicos y/o biológicos para esta especie.

Se presenta a continuación el aislamiento e identificación de metabolitos de la especie con actividad inhibitoria de colinesterasa.

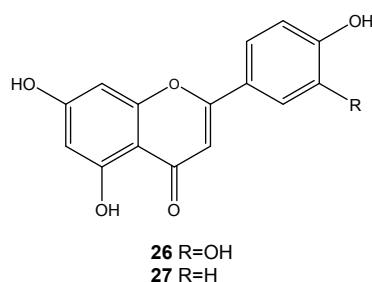
### III.5.1 Aislamiento bioguiado por la actividad inhibitoria enzimática de *L. salsa*

Al extracto etanólico, obtenido del material vegetal fresco recolectado en Noviembre de 2012, se le realizó el ensayo de actividad inhibitoria de ACE y BuCE mediante el método de Ellman. Se obtuvo un  $IC_{50}$  de 0,89 mg/ml para ACE mostrando una potencia moderada y se observó inactividad frente a BuCE ( $IC_{50} \gg 200 \mu M$ ). Se procedió luego a aislar el/los metabolito/s responsables de la actividad observada.

Debido a que las especies de este género presentan variedad de compuestos en su composición, se decidió realizar una partición general con solventes de distinta polaridad, hexano, AcOEt y  $H_2O$ . La fracción de AcOEt presentó la mayor actividad al someterla al bioensayo (48% de inhibición a 0,45 mg/ml) por lo que se decidió continuar trabajando con ella. Los compuestos activos se purificaron mediante

cromatografía en columna, en primer lugar de sílica gel usando mezclas hexano:AcOEt de polaridad creciente y luego con Sephadex LH-20 y MeOH como fase móvil. De las 30 fracciones obtenidas en la última purificación, se aisló el compuesto **26** puro (5,4 mg) a partir de una fracción activa. El compuesto **27** se aisló mediante TLC preparativa con la fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (95:5) de otra fracción activa consecutiva a la que contenía **26**.

Estos compuestos fueron identificados como los flavonoides luteolina (**26**) y apigenina (**27**) (Figura 48) mediante comparación de sus espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C con los encontrados en literatura (Harborne, 1994; Agrawal, 1989).



**Figura 48:** Compuestos **26** y **27**.

El creciente interés por los flavonoides se basa en la amplia variedad de actividades farmacológicas que poseen. Presentan una marcada habilidad para unirse a polímeros biológicos (enzimas, hormonas, ADN, etc.), quelar iones metálicos de transición (Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>), catalizar el transporte electrónico y atrapar radicales libres. Se ha reportado efecto protector de flavonoides en varias patologías como diabetes mellitus, cáncer, enfermedades coronarias, infecciones virales, úlceras estomacales e inflamación. Otras propiedades notables son actividad antiviral, antialérgica, antitrombótica y capacidad inmunomoduladora. Los efectos farmacológicos de los flavonoides están relacionados con su actividad antioxidante; son antioxidantes poderosos frente a radicales libres y ROS (Uriarte-Pueyo y col., 2011).

El estrés oxidativo desempeña un papel importante en el proceso patológico de enfermedades neurodegenerativas como EA. Numerosos estudios han demostrado que diferentes biomarcadores de estrés oxidativo se encuentran en elevadas concentraciones en los cerebros de pacientes con EA. Debido a esto, los flavonoides con actividad inhibitoria de ACE son compuestos naturales promisorios para desarrollar medicamentos multifuncionales para la EA. Las posibles ventajas de estos compuestos son, además de presentar algunos de ellos potente actividad antiACE, la importante capacidad antioxidante y baja toxicidad que presentan (Ji y col., 2006).

### **III.5.2 Actividad inhibitoria de ACE y BuCE de compuestos 26 y 27**

La actividad observada para el extracto etanólico y fracciones de *Lippia salsa* puede atribuirse a la presencia de los compuestos **26** y **27**.

La actividad inhibitoria de ACE y BuCE de luteolina (**26**) ya ha sido cuantificada, siendo los valores de IC<sub>50</sub> de 25,2 µM y 166,1 µM, respectivamente (Uriarte-Pueyo y col., 2011; Katalinic y col., 2010). Esta potencia moderada y selectividad para ACE ha llevado a científicos a continuar analizando el potencial neuroprotector de este flavonoide. Se ha demostrado que regula el desbalance redox en el cerebro reduciendo la generación de ROS intracelulares, preservando las funciones mitocondriales y disminuyendo la apoptosis relacionada con caspasas (Liu y col., 2011). Luteolina también atenúa la hiperfosforilación de la proteína tau inducida por zinc a través no sólo de su acción antioxidante, sino también por su regulación del sistema fosforilado/desfosforilado (Zhou y col., 2012). Además, inhibe la agregación del péptido Aβ, reduciendo significativamente los agregados por estabilización de un oligómero globular (Churches y col., 2014). Un estudio llevado a cabo por Sawmiller y colaboradores permitió demostrar que el compuesto **26** reduce las patologías de la EA causadas por lesiones cerebrales traumáticas, determinando la habilidad de luteolina de atravesar la barrera hematoencefálica (Sawmiller y col., 2014). Se ha establecido

además, que **26** es un potente inhibidor de BACE-1, enzima que controla el paso esencial en la formación de las placas amiloides (Zheng y col., 2015).

Apigenina (**27**) pertenece a la subclase de flavonoides que presentan una baja toxicidad y antimutagenicidad. Se ha demostrado que es metabolizado por el cuerpo y puede circular en él luego de ser administrado oralmente, presentando una absorción relativamente rápida. Especialmente, tiene un alto nivel de distribución en el cerebro (Zhao y col., 2013). Experimentos previos muestran el efecto inhibitorio de apigenina en la enzima BACE-1, reduciendo los niveles de  $A\beta_{1-40}$  y  $A\beta_{1-42}$  en células neuronales (Shimmyo y col., 2008). Se ha demostrado también que **27** protege frente a neurotoxicidad inducida por el péptido  $A\beta$  en neuronas corticales de rata, regulando el desbalance redox y aumentando la integridad de las membranas (Zhao y col., 2011). Investigaciones más profundas mostraron que la neuroprotección ejercida por apigenina preserva las funciones mitocondriales y disminuye la apoptosis neuronal (Zhao y col., 2013). Se ha medido la inhibición de ACE y BuCE de este flavonoide mediante el método de Ellman informando un  $IC_{50}$  de 21,5 mM y 37,4 mM, respectivamente (Guo y col., 2010; Katalinic y col., 2010).

Estos, entre otros estudios, permiten concluir que **26** y **27** son compuestos muy prometedores con un potencial de aplicación importante para disminuir el avance de la EA y sus síntomas. Por lo tanto, puede considerarse a la especie *Lippia salsa* como fuente de metabolitos secundarios inhibidores de colinesterasa con potencial interés en la terapia de la EA.

Este trabajo representa el primer informe de la presencia de **26** y **27** en la especie *Lippia salsa*, así como también el primer reporte de actividad biológica de la especie.

### III.6 Conclusiones

Se recolectaron quince especies características de la región del sudoeste de la provincia de Buenos Aires, las cuales presentaron actividad inhibitoria de colinesterasas de muy buena a baja. Excepto *H. tubispathus*, las especies fueron elegidas por pertenecer a una zona de alta salinidad.

Seis especies fueron seleccionadas para su estudio por ser abundantes en la zona, demostrar actividad inhibitoria de colinesterasas de moderada a muy buena, y presentar pocos o ningún antecedente de estudios químicos y/o de actividad biológica.

Como era de esperar, las especies *H. jamesonii* y *H. tubispathus* mostraron una importante actividad inhibitoria de ACE y BuCE, tanto en sus extractos etanólicos como en sus extractos de alcaloides. Se estudió la composición de alcaloides de cada una de las especies, siendo este el primer reporte de estudio fitoquímico de *H. tubispathus*. Los resultados obtenidos muestran que la población de *H. jamesonii* del Salitral de la Vidriera presenta una composición distinta a los ejemplares de esta especie recolectados en otras zonas del país. Se confirma la hipótesis de que las diferencias en la producción de metabolitos secundarios podrían deberse a su crecimiento en condiciones de estrés en una zona de alta salinidad. La actividad inhibitoria de colinesterasa observada pudo explicarse por la presencia de alcaloides isoquinolínicos mayoritarios activos. Además, se aislaron los alcaloides mayoritarios de *H. tubispathus*, caracterizando completamente, por primera vez, los compuestos hippeastidina (**6**) y 3-O-demetilhippeastidina (**16**), y evaluándolos como inhibidores de colinesterasa.

La actividad inhibitoria de ACE observada para las especies *H. olivascens* y *A. patagonica* pudo ser justificada por la presencia de compuestos conocidos con actividad relacionada con la EA probada anteriormente. Este trabajo resulta el primer informe de composición de metabolitos secundarios y actividad biológica de ambas especies.

El extracto etanólico de la especie *Flaveria bidentis* mostró una importante y selectiva actividad inhibitoria de ACE. El aislamiento bioguiado del extracto condujo al

aislamiento y completa caracterización espectroscópica de 3-sulfato de 6-metoxikaempferol (**22**), no reportada hasta el momento. Con el fin de elucidar la estructura de **22** se prepararon, mediante transformaciones químicas sencillas, los derivados **23-25**. El compuesto **22** presentó una actividad de moderada a baja para ACE e inactividad para BuCE, no justificando en su totalidad la actividad observada para el extracto etanólico de esta especie. Cabe considerar entonces, la posibilidad de que el compuesto actúe sinérgicamente con algún otro componente del subextracto. La menor actividad de los compuestos **23-25** respecto a la de **22** permitió deducir la importancia del grupo sulfato en la interacción con la enzima e inhibición de la misma.

Los flavonoides luteolina (**26**) y apigenina (**27**) fueron aislados e identificados como los metabolitos secundarios responsables de la actividad inhibitoria de colinesterasa observada para la especie *Lippia salsa*. Su presencia en la especie es informada en este trabajo por primera vez. La habilidad de estos compuestos de inhibir las enzimas ACE y BuCE ya ha sido probada, así como también sus propiedades neuroprotectoras y de actividades relacionadas con la patología de la EA.

Este trabajo de tesis permitió el estudio de seis especies características de la región para las cuales existían pocos o ningún antecedente en la literatura científica. El fraccionamiento guiado por el bioensayo de actividad enzimática dio lugar al aislamiento e identificación de compuestos no caracterizados hasta el momento o nuevas actividades para compuestos ya conocidos. Puede concluirse que la zona del Salitral de la Vidriera presenta especies con potencial de aplicación en el tratamiento de la EA.

**CAPÍTULO IV**  
**- *Experimental* -**

## IV.1 General

### IV.1.1 Materiales

Las cromatografías en columna se realizaron utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck) y LH-20 (GE-Healthcare), mientras que las cromatografías tipo flash se llevaron a cabo empleando sílica gel 60 (425-600 mesh, Merck). Para las cromatografías analíticas en capa fina (TLC) se usaron cromatofolios de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (20 cm x 20 cm, 0.2 mm de espesor, Merck) y de sílica gel 60 RP-18 F<sub>254s</sub> (20 cm x 20 cm, 0.2 mm de espesor, Merck).

Para muestras solubles en el solvente de elución se preparó una solución concentrada y luego se agregó a la columna. Para muestras no solubles, se utilizó la técnica de preadsorción (pastilla): se agregó sílica gel a una solución concentrada de muestra en otro solvente, luego se evaporó el solvente y el polvo resultante se agregó a la columna.

Para la detección de compuestos y revelado de cromatofolios se utilizó luz UV (254 nm y 366 nm) y se emplearon los siguientes reactivos reveladores:

- *p*-anisaldehído: 5 ml de *p*-anisaldehído, 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, 1 ml de ácido acético glacial y 90 ml de EtOH.
- Reactivo de Dragendorff: solución A: 17 g de subnitrito de bismuto y 200 g de ácido tartárico en 800 ml de agua. Solución B: 160 g de ioduro de potasio en 400 ml de agua. El agente revelador para spray consta de 250 µl de cada una de las soluciones stock, A y B, y 1 g de ácido tartárico, en 5 ml de agua.

Todos los solventes utilizados fueron previamente destilados. Para el análisis de muestras por HPLC se utilizaron solventes de calidad HPLC.



#### **IV.1.2 Equipos**

Los espectros de RMN fueron registrados en un espectrómetro Bruker Avance 600 (600 MHz y 150 MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  respectivamente), en un espectrómetro Bruker Avance 400 (400 MHz y 100 MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  respectivamente), o en un espectrómetro Bruker ARX 300 (300 MHz y 75 MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  respectivamente). Se utilizaron como solventes deuterados  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{MeOD-}d_4$  o  $\text{DMSO-}d_6$  con TMS como estándar interno.

El análisis de muestras por HPLC semipreparativa se realizó en un cromatógrafo líquido-líquido KONIK 500 A, equipado con un inyector manual Rheodyne, con un *loop* de carga de 1 ml y un detector UV-VIS de longitud de onda variable, operando a 254 nm. Se usó una columna Phenomenex Gemini 5  $\mu\text{m}$   $\text{C}_{18}$ , 110 Å (250 x 10 mm).

Los espectros de masa se registraron en un cromatógrafo de gases HP 6890 con detector selectivo de masas HP 5972, provisto de una columna capilar HP5-MS (30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ), usando He como gas de transporte (1 ml/min). Los espectros de masa de alta resolución se realizaron en un espectrómetro LCT Premier XE de Waters, en modo positivo o negativo.

Los espectros UV y las mediciones de actividad enzimática se registraron en un espectrofotómetro JASCO V-630BIO, adosado de controlador de temperatura Peltier.

La evaporación de los solventes de extractos o fracciones de cromatografía se realizó en evaporador rotatorio marca Heidolph modelo Laborota 4000, a presión reducida, conectado a una bomba de vacío por cascada de agua marca Oakton modelo WP-15-1, manteniendo la temperatura del baño de agua entre 30 y 40°C.

#### **IV.1.3 Material vegetal**

Las especies vegetales fueron recolectadas en la zona del Salitral de la Vidriera o en la ciudad de Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, e identificadas

taxonómicamente por la Dra. María Gabriela Murray del Laboratorio de Plantas Vasculares, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. Un ejemplar de cada especie fue depositado en el Herbario de DBByF. La recolección de especies en fechas anteriores al año 2009 fue realizada por otros miembros del grupo de investigación. En esos casos, se partió del material y se realizaron los extractos en pequeña escala. Las especies recolectadas, número de depósito en herbario, lugar y fecha de recolección se detallan a continuación.

*Allenrolfea patagonica* (Moq.) Kuntze (MGM 391, Salitral de la Vidriera, Noviembre 2010).

*Beta vulgaris* L. ssp. *maritima* (L.) Arcang. (MGM 387, Salitral de la Vidriera, Diciembre de 2003).

*Blumenbachia insignis* Schrad. (Salitral de la Vidriera, Noviembre de 2012).

*Flaveria bidentis* (L.) Kuntze (MGM 544, Salitral de la Vidriera, Diciembre de 2012).

*Grahamia bracteata* Hook & Arn. (MGM 542, Salitral de la Vidriera, Noviembre de 2012).

*Habranthus tubispathus* (L'Her) Traub (MGM 484, ciudad de Bahía Blanca, Noviembre 2009).

*Habranthus jamesonii* (Baker) Ravenna (MGM 541, Salitral de la Vidriera, Noviembre 2012).

*Heterostachys olivascens* (Speg.) Speg. (MGM 388, Salitral de la Vidriera, Noviembre 2010 y 2011).

*Hyalis argentea* D. Don ex Hook. & Arn. var. *argentea* (MGM 570, Salitral de la Vidriera, Noviembre de 2013).

*Jaborosa bergii* Hieron (MGM 562, Salitral de la Vidriera, Noviembre de 2013).

*Lippia salsa* Griseb. (MGM 567, Salitral de la Vidriera, Noviembre 2012).

*Oxybasis macrosperma* (Hook. f.) S. Fuentes, Uotila & Borsch (MGM 384, Salitral de la Vidriera, Noviembre de 2013).

*Pseudognaphalium leucopeplum* (Cabrera) Anderb. (MGM 564 y 565, Salitral de la Vidriera, Diciembre 2013).

*Salsola kali* L. var. *kali* (MGM 394, Salitral de la Vidriera, Diciembre 2004).

*Sarcocornia perennis* (Mill.) A.J.Scott (MGM 392, Salitral de la Vidriera, Diciembre de 2003).

*Suaeda divaricata* Moq. (MGM 423, Salitral de la Vidriera, Noviembre de 2013).

#### **IV.1.4 Ensayo cualitativo de inhibición de ACE en cromatofolios**

Se siguió el procedimiento descrito por Rhee y colaboradores (Rhee y col., 2001). La determinación cualitativa de la actividad inhibitoria de ACE se llevó a cabo sobre cromatofolios de fase normal. Se sembraron sobre el cromatofolio las muestras a ensayar por duplicado (placa control y placa para el ensayo biológico), se desarrollaron las placas con la fase móvil adecuada y se dejaron secar. Se preparó, en el momento del ensayo, una solución sustrato/reactivo de color disolviendo 12,7 mg de ioduro de acetiltiocolina (ATCI) y 17,5 mg ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) en un volumen de 10 ml de solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M. Con esta solución se rociaron las placas cromatográficas y se dejaron reposar por 30 minutos. Pasado ese tiempo, se rociaron las placas con una solución previamente preparada de 500 U de enzima liofilizada en 100 mL de buffer fosfato A. Al cabo de 3 min se observaron las zonas de inhibición como manchas blancas contra un fondo amarillo. Se determinaron los valores de  $R_f$  donde se encontraron los compuestos inhibidores. Se empleó eserina como control positivo, sembrando 5 µl de una solución de 1 mg/ml en MeOH en las mismas condiciones que las muestras.

#### **IV.1.5 Ensayo cuantitativo de inhibición de colinesterasas**

ACE de anguila eléctrica (500 U, Sigma) y BuCE de suero equino (300 U, MP Biomedicals) se utilizaron como fuente de colinesterasas. La actividad inhibitoria de ACE y BuCE fue determinada *in vitro* mediante el método espectrofotométrico desarrollado por Ellman con pequeñas modificaciones (Ellman y col., 1961). Cada enzima liofilizada fue disuelta en buffer A (8 mM  $K_2HPO_4$ , 2,3 mM  $NaH_2PO_4$ ), obteniendo una solución stock de 5 U/ml y 3 U/ml respectivamente. Se realizó una dilución posterior de las soluciones con buffer B (8 mM  $K_2HPO_4$ , 2,3 mM  $NaH_2PO_4$ , 0,15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7,6) alcanzando concentraciones de 0,126 U/ml y 0,06 U/ml respectivamente. Las muestras se disolvieron en buffer B, en algunos casos con 2,5 % de MeOH como cosolvente. 300  $\mu$ l de la solución de la enzima y 300  $\mu$ l de la muestra se mezclaron en un tubo de ensayo y se incubaron por 60 o 120 minutos a temperatura ambiente. Se inició la reacción adicionando 600  $\mu$ l de la solución del sustrato y reactivo de color (0,5 mM DTNB, 0,6 mM ATCI o ioduro de butiriltiocolina (BTCl), 0,1 M  $Na_2HPO_4$ , pH 7,5). La absorbancia se registró a 405 nm por 120 s a 27°C. La actividad enzimática se calculó por comparación de las velocidades de reacción entre la muestra y el blanco. La concentración de muestra que muestra el 50% de inhibición ( $IC_{50}$ ) se calculó por regresión no lineal de la curva respuesta vs log (concentración) utilizando GraphPadPrism 5. Todas las reacciones se midieron por triplicado. Tacrina se utilizó como inhibidor de referencia. DTNB, ATCI, BTCl y tacrina fueron adquiridos de Sigma.

#### **IV.2 Extracción, aislamiento e identificación de metabolitos secundarios**

##### **IV.2.1 *Habranthus jamesonii***

Se extrajeron los bulbos de *H. jamesonii* (544 g) con EtOH a temperatura ambiente durante dos semanas. Luego de la evaporación del solvente a presión reducida, el extracto etanólico (EE-J<sub>b</sub>) obtenido fue tratado durante una hora con HCl

2% (450 ml) y luego filtrado. Se agregó una solución de  $\text{NaHCO}_3$  3M al sobrenadante hasta pH 9 y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 500 ml) para obtener 150 mg de extracto de alcaloides (**EA-J<sub>b</sub>**). Las partes aéreas de *H. jamesonii* (162 g) se trataron de igual forma obteniendo 2,3 g de extracto etanólico (**EE-J<sub>pa</sub>**) y 24 mg de extracto de alcaloides (**EA-J<sub>pa</sub>**).

Ambos extractos de alcaloides fueron analizados mediante CG-EM. Las temperaturas del inyector y el detector se fijaron a 250 °C y el programa de temperatura del horno fue el siguiente: 100 °C durante 2 min, aumento de la temperatura a 15 °C/min hasta 180 °C, se mantuvo 1 min y luego se programó a 5°C/min hasta 280 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 10 min. Los espectros de masa fueron adquiridos entre 35-500 uma a 70 eV. Se empleó He como gas portador a 1 ml/min. Los compuestos se identificaron por comparación de sus espectros de masa con los almacenados en la base de datos (NBS75K.L MS DATA) o con los hallados en literatura. Las cantidades relativas (%) se obtuvieron directamente del área de los picos del cromatograma.

#### **IV.2.2 *Habranthus tubispathus***

Los bulbos de *H. tubispathus*, 1,6 kg, fueron colocados a macerar en EtOH (5 l) por 15 días. Luego de transcurrido ese tiempo, el extracto fue secado a presión reducida, obteniendo 83 g del extracto etanólico de bulbos (**EE-T<sub>b</sub>**).

El **EE-T<sub>b</sub>** fue disuelto en HCl 2 % (600 ml) y filtrado luego de una hora. La solución remanente se basificó hasta pH 9 con  $\text{NaHCO}_3$  3 M y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 600 ml) dando lugar al extracto bruto de alcaloides (**EA-T<sub>b</sub>**, 368,8 mg). Este extracto fue analizado mediante CG-EM. Las temperaturas del inyector y el detector se fijaron a 250 °C y el programa de temperatura del horno fue el siguiente: 100 °C durante 2 min, aumento de la temperatura a 15 °C/min hasta 180 °C, se mantuvo 1 min y luego se programó a 5°C/min hasta 280 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 10 min. Los espectros de masa fueron adquiridos entre 35-500 uma a 70 eV. Se empleó He como

gas portador a 1 ml/min. Los compuestos se identificaron por comparación de sus espectros de masa con los almacenados en la base de datos (NBS75K.L MS DATA) o con los hallados en literatura. Las cantidades relativas (%) se obtuvieron directamente del área de los picos del cromatograma.

Una porción del **EA-T<sub>b</sub>** (226,4 mg) fue sometido a cromatografía en columna de sílica gel 60 (11,3 g, 70-230 mesh) eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gradualmente enriquecido con MeOH. Se recolectaron 190 fracciones de 5 ml cada una, las cuales fueron combinadas de acuerdo a sus perfiles cromatográficos en TLC con la fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (85:14:1) y usando *p*-anisaldehído y reactivo de Dragendorff como reveladores (**EA-T<sub>b1-12</sub>**). La fracción **EA-T<sub>b7</sub>** (F<sub>122-123</sub>) redisuelta en MeOH llevo a la cristalización espontanea del **compuesto 8** (7,4 mg). El **compuesto 6** (5,1 mg) fue aislado en la fracción **EA-T<sub>bx</sub>** (F<sub>143-148</sub>).

La fracción **EA-T<sub>b12</sub>** fue sometida a cromatografía analítica preparativa con la fase móvil *n*-BuOH:AcOH:H<sub>2</sub>O (12:3:5) pudiéndose obtener 3,6 mg del **compuesto 16** puro.

### Compuesto 8

**Licorina.** RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm): δ 6,80 (s, 1H, H-10), 6,68 (s, 1H, H-7), 5,96 (d, 1H, OCH<sub>2</sub>O), 5,94 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>O), 5,36 (brs, 1H, H-3), 4,87 (d, *J* = 6, 1H, OH-2), 4,76 (dd, *J* = 4,25, 0,5 Hz, 1H, OH-1), 4,27 (bs, 1H, H-1), 4,01 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H, H-6β), 3,97 (m, 1H, H-2), 3,31 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H, H-6α), 3,19 (dd, *J* = 14,4 Hz, 8,6 Hz, 1H, H-12β), 2,60 (d, *J* = 10,6 Hz, 1H, H-4a), 2,5 (nd, 1H, H-10b), 2,43 (m, 2H, H-11), 2,20 (ddd, *J* = 14,4 Hz, 8,6 Hz, 1,5 Hz, 1H, H-12α).

RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm): δ 145,5 (C-9), 145,1 (C-8), 141,6 (C-4), 129,6 (C-6a), 129,5 (C-10a), 118,4 (C-3), 106,9 (C-7), 104,9 (C-10), 100,4 (OCH<sub>2</sub>O), 71,6 (C-2), 70,1 (C-1), 60,7 (C-4a), 56,6 (C-6), 53,2 (C-12), 40,1 (C-10b), 28,0 (C-11).

**Compuesto 6**

**Hippeastidina.** RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD- $d_4$ , ppm):  $\delta$  6,23 (s, 1H, H-7), 4,59 (d,  $J=15,8$  Hz, 1H, H-6 $\alpha$ ), 4,00 (d,  $J=15,8$  Hz, 1H, H-6 $\beta$ ), 3,77 (s, 3H, 9-OCH $_3$ ), 3,72 (s, 3H, 8-OCH $_3$ ), 3,67 (t,  $J=12,2$  Hz, 11,8 Hz, 1H, H-12 $_{exo}$ ), 3,38 (d,  $J=11,6$  Hz, 1H, H-4a), 3,35 (s, 3H, 3-OCH $_3$ ), 3,28 (d,  $J=14,5$  Hz, 1H, H-1), 3,22 (m, 1H, H-3), 3,13 (m, 1H, H-12 $_{endo}$ ), 2,44 (m, 1H, H-11 $_{exo}$ ), 2,23 (dd,  $J=23,7$ , 11,2 Hz, 1H, H-4 $\alpha$ ), 2,02 (d,  $J=13,2$  Hz, 1H, H-2), 1,98 (os, 1H, H-11 $_{endo}$ ), 1,76 (t,  $J=14,5$ , 4,2 Hz, 1H, H-1), 1,42 (m, 1H, H-2), 1,27 (dd,  $J=23,7$ , 11,6 Hz, 1H, H-4 $\beta$ ).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD- $d_4$ , ppm):  $\delta$  151,7 (C-9), 148,1 (C-10), 135,5 (C-8), 124,2 (C-10a), 123,7 (C-6a), 101,0 (C-7), 76,7 (C-3), 68,1 (C-4a), 59,9 (C-6), 59,9 (8-OCH $_3$ ), 55,1 (9-OCH $_3$ ), 54,9 (3-OCH $_3$ ), 51,8 (C-12), 44,1 (C-10b), 34,2 (C-11), 31,6 (C-4), 26,9 (C-2), 25,9 (C-1).

**Compuesto 16**

**3-O-demetilhippeastidina.** RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD- $d_4$ , ppm):  $\delta$  6,22 (s, 1H, H-7), 4,49 (d,  $J=15,4$  Hz, 1H, H-6 $\alpha$ ), 3,86 (d,  $J=15,4$  Hz, 1H, H-6 $\beta$ ), 3,79 (s, 3H, 9-OCH $_3$ ), 3,77 (s, 3H, 8-OCH $_3$ ), 3,57 (m, 1H, H-3), 3,53 (os, 1H, H-12 $_{exo}$ ), 3,27 (d,  $J=14,4$  Hz, 1H, H-1), 3,19 (t,  $J=nd$ , 1H, H-4a), 2,96 (brs, 1H, H-12 $_{endo}$ ), 2,38 (m, 1H, 11 $_{exo}$ ), 2,08 (brs, 1H, 4 $\alpha$ ), 1,95 (os, 1H, 11 $_{endo}$ ), 1,91 (os, 1H, H-2), 1,79 (m, 1H, H-1), 1,52 (m, 1H, H-2), 1,33 (dd,  $J=nd$ , H-4 $\beta$ ).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD- $d_4$ , ppm):  $\delta$  151,2 (C-9), 147,8 (C-10), 135,0 (C-8), 126,6 (C-10a), 124,9 (C-6a), 100,8 (C-7), 67,8 (C-4a), 67,6 (C-3), 60,7 (C-6), 59,7 (8-OCH $_3$ ), 54,8 (9-OCH $_3$ ), 51,4 (C-12), 43,3 (C-10b), 35,6 (C-4), 34,9 (C-11), 30,3 (C-2), 26,4 (C-1).

### IV.2.3 *Heterostachys olivascens*

El material vegetal (1,8 kg), de la planta entera, fue cortado en pequeños trozos y colocado a macerar con EtOH (7 l) durante dos semanas a temperatura ambiente. Una vez evaporado el solvente, se obtuvieron 277,9 g de extracto etanólico (**EE**). Porciones de 50 g del **EE** fueron suspendidas en 500 ml de HCl 0,5 M y extraídas con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 400 ml, **EE-1**) hasta completar la totalidad del **EE**. La fase ácida remanente, en cada caso, se basificó con NH<sub>4</sub>OH hasta pH 9 y fue particionada con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 400 ml, **EE-2**) y *n*-BuOH (3 x 400 ml, **EE-3**) sucesivamente.

Una porción de la fracción **EE-1** (1,6 g) fue sometida a cromatografía en columna de sílica gel 60 (64 g, 70-230 mesh) eluyendo con mezclas hexano:AcOEt de polaridad creciente. Se recolectaron 112 fracciones de 25 ml, las cuales fueron agrupadas según sus perfiles cromatográficos en TLC de fase normal con la fase móvil hexano:AcOEt (50:50) (**EE-1<sub>1-11</sub>**) y *p*-anisaldehído como revelador.

La subfracción **EE-1<sub>8</sub>** (82,3 mg) fue nuevamente sometida a cromatografía en columna de sílica gel 60 (5 g, 70-230 mesh) usando mezclas hexano:Et<sub>2</sub>O como fase móvil. Se recolectaron 133 fracciones (4 ml) que fueron monitoreadas mediante TLC de fase normal con la fase móvil hexano: Et<sub>2</sub>O (50:50) y usando *p*-anisaldehído como revelador. Luego de ser secadas, se combinaron en 8 fracciones finales según sus perfiles cromatográficos. De una de ellas se aisló la mezcla de compuestos **17**, **18** y **19** (4,5 mg). Para su identificación, se disolvió una porción de la muestra (2 mg) en 30 µl de piridina y se trató con 30 µl de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA). La mezcla se calentó a 70 °C por 30 min. Se realizó luego, la inyección de la muestra en el CG-EM, identificando a los compuestos en base a la comparación de sus espectros de masa con los de la biblioteca del equipo como trimetilsilil éster del ácido hexadecanoico (1, *t<sub>R</sub>*: 20,3 min, 73,7%), trimetilsilil éster del ácido cis-9-octadecenoico (2, *t<sub>R</sub>*: 21,9 min, 17,5%) y trimetilsilil éster del ácido octadecanoico (3, *t<sub>R</sub>*: 22,1 min, 8,8%). Las temperaturas del inyector y el detector se fijaron a 250 °C y el programa de temperatura del horno fue el siguiente: 80 °C durante 5 min, aumento de la temperatura a 8 °C/min hasta 280 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 15 min.



Los espectros de masa fueron adquiridos entre 35-500 uma a 70 eV. Se empleó He como gas portador a 1 ml/min.

El subextracto **EE-2** (150,2 mg) fue fraccionado mediante cromatografía en columna tipo flash usando sílica gel 60 (7,5 g, 425-600 mesh) como fase estacionaria y mezclas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH de polaridad creciente como fase móvil. Las fracciones recolectadas (133 fracciones, 3 ml) se agruparon en 17 fracciones finales (**EE-2<sub>a-q</sub>**) de acuerdo a sus perfiles cromatográficos en cromatofolios de sílica gel 60 desarrollados con la fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (80:20) y revelados con *p*-anisaldehído y reactivo de Draggendorf.

El compuesto **20** fue aislado en la fracción **EE-2<sub>i</sub>** e identificado mediante CG-EM, RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Para la cromatografía gaseosa las temperaturas del inyector y el detector se fijaron a 250 °C y el programa de temperatura del horno fue el siguiente: 50°C durante 2 min, aumento de la temperatura a 10 °C/min hasta 280 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 13 min. Los espectros de masa fueron adquiridos entre 35-500 uma a 70 eV. Se empleó He como gas portador a 1 ml/min.

### **Compuesto 20**

**Salsolina.** RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 6,68 (s, 1H, H-8), 6,54 (s, 1H, H-5), 4,06 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-1), 3,84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,24 (m, 1H, H-3), 3,01 (m, 1H, H-3), 2,80 (m, 2H, H-4), 1,43 (d, *J* = 6 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>).

RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 145,4 (C-7), 144,1 (C-6), 132,3 (C-10), 125,7 (C-9), 112,0 (C-5), 111,2 (C-8), 56,0 (OCH<sub>3</sub>), 51,2 (C-1), 41,7 (C-3), 29,8 (C-4), 22,5 (-CH<sub>3</sub>).

MS: 193 ([M<sup>+</sup>], 3), 192 (12), 178 (100), 163 (17), 149 (11), 134 (7), 122 (6), 43 (25).

Por otra parte, el subextracto **EE-3** (500 mg) fue sometido a cromatografía en columna usando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y MeOH como fase móvil (600 ml). Se obtuvieron 7 fracciones finales de 80 ml cada una (**EE-3<sub>a-g</sub>**). La fracción **EE-**

**3<sub>e</sub>** fue disuelta en MeOH calidad HPLC y sometida a HPLC usando una columna semipreparativa Phenomenex Gemini 5  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub>, 110 Å (250 x 10 mm) e inyectando 500  $\mu\text{l}$  de muestra a purificar. Como fase móvil se utilizó una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O (85:15) durante 25 min. La longitud de onda de detección se fijó en 254 nm. De esta manera se obtuvo el compuesto **21** de forma pura (10 mg,  $t_R$  5,3 min).

### Compuesto 21

**Glicinbetaína.** RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, ppm):  $\delta$  3,93 (s, 2H, H-2), 3,40 (s, 9H, -CH<sub>3</sub>).

RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, ppm):  $\delta$  169,6 (C-1), 67,4 (C-2), 60,3 (-CH<sub>3</sub>).

#### IV.2.4 *Allenrolfea patagonica*

Las partes aéreas frescas de *A. patagonica* (2 kg) fueron extraídas con EtOH (8 l) durante dos semanas, luego de evaporar el solvente se obtuvieron 136 g de extracto etanólico (**A**). Porciones del extracto **A** (45 g) fueron suspendidas en 500 ml de HCl 0,5 M y extraídas sucesivamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 400 ml) hasta completar la totalidad del extracto **A**. Las fases ácidas remanentes se basificaron con NH<sub>4</sub>OH hasta pH 8 y se extrajeron nuevamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 400 ml). Las fracciones diclorometánicas combinadas y secas dieron lugar a los sub-extractos **B** (2,19 g) y **C** (240 mg) respectivamente.

Una parte del subextracto diclorometánico **B** (1 g) fue sometido a cromatografía en columna de sílica gel 60 (60 g, 70-230 mesh) eluyendo con mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH de polaridad creciente. Se obtuvieron 144 fracciones (5 ml), las cuales fueron agrupadas en 11 fracciones finales (**B**<sub>1-11</sub>) según su desarrollo en TLC con la fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (80:20) y usando *p*-anisaldehído como revelador. A las fracciones **B**<sub>6</sub> y **B**<sub>8</sub> se le realizaron espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.

El subextracto **C** fue sometido a cromatografía en columna, usando sílica gel 60 (12 g, 70-230 mesh) como fase estacionaria y mezclas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH como fases móviles, obteniendo así, 8 fracciones finales (**C**<sub>1-8</sub>, 3 ml). Mediante la tabla de movilidades en TLC de lípidos de betaína, galactolípidos y fosfolípidos en distintos sistemas de solventes reportada por Dembitsky (Dembitsky y col., 1996), pudieron identificarse fosfatidilcolinas en las fracciones **C**<sub>6</sub> y **C**<sub>7</sub>. Se emplearon cromatofolios de sílica gel 60 con las siguientes fases móviles CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (65:25:4), CHCl<sub>3</sub>:AcOH:MeOH:H<sub>2</sub>O (75:25:5:2,2) y CHCl<sub>3</sub>:Acetona:MeOH: AcOH:H<sub>2</sub>O (100:40:20:30:10).

#### IV.2.5 *Flaveria bidentis*

La planta entera, cortada en pequeños trozos (480,6 g) fue colocada en erlenmeyers de 2 l a macerar en etanol (96%) a temperatura ambiente. Luego de 15 días el sobrenadante fue filtrado y el solvente evaporado bajo presión reducida en rotavapor usando un baño de agua a 40°C. El residuo obtenido (41,4 g) fue suspendido en 800 ml de una mezcla hexano: H<sub>2</sub>O (50:50) y se extrajo sucesivamente con hexano (4 x 400 ml). La fracción acuosa fue concentrada a mínimo volumen bajo presión reducida y colocada en heladera durante 24 hs obteniendo, luego de cristalización en agua y filtración, 198 mg del compuesto **22** como un sólido amarillo intenso (*p.f.*: 193-195 °C).

#### Compuesto 22

**6-metoxikaempferol-3-sulfato**. RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm) δ 8,08 (d, 2H, *J*= 8,9 Hz, H-2' y H-6'), 6,85 (d, 2H, *J*= 8,9 Hz, H-3' y H-5'), 6,53 (s, 1H, H-8), 3,74 (s, 3H, 6-OCH<sub>3</sub>).

RMN de <sup>13</sup>C (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm) δ 178,1 (C-4), 159,9 (C-4'), 157,2 (C-7), 156,5 (C-5), 152,6 (C-9), 151,4 (C-2), 132,0 (C-3), 131,2 (C-6), 130,8 (C-2' y C-6'), 121,3 (C-1'), 115,2 (C-3' y C-5'), 104,6 (C-10), 93,8 (C-8), 60,1 (6-OCH<sub>3</sub>).

HRMS (ESI) Calculado para  $C_{16}H_{11}SO_{10}Na_2 [M+Na]^+$  440,9868, encontrado 440,9864.

### Semisíntesis de derivados del compuesto 22

- Obtención del compuesto **23**

0,096 mmol (40 mg) de 6-metoxikaempferol-3-sulfato (**22**) se disolvieron en 3 ml de HCl (0,1 M) y se colocaron en un balón de 10 ml adosado a un refrigerante. La solución fue agitada con agitador magnético a reflujo durante 12 h. Transcurrido ese tiempo, la mezcla de reacción fue enfriada hasta tomar temperatura ambiente y colocada en una ampolla de decantación de 25 ml. La solución fue particionada con 3 porciones de 5 ml de AcOEt y secada sobre  $MgSO_4$  anhidro. Se obtuvieron 27,7 mg del compuesto puro **23** como un sólido amarillo brillante, con un rendimiento del 95%.

### **Compuesto 23**

**6-metoxikaempferol.** RMN de  $^1H$  (600 MHz,  $DMSO-d_6$ , ppm)  $\delta$  12,56 (brs, 5-OH), 10,70 (brs, 7-OH), 10,12 (brs, 4'-OH), 9,41 (brs, 3-OH), 8,04 (d, 2H,  $J=12$  Hz, H-2' y H-6'), 6,92 (d, 2H,  $J=12$  Hz, H-3' y H-5'), 6,54 (s, 1H, H-8), 3,75 (s, 3H, 6-OCH<sub>3</sub>).

RMN de  $^{13}C$  (150 MHz,  $DMSO-d_6$ , ppm)  $\delta$  176,2 (C-4), 159,6 (C-4'), 157,2 (C-7), 151,8 (C-5), 151,4 (C-9), 147,0 (C-2), 135,4 (C-3), 130,9 (C-6), 129,6 (C-2' y C-6'), 121,7 (C-1'), 115,5 (C-3' y C-5'), 103,5 (C-10), 93,8 (C-8), 60,0 (6-OCH<sub>3</sub>).

HRMS (ESI) Calculado para  $C_{16}H_{12}O_7Na [M+Na]^+$  339,0481, encontrado 339,0478.

- Obtención del compuesto **24**

0,096 mmol (40 mg) de 6-metoxikaempferol-3-sulfato (**22**) fueron colocados en un balón y se disolvieron en 1 ml de  $Et_2O$ . Luego, se agregaron 0,096 mmol (0,01 mL) de  $C_4H_{10}N_2Si$  y 12,3 mmol (0,5 mL) de MeOH. La mezcla fue agitada a temperatura

ambiente hasta observar conversión total por TLC. La solución fue llevada a sequedad en dedo frío obteniéndose 30,4 mg del compuesto **24** puro.

### Compuesto 24

**3-sulfato de 6,7-dimetoxikaempferol.** HRMS (ESI) Calculado para  $C_{17}H_{13}SO_{10}Na_2$   $[M+Na]^+$  455,0025, encontrado 455,0010.

### Compuesto 24-S

#### 6,7-dimetoxikaempferol

RMN de  $^1H$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$  8,08 (d, 2H,  $J= 6$  Hz, H-2' y H-6'), 6,93 (d, 2H,  $J= 6$  Hz, H-3' y H-5'), 6,88 (s, 1H, H-8), 3,91 (s, 3H, 7-OCH<sub>3</sub>) 3,73 (s, 3H, 6-OCH<sub>3</sub>).

RMN de  $^{13}C$  (150 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$  176,2 (C-4), 159,4 (C-4'), 158,6 (C-7), 151,6 (C-9), 151,1 (C-5), 147,4 (C-2), 135,8 (C-3), 131,6 (C-6), 129,7 (C-2' y C-6'), 121,7 (C-1'), 115,5 (C-3' y C-5'), 104,4 (C-10), 91,3 (C-8), 60,2 (6-OCH<sub>3</sub>), 56,5 (7-OCH<sub>3</sub>).

#### ▪ Obtención del compuesto 25

En un balón de 10 ml se disolvieron 0,096 mmol (40 mg) de 6-metoxikaempferol-3-sulfato (**22**) en 1 ml de Et<sub>2</sub>O. Se agregaron luego, 0,384 mmol (0,2 mL) de C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>Si y 37 mmol (1,5 ml) de MeOH. Después de 24 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción fue concentrada a sequedad en dedo frío y purificada mediante TLC preparativa (Sílica gel F<sub>254</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (80:20)) para obtener 21,8 mg del compuesto **25** con 66% de rendimiento.

### Compuesto 25

**3-sulfato de 5,5',6,7-tetrametoxikaempferol.** HRMS (ESI) Calculado para  $C_{19}H_{17}SO_{10}Na_2$   $[M+Na]^+$  483,0338, encontrado 483,0340.

### Compuesto 25-S

**5,5',6,7-tetrametoxikaempferol.** RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$  8,18 (d, 2H,  $J= 18$  Hz, H-2' y H-6'), 7,02 (d, 2H,  $J= 18$  Hz, H-3' y H-5'), 7,12 (s, 1H, H-8), 3,94 (s, 3H, 7-OCH<sub>3</sub>), 3,85 (s, 3H, 5-OCH<sub>3</sub>), 3,81 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3,73 (s, 3H, 6-OCH<sub>3</sub>).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$  176,2 (C-4), 160,6 (C-4'), 157,1 (C-7), 152,9 (C-9), 152,7 (C-5), 151,4 (C-2), 139,3 (C-3), 134,4 (C-6), 130,2 (C-2' y C-6'), 123,3 (C-1'), 113,5 (C-3' y C-5'), 112,4 (C-10), 96,8 (C-8), 61,9 (5-OCH<sub>3</sub>), 61,0 (6-OCH<sub>3</sub>), 56,4 (7-OCH<sub>3</sub>), 55,3 (4'-OCH<sub>3</sub>)

### Espectros UV del compuesto 22

Se preparó una solución de concentración 1 mg/ml del compuesto **22** disuelto en buffer B (8 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7,6). Se tomaron alícuotas de la solución al momento de prepararla y luego de 30, 60 y 90 min, y se registró su espectro UV entre 200 y 450 nm. La solución se mantuvo al resguardo de la luz en todo momento.

### IV.2.6 *Lippia salsa*

El material vegetal (172 g) fue cortado y colocado a extraer en etanol (96% v/v; 3 l) a temperatura ambiente durante dos semanas. Una vez transcurrido ese tiempo, se filtró el material sólido y el etanol se evaporó en rotavapor con baño de agua a 40°C. Se obtuvieron 34 g de extracto etanólico que fueron suspendidos en 400 ml de agua destilada y extraídos sucesivamente con hexano (3 x 300 ml) y AcOEt (3 x 300 ml) dando origen a las fracciones **I**, **II** y **III**, respectivamente. De acuerdo a su actividad inhibitoria de ACE se purificó la fracción de mayor actividad.

La fracción **II** (1,25 g) fue sometida a cromatografía en columna de sílica gel 60 (60 g) con mezclas de polaridad creciente hexano: AcOEt. Se recolectaron 18

fracciones de 125 ml cada una, que fueron concentradas y agrupadas en 4 fracciones finales ( $F_{i-iv}$ ) según su perfil en cromatofolios de sílica gel con la fase móvil  $CH_2Cl_2:MeOH$  (95:5) y usando *p*-anisaldehído como revelador.

La fracción  $F_{iii}$  (110,4 mg) fue sometida nuevamente a cromatografía en columna, usando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y fase móvil MeOH (400 ml). Se colectaron 6 fracciones ( $F_{1-6}$ ) de 50 ml cada una. El compuesto **26** fue obtenido puro en la fracción  $F_4$  (5,4 mg).

### Compuesto 26

**Luteolina.** RMN de  $^1H$  (400 MHz, MeOD- $d_4$ , ppm)  $\delta$  7,38 (m, 2H, H-2' y H-6'), 6,89 (d, 1H, H-5'), 6,53 (s, 1H, H-3), 6,42 (d, 1H, H-8), 6,19 (d, 1H, H-6).

RMN de  $^{13}C$  (100 MHz, MeOD- $d_4$ , ppm)  $\delta$  183,8 (C-4), 166,3 (C-7), 163,2 (C-2), 162,8 (C-9), 159,4 (C-5), 151,0 (C-4'), 147,0 (C-3'), 123,7 (C-6'), 120,3 (C-1'), 116,8 (C-5'), 114,2 (C-2'), 103,8 (C-10), 99,9 (C-6), 94,8 (C-8).

De la fracción  $F_3$  (7,7 mg) se aisló el compuesto **27** (2,4 mg), luego de cromatografía en capa fina preparativa (Sílica gel  $F_{254}$ ) con la mezcla  $CH_2Cl_2: MeOH$  (95:5).

### Compuesto 27

**Apigenina.** RMN de  $^1H$  (400 MHz, MeOD- $d_4$ , ppm)  $\delta$  7,86 (d, 2H, H-2' y H-6'), 6,94 (d, 2H, H-3' y H-5'), 6,59 (s, 1H, H-3), 6,46 (d, 1H, H-8), 6,20 (d, 1H, H-6).

RMN de  $^{13}C$  (100 MHz, MeOD- $d_4$ , ppm)  $\delta$  183,9 (C-4), 166,5 (C-2), 166,3 (C-7), 163,2 (C-5), 162,8 (C-4'), 159,5 (C-9), 129,4 (C-2' y C-6'), 123,3 (C-1'), 117,0 (C-3' y C-5'), 105,2 (C-10), 103,8 (C-3), 100,3 (C-6), 95,2 (C-8).

**- Referencias  
bibliográficas -**



- Achika DE, Igelige G, Adebisi A. A review on the phytoconstituents and related medicinal properties of plants in the Asteraceae family. *IOSR-JAC*. 2014, 7 (8):1-8.
- Adewusi EA, Fouche G, Steenkamp V. Cytotoxicity and acetylcholinesterase inhibitory activity of an isolated crinine alkaloid from *Boophane disticha* (Amaryllidaceae). *J Ethnopharmacol*. 2012, 143:572-578.
- Adrian-Romero M, Wilson SJ, Blunden G, Yang MH, Carabot-Cuervo A, Bashir AK. Betaines in coastal plants. *Biochem Syst Ecol*. 1998, 26:535-543.
- Alzheimer's Disease International, World Alzheimer Report, 2010: The Global Economic Impact of Dementia. Alzheimer's Disease International 2010, [<http://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport2010.pdf>].
- Agarwal M, Srivastava VK, Saxena KK, Kumar A. Hepatoprotective activity of Beta vulgaris against CCl4-induced hepatic injury in rats. *Fitoterapia*. 2006, 77:91-93.
- Agis-Torres A, Sollhuber M, Fernandez M, Sanchez-Montero JM. Multi-target-directed ligands and other therapeutic strategies in the search of a real solution for Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol*. 2014, 12:2-36.
- Agrawal PK, Bansal MC. Flavonoid glycosides. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam. 1989. 283-364.
- Ahmad I, Anis I, Malik A, Nawaz SA, Choudhary MI. Cholinesterase inhibitory constituents from *Onosma hispidum*. *Chem Pharm Bull*. 2003, 51(4):412-414.
- Ahmed A. Highly oxygenated monoterpenes from *Chenopodium ambrosioides*. *J Nat Prod*. 2000, 63:989-991.
- Ahmed E, Nawaz SA, Malik A, Choudhary I. Isolation and cholinesterase-inhibition studies of sterols from *Haloxylon recurvum*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006, 16:573-580.
- Anand R, Dip Gill K, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future. *Neuropharmacol*. 2014, 76:27-50.
- Arroyo-Leuenberger R, S. C. Amaryllidacea en F. O. Zuloaga & O. Morrone (eds.), Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina I. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard*. 1996, 60:90-100.
- Ashraf M, Foolad MR. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot*. 2007, 59:206-216.
- Awaad AS, Maitland DJ, Donia A, Alqasoumi S, Soliman GA. Novel flavonoids with antioxidant activity from a Chenopodiaceae plant. *Pharm Biol*. 2012, 50 (1):99-104.
- Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*. 2005, 78:431-441.

- Barboza GB, Canter JJ, Nuñez CO, Ariza Espinar L. Flora medicinal de la provincia de Córdoba (Argentina). Museo botánico Córdoba, Córdoba, Argentina. 2006.
- Bardon A, Borkosky S, Ybarra S, Cartagena E. Bioactive plants from Argentina and Bolivia. *Fitoterapia*. 2007, 78:227-231.
- Barron D, Ibrahim RK. 6-methoxyflavonol 3-monosulphates from *Flaveria chloraefolia*. *Phytochem*. 1987, 26 (7):2085-2088.
- Basova NE, Rozengart EV, Suvorov AA. Cholinergic activity of isoquinoline alkaloids from the showy autumn crocus (*Colchicum speciosum* Stev.). *Biochem Biophys*. 2006, 406:27-31.
- Bauer A, Bronstrup M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Nat prod Rep*. 2014, 31:35-60.
- Benamar H, Rached W, Derdour A, Marouf A. Screening of Algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Biol Sci*. 2010, 10 (1):1-9.
- Berkov S, Bastida J, Nikolova m, Viladomat F, Codina C. Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochem Anal*. 2008, 19:411-419.
- Berkov S, Georgieva L, Kondalova V, Viladomat F, Bastida J, Atanassov A, Codina C. The geographic isolation of *Leucojum aestivum* populations leads to divergation of alkaloid biosynthesis. *Biochem Sys Ecol*. 2013, 46:152-161.
- Bores GM, Huger FP, Petko W, Mutlib AE, Camacho F, Rush DK, Selk DE, Wolf V, Kosley Jr RW, Davis L. Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: Acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996, 319:728-738.
- Breinbauer R, Vetter IR, Waldmann H. From protein domains to drug candidates- natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries. *Angew Chem Int. Ed*. 2002, 41: 2878-2890.
- Broussalis AM, Ferraro GE, Martino VS, Pinzon R, Coussio JD, Alvarez JC. Argentine plants as potential source of insecticidal compounds. *J Ethnopharmacol*. 1999, 67:219-223.
- Buhmann A, Papenbrock J. An economic point of view of secondary compounds in halophytes. *Functional Plant Biology Review*. <http://dx.doi.org/10.1071/FP12342>.
- Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod*. 2004, 67: 2141-2153.
- Cabrera A. Fitogeografía de la República Argentina. *Bol Soc Argent Bot*. 1971, 14: 1-48.

Cabrera JL, Juliani HR. Quercetin-3-acetyl-7,3'-4'-trisulphate from *Flaveria bidentis*. *Lloydia*. 1976, 39:253-254.

Cabrera JL, Juliani HR. Isorhamnetin 3,7-disulphate from *Flaveria bidentis*. *Phytochem*. 1977, 16:400.

Cabrera JL, Juliani HR. Two new quercetin sulphates from leaves of *Flaveria bidentis*. *Phytochem*. 1979, 18:510-511.

Cahlíková L, Benesova N, Macakova K, Urbanova, Opletal L. GC/MS analysis of three Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Nat Prod Comm*. 2011, 6 (9):1255-1258.

Cahlíková L, Valterova I, Macakova K, Opletal L. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Braz J Pharmacog*. 2011, 21 (4): 575-580.

Cahlíková L, Macárová K, Benesová N, Chlebek J, Hostálková A, Opletal L. Natural compounds (small molecules) as potential and real drugs of Alzheimer's disease. A critical review. *Studies in natural products chemistry*. 2014, 42: 153-194. Elsevier BV.

Camp D, Davis RA, Evans-Illidge EA, Quinn RJ. Guiding principles for natural product drug discovery. *Future Med Chem*. 2012, 4:1067-1084.

Castellar A, Coelho TS, Silva PEA, Ramos DF, Lourenzo MC, Lage CLS, Juliao LS, Barbosa YG, Leitao SG. The activity of flavones and oleanolic acid from *Lippia lacunosa* against susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Brazilian J Pharmacog*. 2011, 21 (5):835-840.

Castro MJ, Richmond V, Romero C, Maier MS, Estévez Braun A, Gutiérrez Ravelo A, Faraoni MB, Murray AP. Preparation, anticholinesterase activity and molecular docking of new lupane derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2014, 22: 3341-3345.

Castro MJ. Síntesis de derivados con potencial actividad anticolinesterasa. 2015. Tesis Doctoral. Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur.

Cavallaro V. Actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa de *Habranthus tubispathus*. 2010. Tesina para optar al grado de Licenciado en Química. Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur.

Chung SY, Moriyama T, Uezu E, Uezu K, Mirata R, Yohena H, Masuda Y, Kokubu T, Yamamoto S. Administration of phosphatidylcholine increases brain acetylcholine concentration and improves memory in mice with dementia. *J Nutr*. 1995, 125:1484-1489.

Churches QI, Caine J, Cavanagh K, Epa VC, Waddington L, Tranberg E, Meyer AG, Varghese JN, Streltsov V, Duggan PJ. Naturally occurring polyphenolic inhibitors of amyloid beta aggregation. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014, 24:3108-3114.

Correia da Silva M, Sousa E, Pinto MM. Emerging sulfated flavonoids and other polyphenols as drugs: nature as an inspiration. *Med Res Rev.* 2013, 0:1-57.

Čolovič MB, Kristič D, Lazarevič-Pašti TM, Bondžič AM, Vasič VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol.* 2013, 11:315-335.

Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod.* 1997, 60:52-60.

Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta.* 2013, 1830:3670-3695.

Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. New horizons for old drugs and drug leads. *J Nat Prod.* 2014, 77:703-723.

Cuadra V, Herman PM. Anatomía foliar y caulinar de tres Salicornieae (Chenopodiaceae) halófilas argentinas. *Rev Int Bot Exp.* 2007, 83:369-377.

Cuadra VP, Cambi VN. Ocurrencia de caracteres anatómicos funcionales foliares y caulinares en 35 especies xero-halófitas. *Bol Soc Argent Bot.* 2014, 49 (3):347-359.

Cui L, Su X. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisin. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009, 7:999-1013.

Cummings JL, Morstorf T, Zhong K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Res Ther.* 2014, 6:37-44.

Cureno Barrales HK, Soto Hernandez M. Bioquímica de los taxoides utilizados contra el cáncer. *REB.* 2011, 30:12-20.

de Andrade JP, Pigni NB, Torras-Claveria L, Berkov S, Codina C, Viladomat F, Bastida J. Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetti*: Mass spectral studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2012, 70:13-25.

Der Marderosian A, Beutler JA. The review of natural products. *Facts and Comparisons.* 2002, 13-43.

Di Giovanni S, Borloz A, Urbain A, Marston A, Hostettmann K, Carrupt PA, Reist M. *In vitro* "screening" assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors. *Eur J Pharm Sci.* 2008, 33:109-119.

Dang QL, Lee GY, Choi YH, Choi GJ, Jang KS, Park MS, Han YH, Lim CH, Kim JC. Insecticidal activities of crude extracts and phospholipids from *Chenopodium ficifolium* against melon and cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Crop Prot.* 2010, 29:1124-1129.

Dembitsky VM. Betaine ether-linked glycerolipids: chemistry and biology. *Prog Lipid Res.* 1996, 35:1-51.

Devor KA, Mudd JB. Structural analysis of phosphatidylcholine of plant tissue. *J Lipid Res.* 1971, 12(4):396-402.

- Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012, 2:303-336.
- Dinan L, Whiting P, Scott A. Taxonomic distribution of phytoecdysteroids in seeds of members of the chenopodiaceae. *Biochem Sys Ecol*. 1998, 26:553-576.
- Dini I, Tenore GC, Schettino O, Dini A. New Oleanane saponins in *Chenopodium quinoa*. *J Agric Food Chem*. 2001, 49:3976-3981.
- Dueñas M, Gonzalez-Manzano S, Surco-Laos F, Gonzalez-Paramas A, Santos-Buelga C. Characterization of Sulfated Quercetin and Epicatechin Metabolites. *J Agric Food Chem*. 2012, 60: 3592-3598.
- Dzoyem JP, Eloff JN. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. *J Ethnopharmacol*. 2015, 160:194-201.
- El-Shazli AM, Dora G, Wink M. Alkaloids of *Haloxylon salicornicum* (Moq.) Bunge ex Boiss. (Chenopodiaceae). *Pharmazie*. 2005, 60:949-952.
- Elgorashi EE, Stafford GI, van Staden J. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med*. 2004, 70: 258-260.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961, 7:88-95.
- Fang Z, Jeong SY, Jung HA, Choi JS, Min BS, Woo MH. Anticholinesterase and antioxidant constituents from *Gloiopeltis furcata*. *Chem Pharm Bull*. 2010, 58 (9):1236-1239.
- Ferreres F, Castaner M, Tomas-Barberan FA. Acylated flavonol glycosides from spinach leaves (*Spinacea oleracea*). *Phytochem*. 1997, 45 (8):1701-1705.
- Fuentes-Bazan S, Mansion G, Borsch T. Towards a species level tree of the globally diverse genus *Chenopodium* (Chenopodiaceae). *Mol Phylogenet Evol*. 2012, 62(1):359-374.
- Funk VA, Bayer RJ, Keeley S, Chan R, Watson L, Gemeinholzer B, Schilling E, Panrelo JL, Bladwin BG, Garcia-Jacas N. Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biol Skr Editor Friis I, Balslev H*. 2005, 55:343-373.
- Furukawa-Hibi Y, Alkam T, Nitta A, Mtsuyama A, Miyoguchi H, Suzuki K, Moussaoui S, Yu QS, Greig NH, Nagai T, Yamada K. Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- $\beta$  peptide in mice. *Behav Brain Res*. 2011, 225:222-229.

García-Ayllón MS, Small D, Avila J, Sáez-Velero J. Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: cross-talk with P-tau and  $\beta$ -amiloid. *Front Mol Neurosci*. 2011, 4:1-9.

Gardner RL, Kerst AF, Wilson DM, Payne MG. Beta vulgaris L: the characterization of three polyphenols isolated from the leaves. *Phytochem*. 1967, 6:417-422.

Ghosal S, Srivastav RS. 3-phenethylamine, tetrahydroisoquinoline and indole alkaloids of *Desmodium tiliaefolium*. *Phytochem*. 1973, 12:193-197.

Greemblatt HM, Kryger G, Lewis T, Silman I, Sussman JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Lett*. 1999, 463 (3): 321-326.

Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, Yu QS, Mamczarz J, Holloway HW, Giordano T, Chen DM, Furukawa K, Sambamurti K, Brossi A, Lahiri DK. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholines, augments learning and lowers Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide in rodent. *P Natl Acad Sci USA*. 2005, 22:17213-17218.

Goure WF, Krafft GA, Jerecic J, Hefti F. Targeting the proper amyloid-beta neuronal toxins: a path forward for Alzheimer's disease immunotherapeutics. *Alzheimers Res Ther*. 2014, 6:42-57.

Guglielmone HA, Agnese AM, Nunez Montoya SC, Cabrera JL. Inhibitory effects of sulphated flavonoids isolated from *Flaveria bidentis* on platelet aggregation. *Throm Res*. 2002, 105:183-188.

Guglielmone HA, Agnese AM, Nunez Montoya SC, Cabrera JL. Anticoagulant effect and action mechanism of sulphated flavonoids. *Throm Res*. 2005, 115:495-502.

Guglielmone HA, Nunez Montoya SC, Agnese AM, Pellizas CG, Cabrera JL, Donadio AC. Quercetin 3,7,3',4'-tetrasulphated isolated from *Flaveria bidentis* inhibits tissue expression in human monocyte. *Phytomed*. 2012, 19:1068-1071.

Guo AJY, Xie HQ, Choi RCY, Zheng KYZ, Bi CWC, Xu SL, Dong TX, Tsim KWK. Galangin, a flavonol derived from *Rhizoma Alpiniae Officinarum*, inhibits acetylcholinesterase activity in vitro. *Chem-Biol Interact*. 2010, 187: 246-248.

Hagene P. Variation in the ascorbic content in *Salicornia*. *Comptes Rendus*. 1958, 246:809-812.

Harborne JB. The Flavonoids-Advances in Research since 1986. 1984. Chapman and Hall, London. pp. 450-451.

Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam M, Bhowmik PC, Hossain A, Rahman MM, Prasad MN, Ozturk M, Fujita M. Potential Use of Halophytes to Remediate Saline Soils. Hindawi Publishing Corporation. BioMed Research International. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/589341>

Heywood VH, Brummitt RK, Culham A, Seberg O. Asteraceae. Flowering plants families of the world, Firefly Books. 2007. Pag 46-51.

Houghton JP, Agbedahunsi JM, Adegbulugbe A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. *Phytochem.* 2004, 65: 2893-2896.

Houghton PJ, Ren Y, Howes MJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat Prod Res.* 2006, 23:181-199.

Huang L, Shi A, He F, Li X. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of berberine derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2010, 18:1244-1251.

Hunziker AT, Arroyo SC. Amaryllidaceae, en A. T. Hunziker (ed.). Los géneros de Fanerógamas de la Argentina. *Bol. Soc. Argen. Bot.* 1984, 23:271.

Hussain S, Ahmed E, Malik A, Jabbar A, Ashraf M, Lodhi MA, Choudhary MI. Halosterols A and B, Chymotrypsin inhibitory sterols from *Haloxylon recurvum*. *Chem Pharm Bull.* 2006, 54 (5):623-625.

Imada S, Matsuo N, Acharya K, Yamanaka N. Effects of salinity on fine root distribution and whole plant biomass of *Tamarix ramosissima* cuttings. *J Arid Environ.* 2015, 114:84-90.

Ji HF, Zhang HY. Theoretical evaluation of flavonoids as multipotent agents to combat Alzheimer's disease. *THEOCHEM.* 2006, 767:3-9.

Jin Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2013, 30:849-868.

Juliani HR, Koroch A, Sinom JE. Essential Oils from Argentinean Aromatic Plants. *Acta Hort.* 2002, 629:491-498.

Kachroo A, Kachroo P. Fatty acid-derived signals in plant defense. *Annu Rev Phytopathol.* 2009, 47:153-176.

Kamel MS, Mohamed KM, Hassanean HA, Ohtani K, Kasai R, Yamasaki K. Acylated flavonoid glycosides from *Bassia muricata*. *Phytochem.* 2001, 57:1259-1262.

Kapadia GJ, Tokuda H, Konoshima T, Nishino T. Chemoprevention of lung and skin cancer by *Beta vulgaris* (beet) root extract. *Cancer Lett.* 1996, 100:211-214.

Katalinic M, Rusak G, Domacinovic Barovic J, Sinko G, Jelic D, Antolovic R, Kovarik Z. Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *Eur J Med Chem.* 2010, 45:186-192.

Kim MR, Shim JY, Park KH, Imm BJ, Oh S, Imm JY. Optimization of the enzymatic modification of egg yolk by phospholipase A2 to improve its functionality for mayonnaise production. *Food Sci Technol.* 2009, 42:250-255.

Kim MH, Kim SH, Yang WM. Mechanisms of action of phytochemicals from medicinal herbs in the treatment of Alzheimer's disease. *Planta Med.* 2014, 80:1289-1258.

Kobayashi S, Takeda S, Ishikawa H, Matsumoto H, Kihara M, Shingu T, Numata A, Uyeo S. Alkaloids of the Amaryllidaceae. A new alkaloid, sanguinine, from *Lycoris sanguinea* Maxim. var *kiushiana* Makino, and pretazettine from *Lycoris radiata* Herb. *Chem Pharm Bull.* 1976, 24(7):1537-1543.

Konrath EL, dos Santos Passos C, Klein-Junior LC, Henriques A. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J Pharm Pharmacol.* 2013, 65:1701-1725.

Krause J, Tobin G. Discovery, development and regulation of natural products. Using old solutions to new problems-Natural drug discovery in the 21<sup>st</sup> century. INTECH. 2013. Chapter 1. ISBN 978-953-51-1158.

Kreh M, Matusch R, Witte L. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochem.* 1995, 38 (3):773-776.

Ksouri R, Ksouri WM, Jallali I, Debez A, Magne C, Hiroko I, Abdelly C. Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2011, 1-38.

Kuljanabhadgavad T, Thongphasuk P, Chamulitrat W, Wink M. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochem.* 2008, 69:1919-1926.

Kumpun S, Maria A, Crouzet S, Evrard-Todeschi N, Girault JP, Lafont R. Ecdysteroids from *Chenopodium quinoa* Willd., an ancient Andean crop of high nutritional value. *Food Chem.* 2011, 125:1226-1234.

Lachance H, Wetzel S, Kumar K, Waldmann H. Charting, navigating and populating natural product chemical space for drug discovery. *J Med Chem.* 2012, 55:5989-6001.

Lamberto SA, Valle AF, Aramayo EM, Andrada AC. Manual ilustrado de las plantas silvestres de la región de Bahía Blanca. 1997. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur (Ed.). Bahía Blanca, Argentina. 1-548.

Lefranc F, Sauvage S, Van Goietsenoven G, Megalizzi V, Lamoral-Theys D, Debeir O, Piegler-Kreinecker S, Berger W, Mathieu V, Decaestecker C, Kiss R. Narciclasine, a plant growth modulator, activates Rho and stress fibers in glioblastoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2009, 8(7):1739-1750.

Lisa TA, Garrido MN, Domenech CE. Induction of acid phosphatase and cholinesterase activities in *Ps. Aeruginosa* and their in-vitro control by choline, acetylcholine and betaine. *Mol Cell Biochem.* 1983, 50: 149-155.

Liu H, Mou Y, Zhao J, Wang J, Zhou L, Wang M, Wang D, Han J, Yang F. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules.* 2010, 15: 7933-7945.



Liu R, Meng F, Zhang L, Liu A, Qin H, Lan X, Li L, Du g. Luteolin isolated from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa* (Labiatae) prevents copper-mediated toxicity in  $\beta$ -amiloid precursor protein Swedish mutation overexpressing SH-SY5Y cells. *Molecules*. 2011, 16:2084-2096.

Lombardo S, Maskos U. Role of nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacol*. 2014, en prensa.

López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci*. 2002, 71:2521-2529.

Martins A, Vieire H, Gaspar H, Santos S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. *Mar Drugs*. 2014, 12:1066-1101.

Meerow AW, Snijman DA. Amaryllidaceae. *The Families and Genera of Vascular Plants III*. 1998, 83-110. Springer-Verlag, Berlín

Miftakhova AF, Burasheva GS, Abilov ZA, Ahmad VU, Zahid M. Coumarins from the aerial part of *Halocnemum strobilaceum*. *Fitoterapia*. 2001, 72:319-321.

Monteagudo ES, Burton G, Gonzalez CM, Oberti JC, Gros EG. 14 $\beta$ ,17 $\beta$ -Dihydroxywhitanolides from *Jaborosa bergii*. *Phytochem*. 1988, 27:3925-3928.

Motohashi N, Mori I, Sugiura Y. <sup>13</sup>C-Nuclear magnetic resonance and Raman spectroscopic studies on ionization and mercury complex of ergothioneine. *Chem Pharm Bull*. 1976, 24 (8):1737-1741.

Moudi M, Go R, Yien CYS, Nazre M. Vinca alkaloids. *Int J Prev Med*. 2013, 4:1231-1235.

Múlgura ME, Rotman AD, Atkins S. Verbenaceae. Tribu II. Lantaneae, parte A. Flora Fanerogámica Argentina. Ed. Anton y Zuloaga. 2003, 84:3-46.

Murray AP, Rodriguez SA, Frontera MA, Tomas MA, Mulet MC. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z Naturforsch C*. 2004, 59: 477-480.

Murray AP, Rodriguez SA, Murray MG. Antioxidant activity and chemical composition of essential oils from *Schinus fasciculata* (Griseb.) I.M. Johnst and *Schinus praecox* (Griseb.) Speg. *Nat Prod Comm*. 2008, 3 (9): 1551-1556.

Murray MG, Galán C, Villamil CB. Aeropalynological research in Salitral de la Vidriera, Buenos Aires province, Argentina. *Aerobiol*. 2008, 24:181-190.

Murray AP, Faraoni MB, Castro MJ, Alza NP, Cavallaro V. Natural AchE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol*. 2013, 11:388-413.

- Nagata T, Yaguchi T, Nishizaki T. DL- and PO-phosphatidylcholines as a promising learning and memory enhancer. *Lipids Health Dis.* 2011, 10:25-30.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod.* 2003, 66:1022-1037.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.* 2007, 70:461-477.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981-2010. *J Nat Prod.* 2012, 75:311-335.
- Nicotra VE, Gil R, Vaccarini C, Oberti JC, Burton G. 15, 21-cyclowhitanolides from *Jaborosa bergii*. *J Nat Prod.* 2003, 66:1471-1475.
- Niemeyer HM. Composition of essential oils from five aromatic species of Asteraceae. *J Essent Oil Res.* 2009, 21(4):350-353.
- Nisbet RM, Polanco JC, Ittner LM, Gotz J. Tau aggregation and its interplay with amyloid- $\beta$ . *Acta Neuropathol.* 2015, 129:207-220.
- Nishizaki T, Kano T, Gotoh A. DL-/PO-phosphatidylcholine may shed light on the treatment of Alzheimer dementia. *Pers Med Univ.* 2013, 2: 12-15.
- Ortiz JE, Berkov S, Pigni N, Theoduloz C, Roitman G, Tapia A, Bastida J, Feresin GE. Wild Argentinian Amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids. *Molecules.* 2012, 17:13473-13482.
- Oueslati S, Ksouri R, Falleh H, Pichette A, Abdelly C, Legault J. Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Suaeda fruticosa* Forssk. *Food Chem.* 2012, 132: 943-947.
- Pacheco P, Silva M, Steglich W. Alkaloids of Chilean Amaryllidaceae I. Hippeastidine and epi-homolycorine two novel alkaloids. *Rev Lat Am Quim.* 1978, 9:28-32.
- Pacheco C, Silva M, Sammes P, Watson W. Estudio químico en Amaryllidaceae chilenas II. Nuevos alcaloides de *Hippeastrum ananuca* Phil. *Bol Soc Chil Quim.* 1982, 27:289-290.
- Pagliosa LB, Monteiro SC; Silva KB, de Andrade JP, Dutilh J, Bastida J, Cammarotab M, Zuanazzi JAS. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. *Phytomed.* 2010, 17:698-701.
- Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sanchez Mata D, Villar A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol.* 2001, 76:201-214.
- Pastor de Abram A, Zelada Mariluz BR. Estudio fitoquímico de *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze (Asteraceae). *Rev Soc Quim Peru.* 2006, 72:1-5.

- Patridge E, Gareiss P, Kinch MS, Hoye D. An analysis of FDA-approved drug: natural products and their derivatives. *Drug Discov Today*. 2015, en prensa.
- Pereyra de Santiago OJ, Juliani HR. Isolation of quercetin 3,7,3',4'-tetrasulphate from *Flaveria bidentis* L. Otto Kuntze. *Experientia*. 1972, 28 (4):380-381.
- Pérez Cuadra V, Hermann PM. Anatomía foliar y caulinar de tres Salicornieae (Chenopodiaceae) halófilas argentinas. *Rev Arg Bot Exp*. 2014, 83:369-377.
- Piatelli M, Minale L, Prota G. Pigments of Centrospermae III: Betaxhantines from *Beta vulgaris* L. *Phytochem*. 1965, 4:121-125.
- Powell AM. Systematics of *Flaveria* (Flaveriinae-Asteraceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 1978, 65 (2):590-636.
- Ravenna PF. Amaryllidaceae. In Flora Patagónica. 1969. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Correa MN. (Ed.). Buenos Aires, Argentina. 152–164
- Ravenna PF. New species of South American *Habranthus* and *Zephyranthes* (Amaryllidaceae). *Onira* 1988, 1:53-56.
- Rhee IK, Van de Meent M, Ingkaninan K, Verpoorte. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from *Amaryllidaceae* using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J Chromatogr A*. 2001, 915:217-223.
- Rodríguez SA, Murray AP. Antioxidant activity and chemical composition of essential oil from *Atriplex undulata*. *Nat Prod Comm*. 2010, 5(11):1841-1844.
- Rodríguez Patino JM, Caro AL, Rodríguez Niño MR, Mackie AR, Gunning AP, Morris VJ. Some implications of nanoscience in food dispersion formulations containing phospholipids as emulsifiers. *Food Chem*. 2009, 102(2):532–541.
- Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernandez I, Alban J, Locka O. Antimicrobial activity of selected medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2003, 88:199-204.
- Rosen J, Gottfries J, Muresan S, Backlund A, Oprea TI. Novel chemical space exploration via natural products. *J Med Chem*. 2009, 52:1953-1962.
- Rotman GI, Castillo A. Presence of *Habranthus cardenasianus* (Amaryllidaceae) in Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot*. 2006, 41 (1-2):95-98.
- Russo P, Frustaci A, Del Bufalo A, Fini M, Cesario A. Multitarget drugs of plants origin acting on Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*. 2013, 20:1686-1693.
- Sacan O, Yanardag R. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla). *Food Chem Toxicol*. 2010, 48:1275-1280.
- Sawmiller D, Li S, Shahaduzzaman M, Smith AJ, Obregon D, Giunta B, Borlongan CV, Sanberg PR, Tan J. Luteolin reduces Alzheimer's disease pathologies induced by traumatic brain injury. *Int J Mol Sci*. 2014, 15:895-904.

Scmidt J, Kuhnt C, Adam G. Brassinosteroids and sterols from seeds of *Beta vulgaris*. *Phytochem*. 1994, 36:175-177.

Shi A, Huang L, Lu C, He F, Li X. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of novel triazole-containing berberine derivatives as acetylcholinesterase and  $\beta$ -amyloid aggregation inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2011, 19:2298-2305.

Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoo H. Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure–activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *Biochim Biophys Acta*. 2008, 1780:819-825.

Silva T, reis J, Teixeira J, Borges F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: from natural products to drug prototypes. *Ageing Res Rev*. 2014, 15:116-145.

Singh M, Kaur M, Kukreja H, Chugh R, Silakari O, Singh D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapy: from nerve toxins to neuroprotection. *Eur J Med Chem*. 2013, 70:165-188.

Su Y, Wang Q, Wang C, Chan K, Sun Y, Kuang H. The treatment of Alzheimer's disease using Chinese medicinal plants: from disease models to potential applications. *J Ethnopharmacol*. 2014, 152:403-423.

Suganthy N, Pandian SK, Devi KP. Cholinesterase inhibitory effects of *Rhizophora lamarckii*, *Avicennia officinalis*, *Sesuvium portulacastrum* and *Suaeda monica*: Mangroves inhabiting an Indian coastal area (Vellar Estuary). *J Enz Inhib Med Chem*. 2009, 24 (3):702-707.

Takos Am, Rook F. Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *Int J Mol Sci*. 2013, 14:11713-11741.

Tayeb HO, Yang HD, Price BH, Tarazi FI. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacol Therapeut*. 2012, 134:8-25.

Tundis R, Menichini F, Conforti F, Loizzo MR, Bonesi M, Statti G, Menichini F. A potential role of alkaloid extracts from *Salsola* species (Chenopodiaceae) in the treatment of Alzheimer's disease. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2009, 24 (3):818-824.

Uriarte-Pueyo I, Calvo MI. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Med Chem*. 2011, 18:5289-5302.

Van Nieuwenhuyzen W. The industrial uses of special lecithins: a review. *J Am Oil Chem Soc*. 1981, 58: 886-888.

Vela Gurovic, MS. Metabolitos secundarios bioactivos aislados a partir de plantas silvestres de la región de Bahía Blanca. 2009. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur.

Vela Gurovic S, Castro MJ, Richmond MV, Faraoni MB, Maier MS, Murray AP. Triterpenoids with acetylcholinesterase inhibition from *Chuquiraga erinacea* D. Don. subsp. *erinacea* (Asteraceae). *Planta Med.* 2009, 75:1-4.

Verettoni HN. Contribución al conocimiento de las plantas medicinales de la región de Bahía Blanca. 1985. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur. Ed. Harris y Cia SRL.

Wang RF, Yang XW, Ma CM, Cai SQ, Li JN, Shoyama Y. A bioactive alkaloid from the flowers of *Trollius chinensis*. *Heterocycles.* 2004, 63 (6):1443-1448.

Wang Q, Liu X, Shan Y, Guan F, Chen Y, Wang X, Wang M, Feng X. Two new nortriterpenoid saponins from *Salicornia bigelovii* Torr. and their cytotoxic activity. *Fitoter.* 2012, 83 (4), 742-749.

Wang YH, Wan QL, Gu CD, Luo HR, Long CL. Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chem Cent J.* 2012, 6:96-102.

Wang P, Yuan HH, Zhang X, Li YP, Shang LQ, Yin Z. Novel lycorine derivatives as anticancer agents: synthesis and *in vitro* biological evaluation. *Molecules.* 2014, 19:2469-2480.

Watson WH, Volker Z. Hippeastidine C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N. *Cryst Struct Comm.* 1982, 11:157-165.

Wattmo C, Londos E, Minthon L. Response to cholinesterase inhibitors affects lifespan in Alzheimer's disease. *BMC Neurol.* 2014, 14:173-183.

Ybarra MI, Borkosky SA, Catalán CA, Cerda-García-Rojas CM, Joseph-Nathan P. Diterpenes from *Hyalis argentea*. *Phytochem.* 1996, 44 (3):479-483.

Zhao L, Hou L, Sun H, Yan X, Sun X, Li J, Bian Y, Chu Y, Liu Q. Apigenin isolated from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa* prevents  $\beta$ -Amyloid 25–35-induced toxicity in rat cerebral microvascular endothelial cells. *Molecules.* 2011, 16:4005-4019.

Zhao L, Wanh J, Liu R, Li XX, Li JF, Zhang L. Neuroprotective, anti-Amyloidogenic and neurotrophic effects of Apigenin in an Alzheimer's disease mouse model. *Molecules.* 2013, 18:9949-9965.

Zhao L, Wang JL, Wang Y, Fa X. Apigenin attenuates copper-mediated  $\beta$ -amyloid neurotoxicity through antioxidation, mitochondrion protection and MAPK signal inactivation in an AD cell model. *Brain Res.* 2013, 1492:33-45.

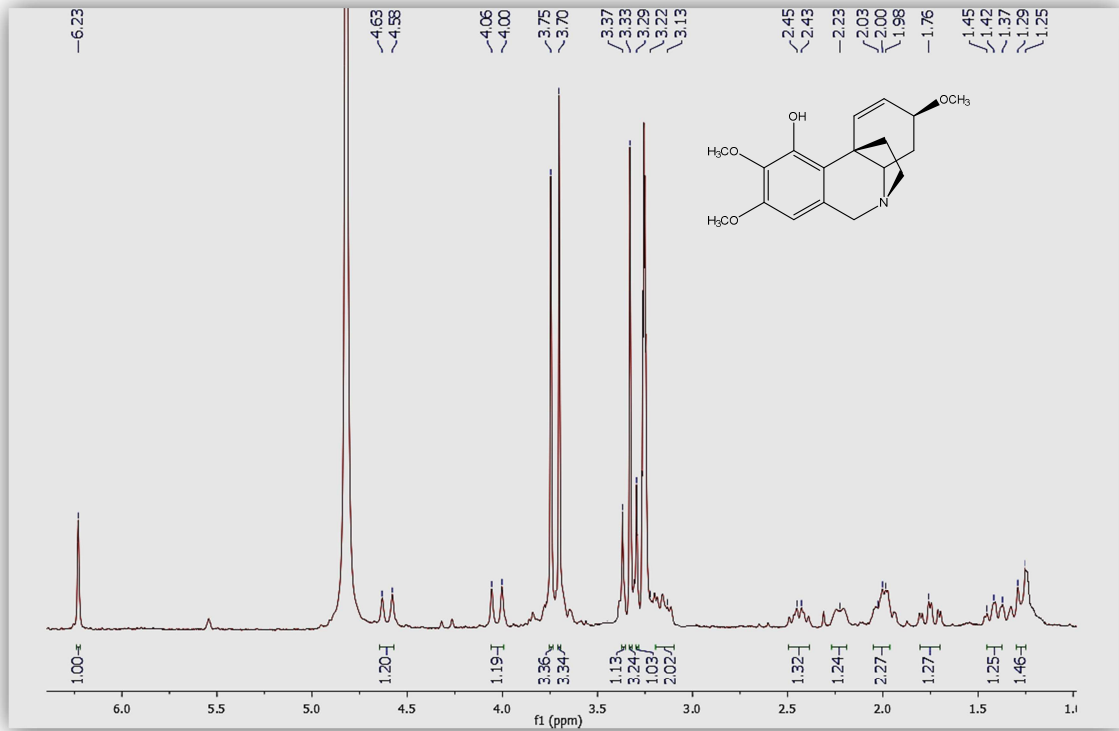
Zheng N, Peng Y, Changhao L, Jun W, Jian H. Luteolin reduces BACE1 expression through NF- $\kappa$ B and estrogen receptor mediated pathways in HEK293 and SH-SY5Y cells. *J Alz Dis.* 2015, 45:2.

Zhou F, Chen S, Xiong J, Li Y, Qu L. Luteolin Reduces zinc-induced tau phosphorylation at Ser262/356 in an ROS-dependent manner in SH-SY5Y cells. *Biol Trace Elem.* 2012, 149 (2):273-279.

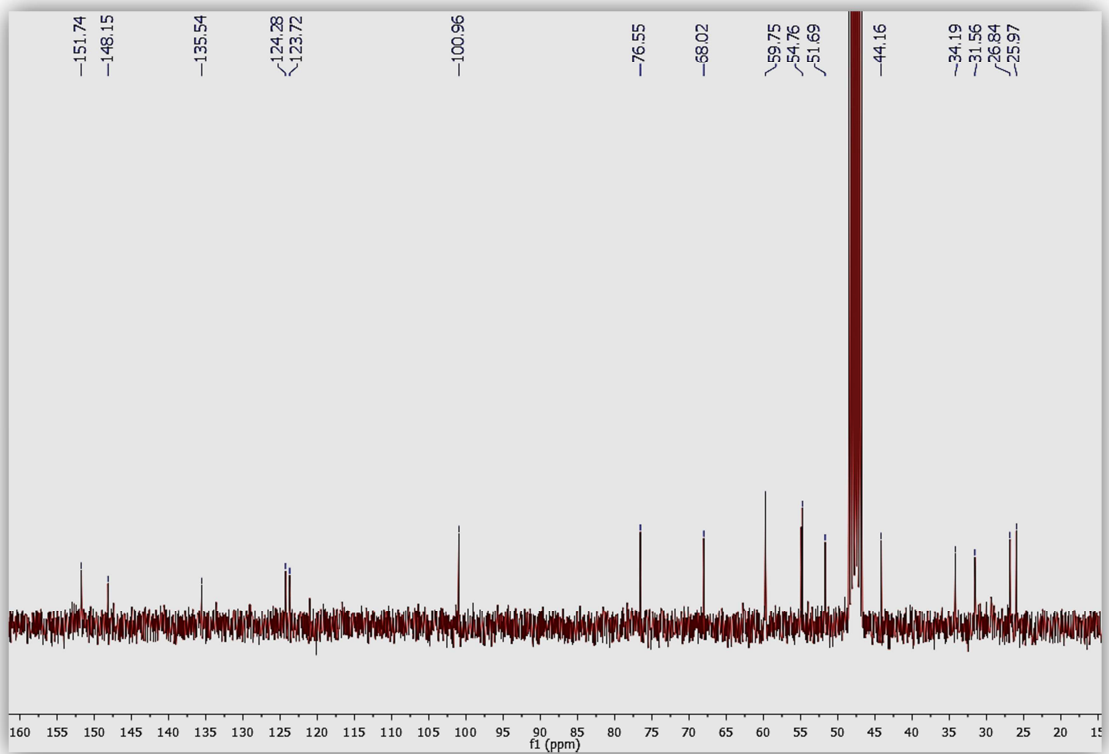
Zuloaga FO, Morrone O, Belgrano MJ, Marticorena C, Marchesi E. (Eds). Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. 2008, Vol 107, St. Louis, Missouri, 1–983.

**- Anexo de  
Espectros -**

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **6** (MeOD)

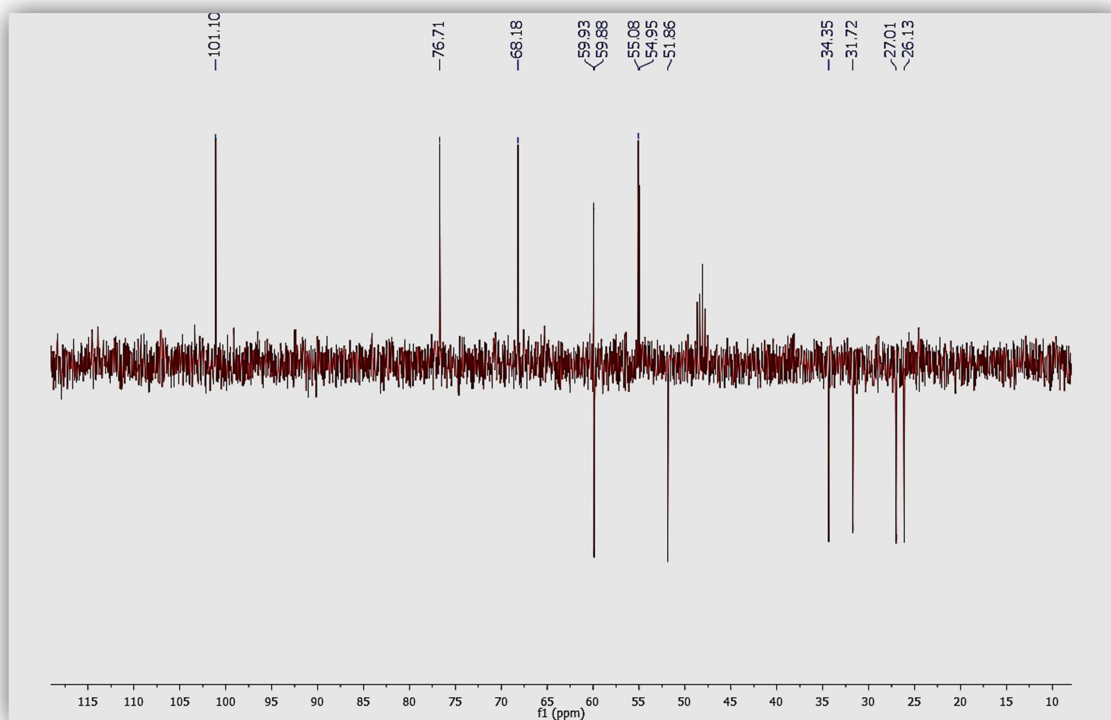


Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **6** (MeOD)

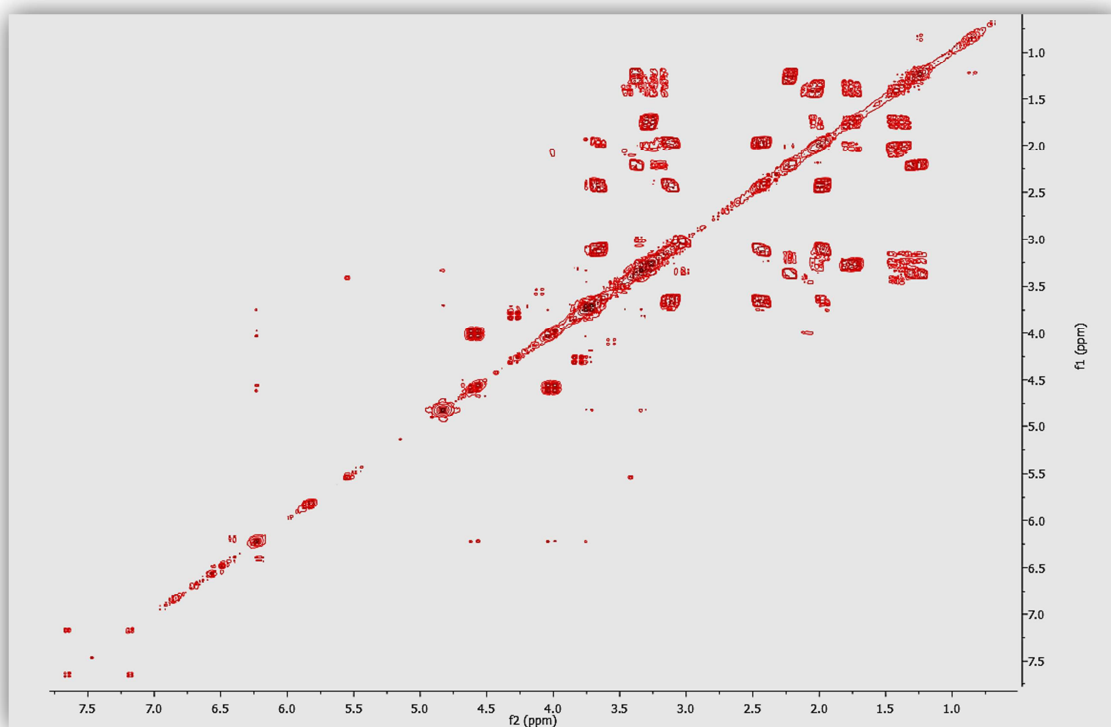




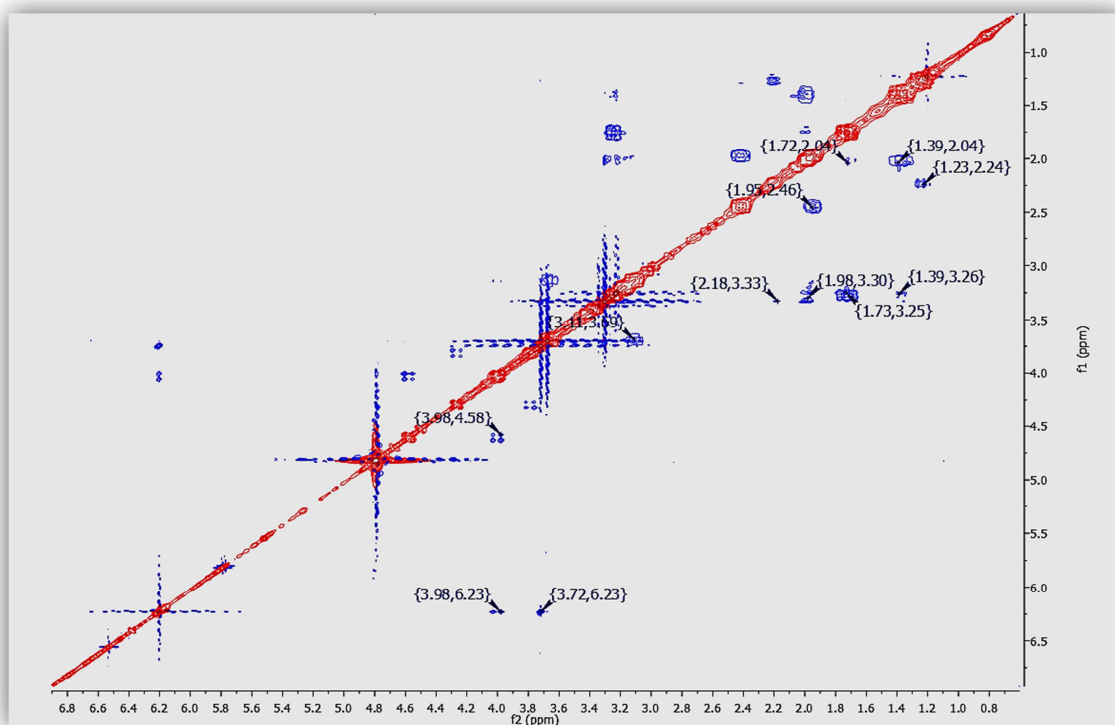
Espectro DEPT del compuesto **6** (MeOD)



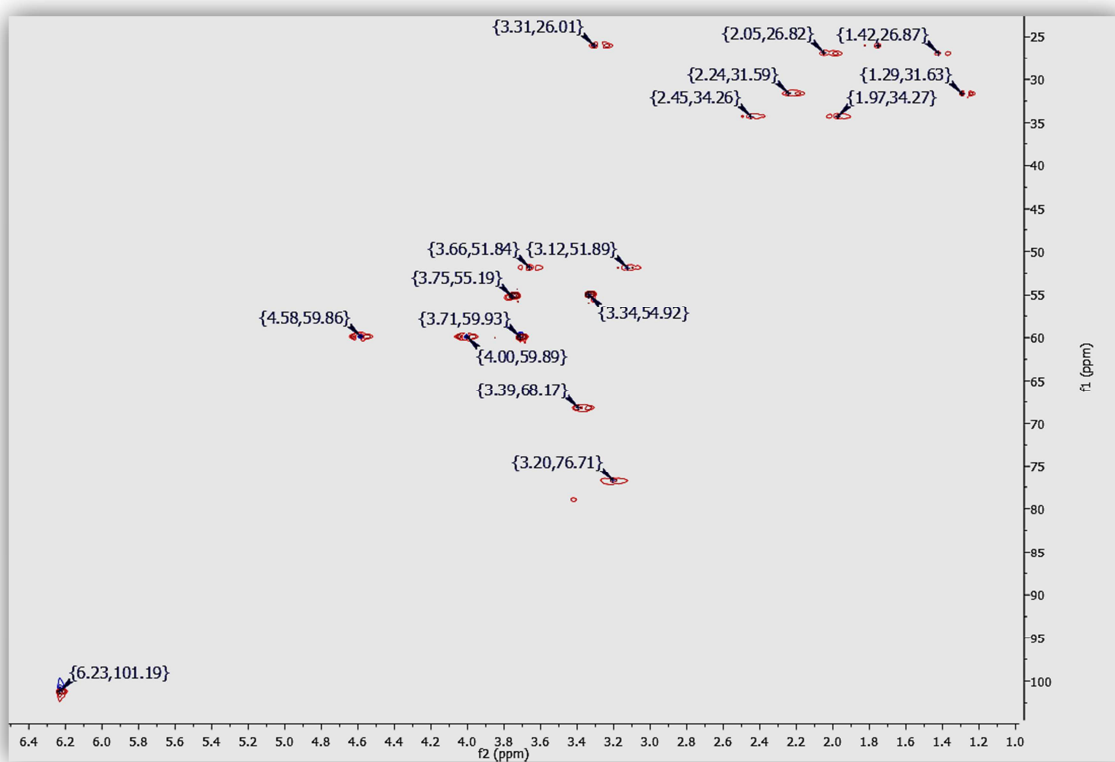
Espectro COSY del compuesto **6** (MeOD)



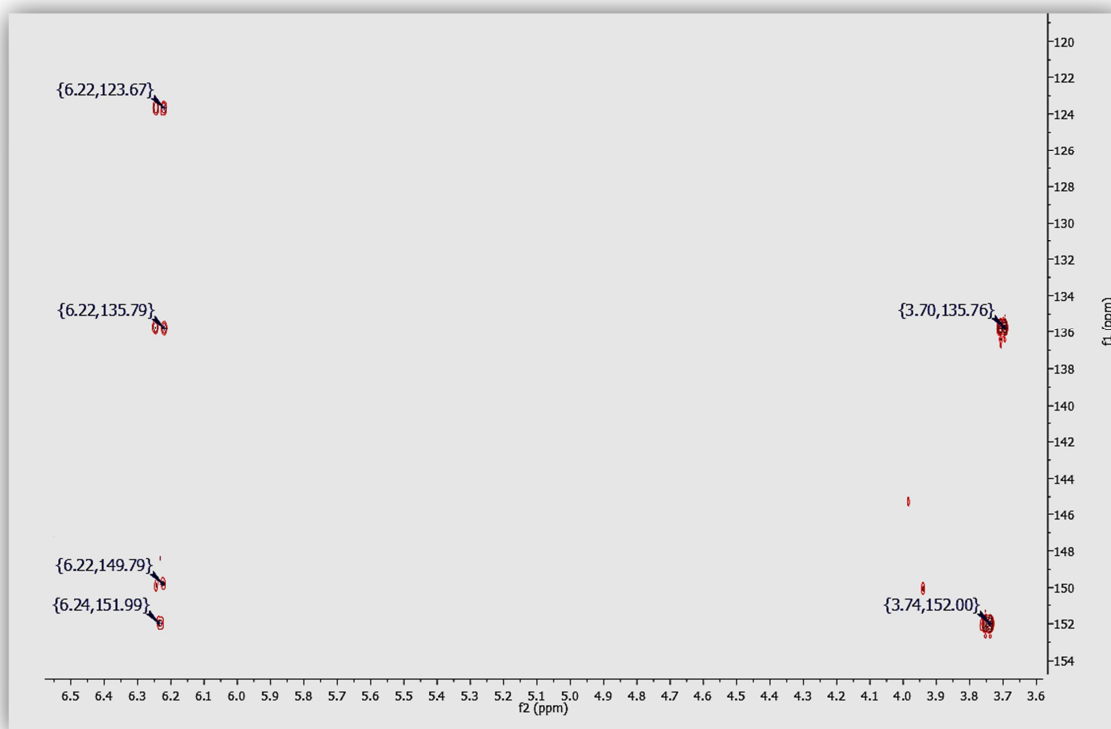
Espectro NOESY del compuesto 6 (MeOD)



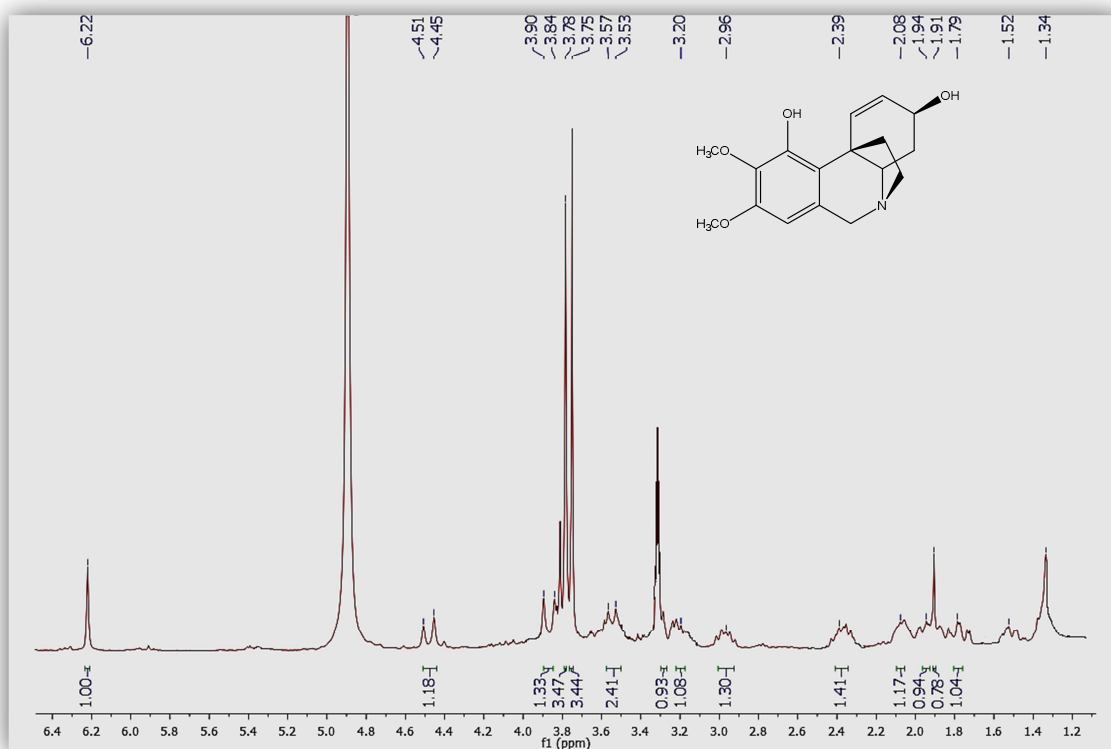
Espectro HSQC del compuesto 6 (MeOD)



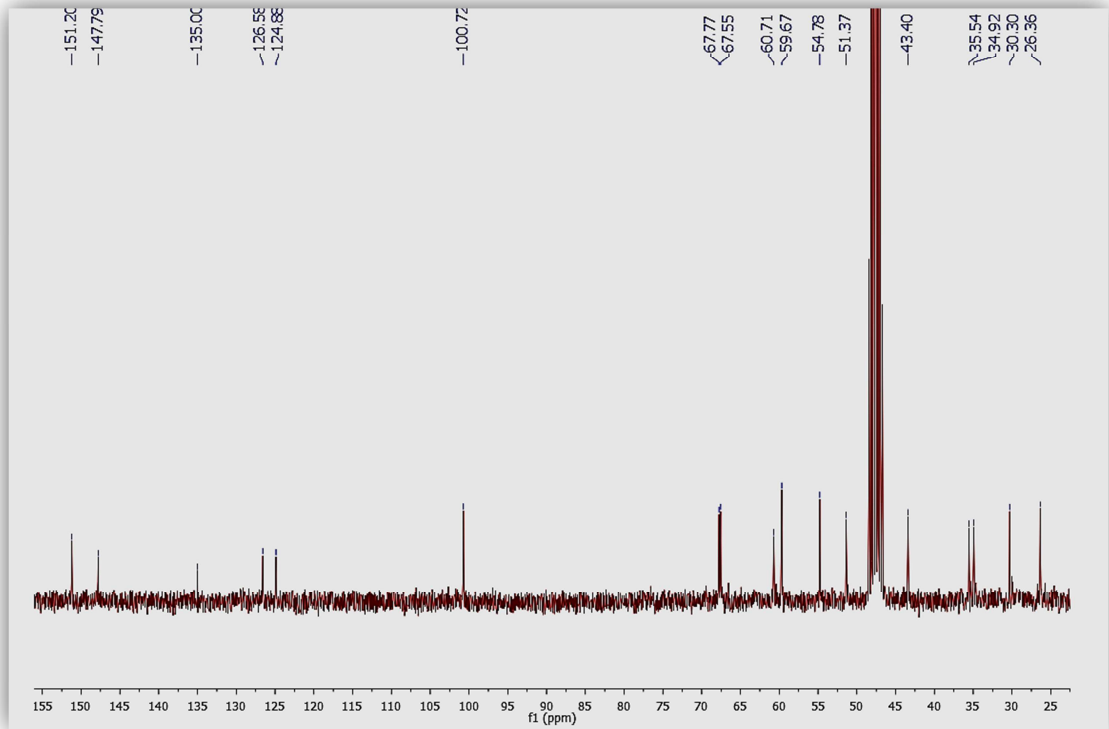
Espectro HMBC del compuesto **6** (MeOD)



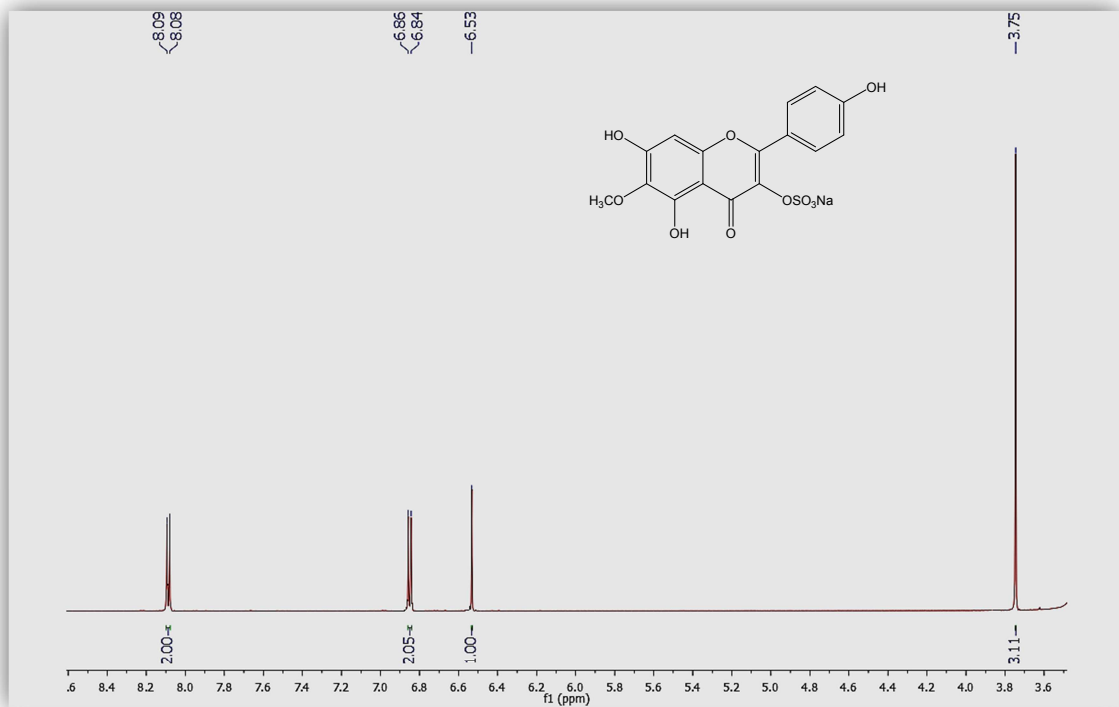
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **16** (MeOD)



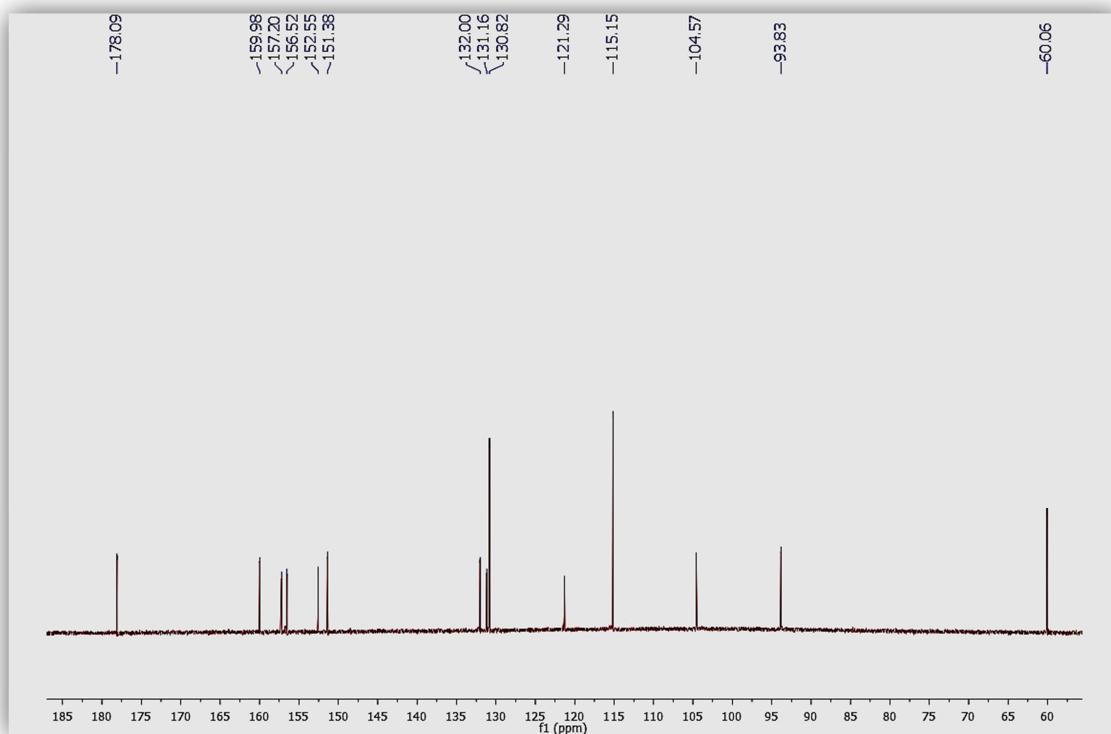
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **16** (MeOD)



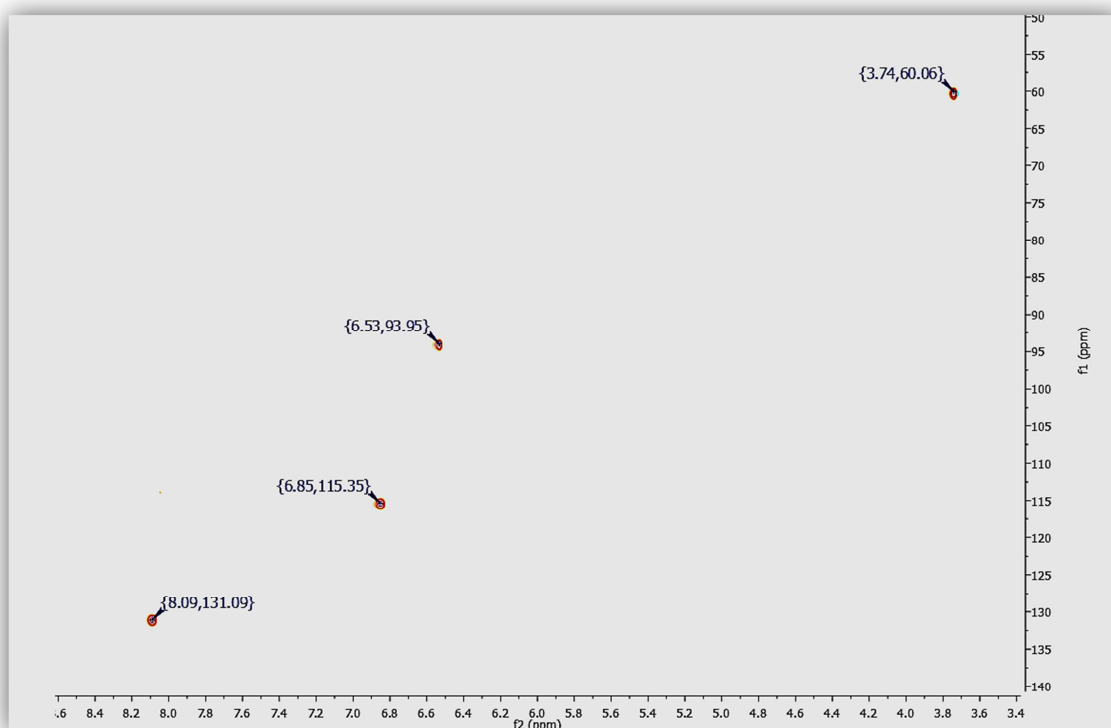
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **22** (DMSO)



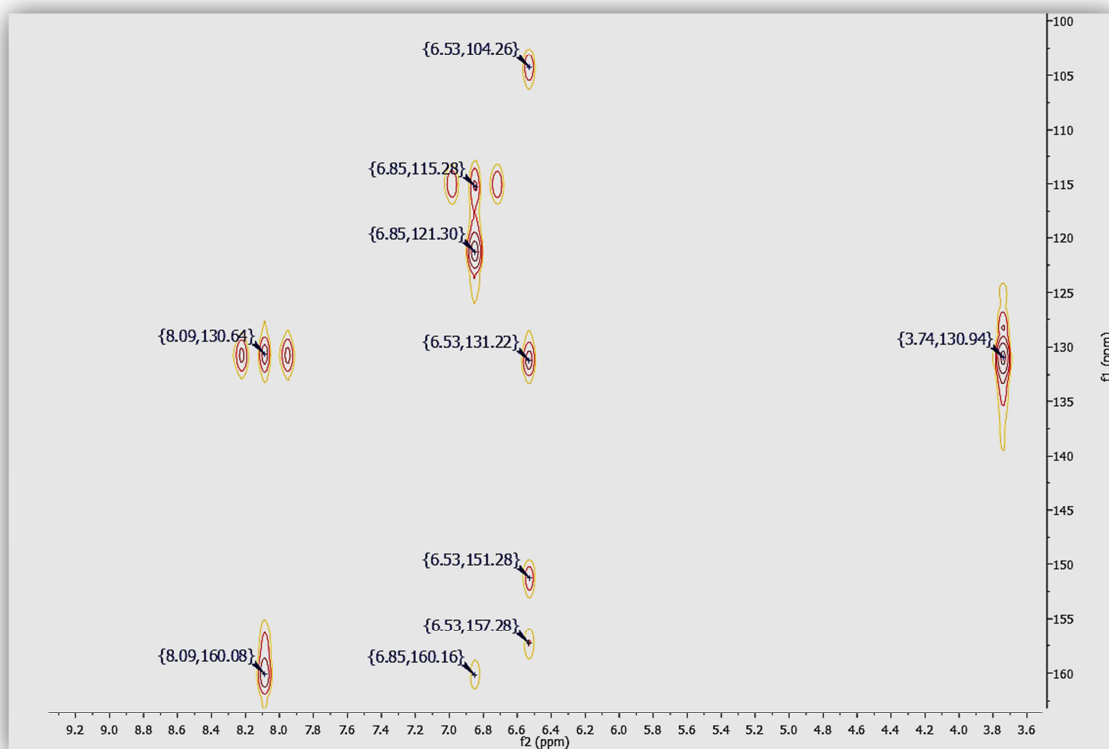
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **22** (DMSO)



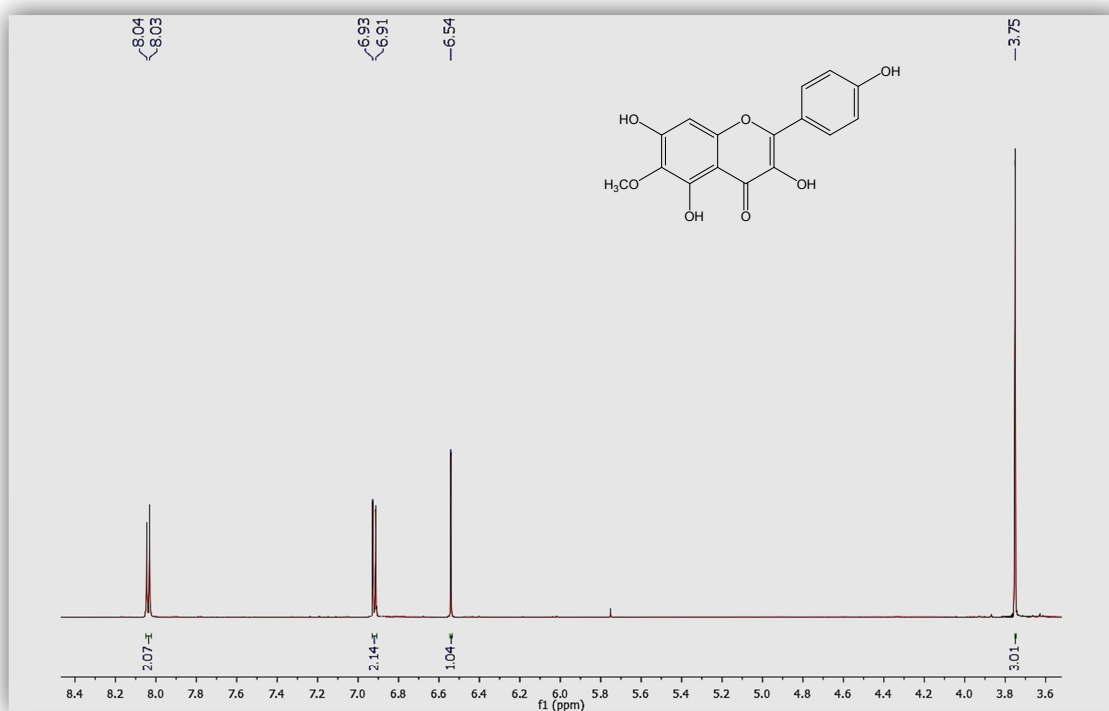
Espectro HSQC del compuesto **22** (DMSO)



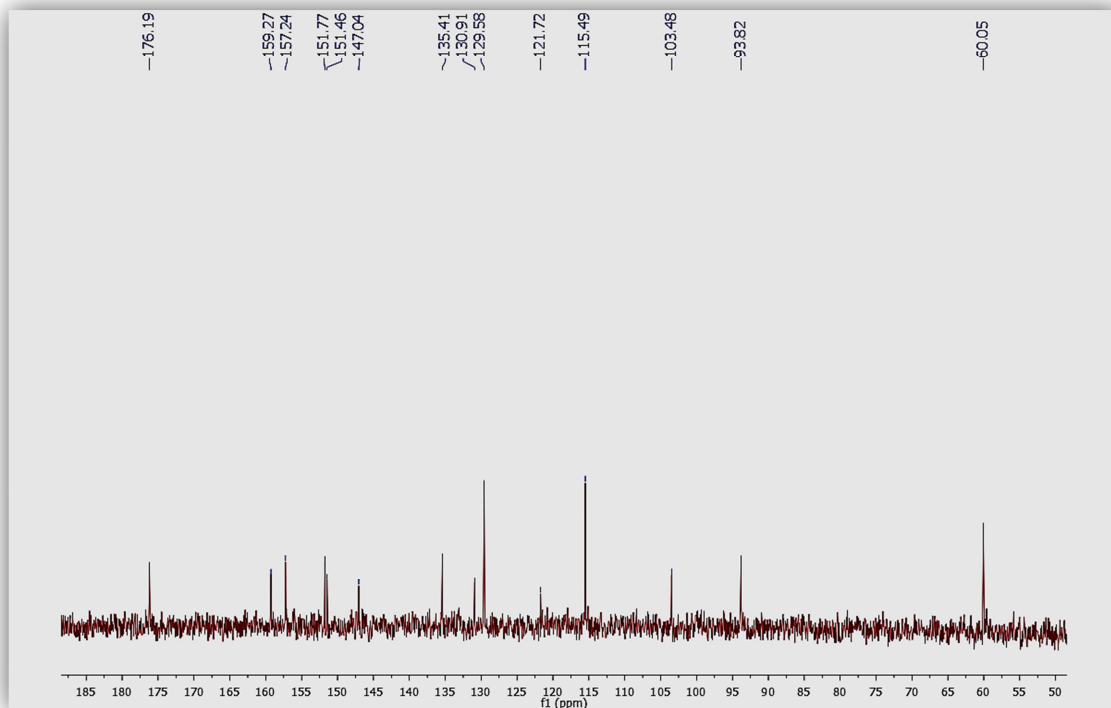
Espectro HMBC del compuesto **22** (DMSO)



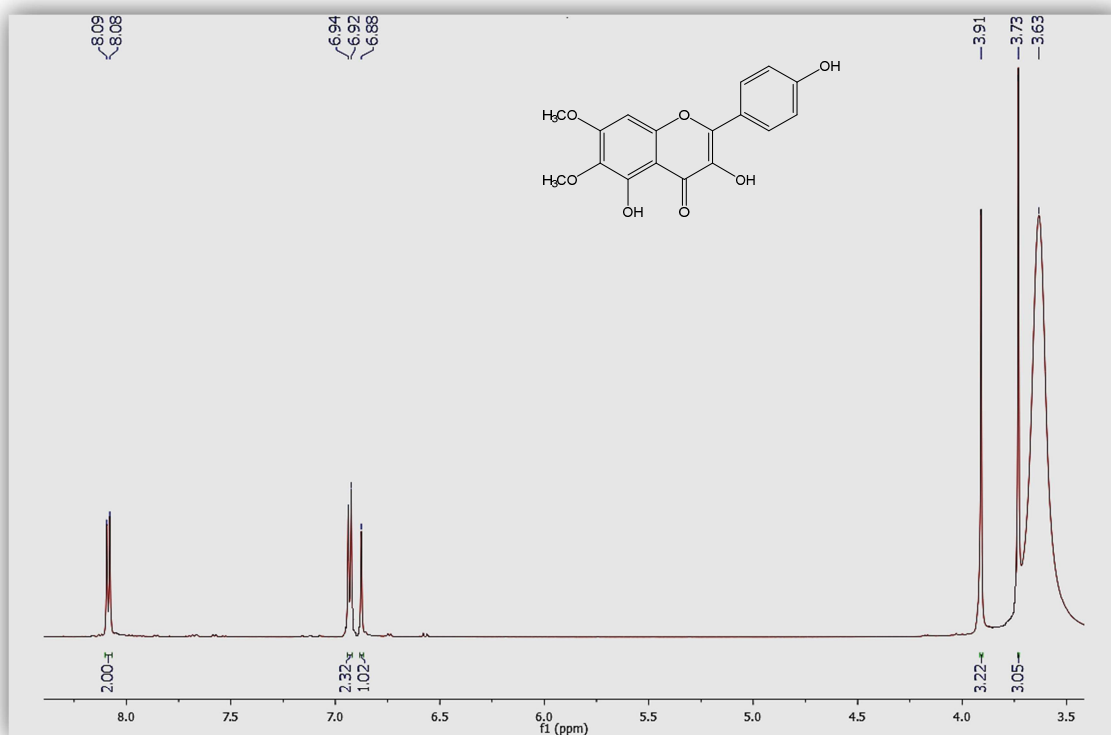
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **23** (DMSO)



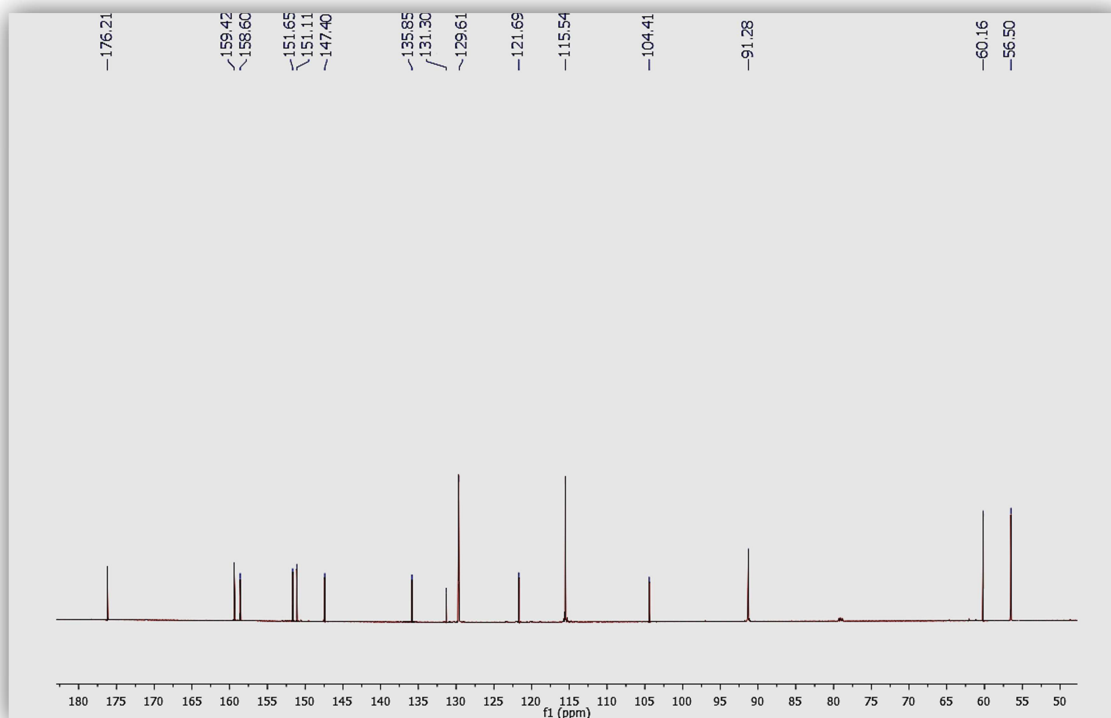
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **23** (DMSO)



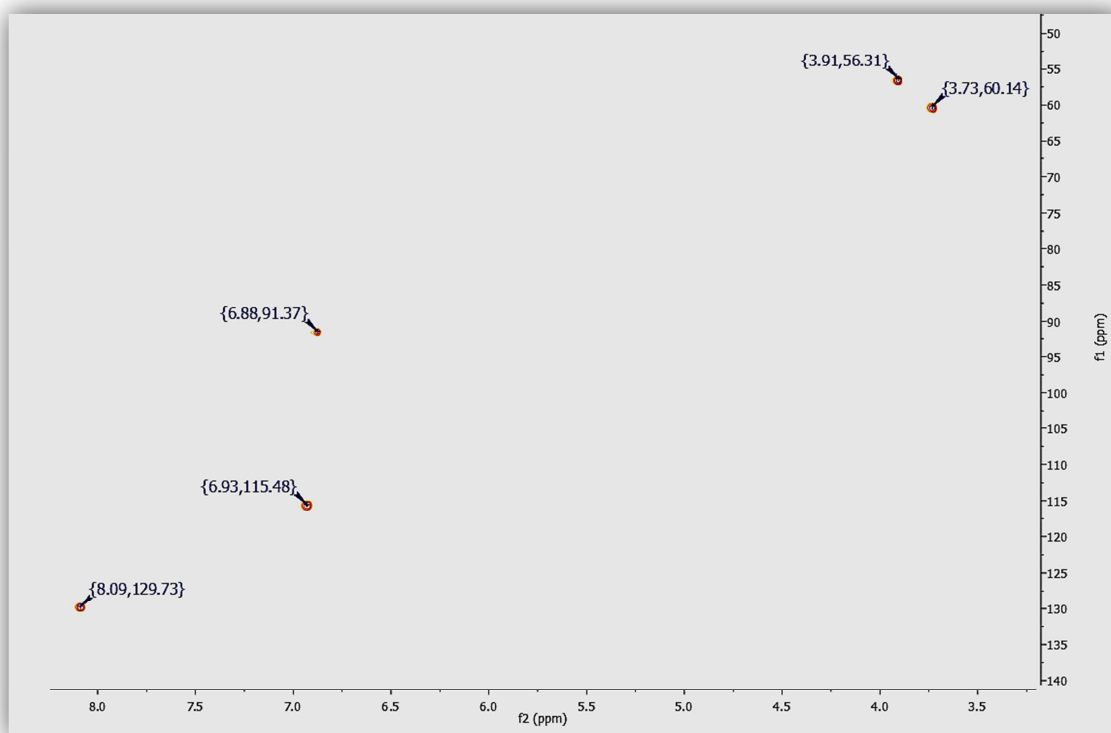
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **24** (DMSO)



Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **24** (DMSO)

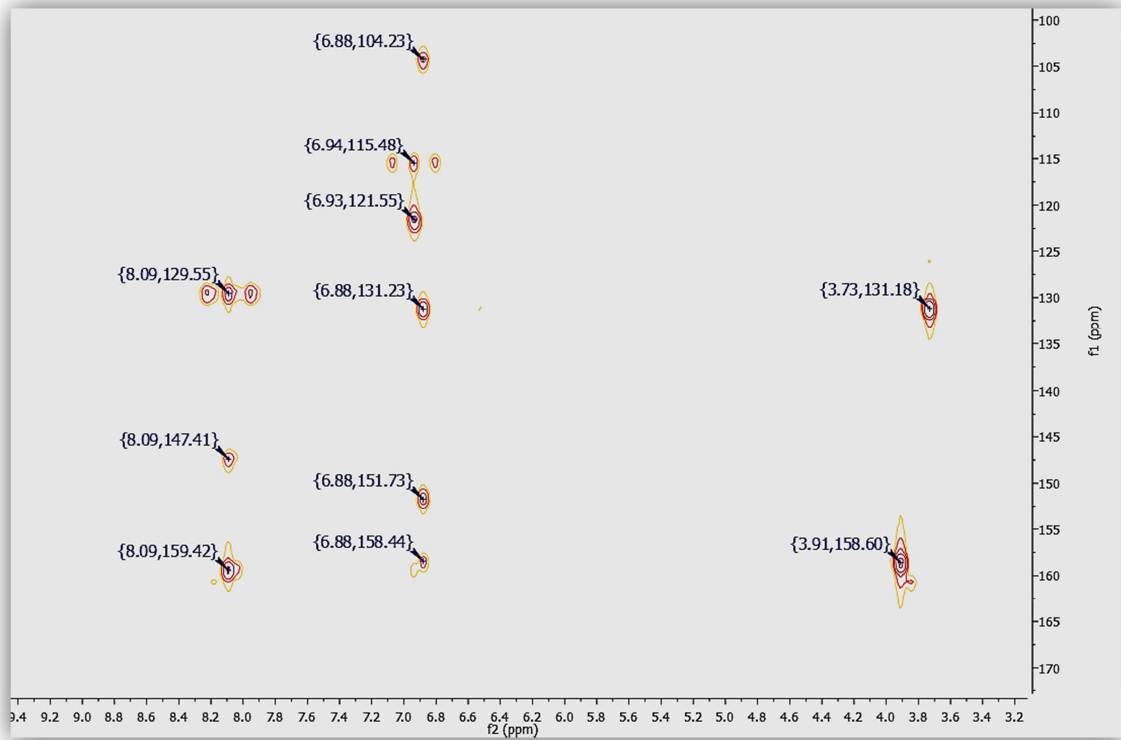


Espectro HSQC del compuesto **24** (DMSO)

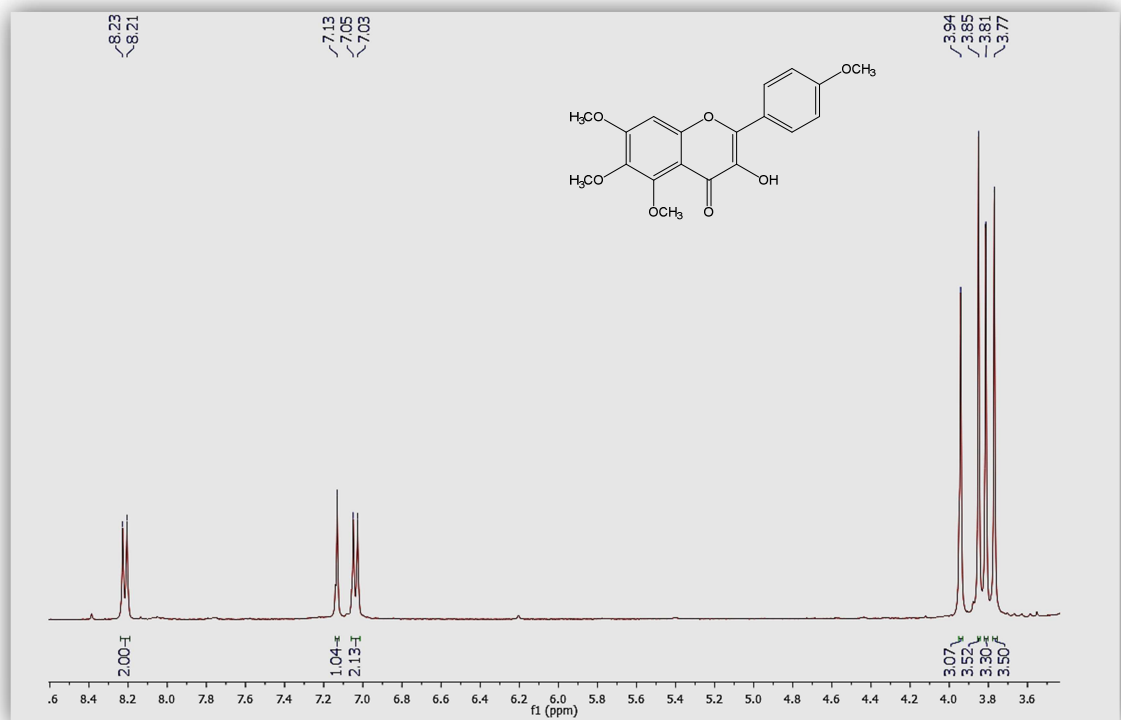




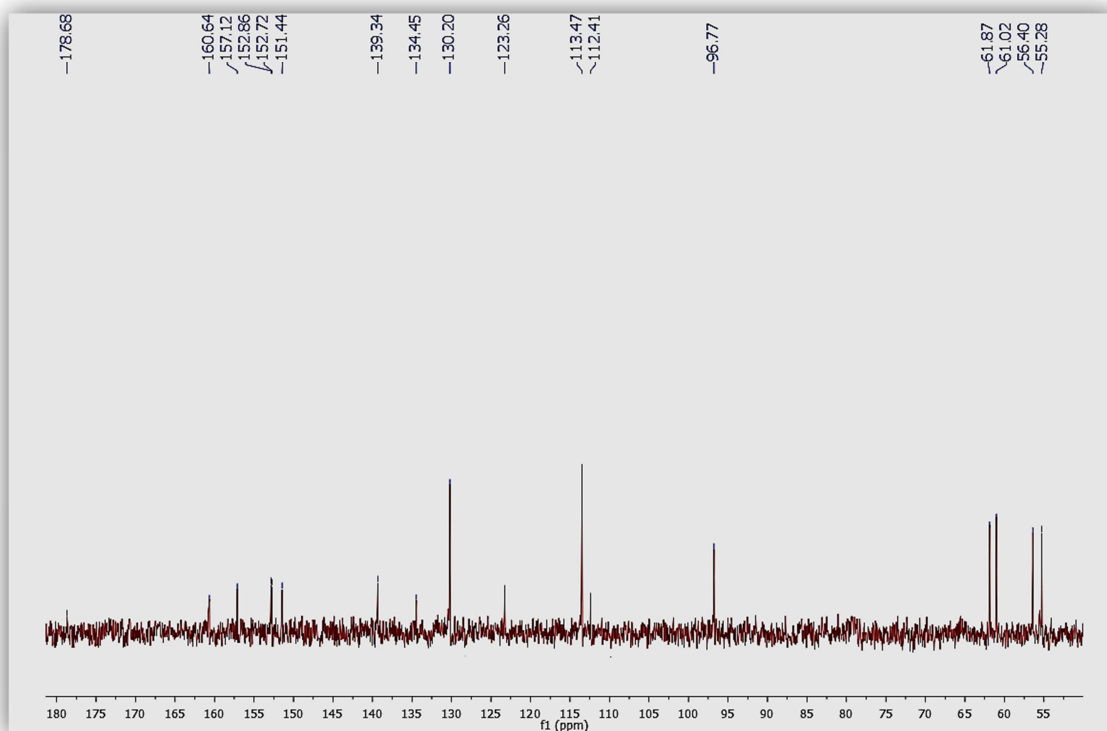
Espectro HMBC del compuesto **24** (DMSO)



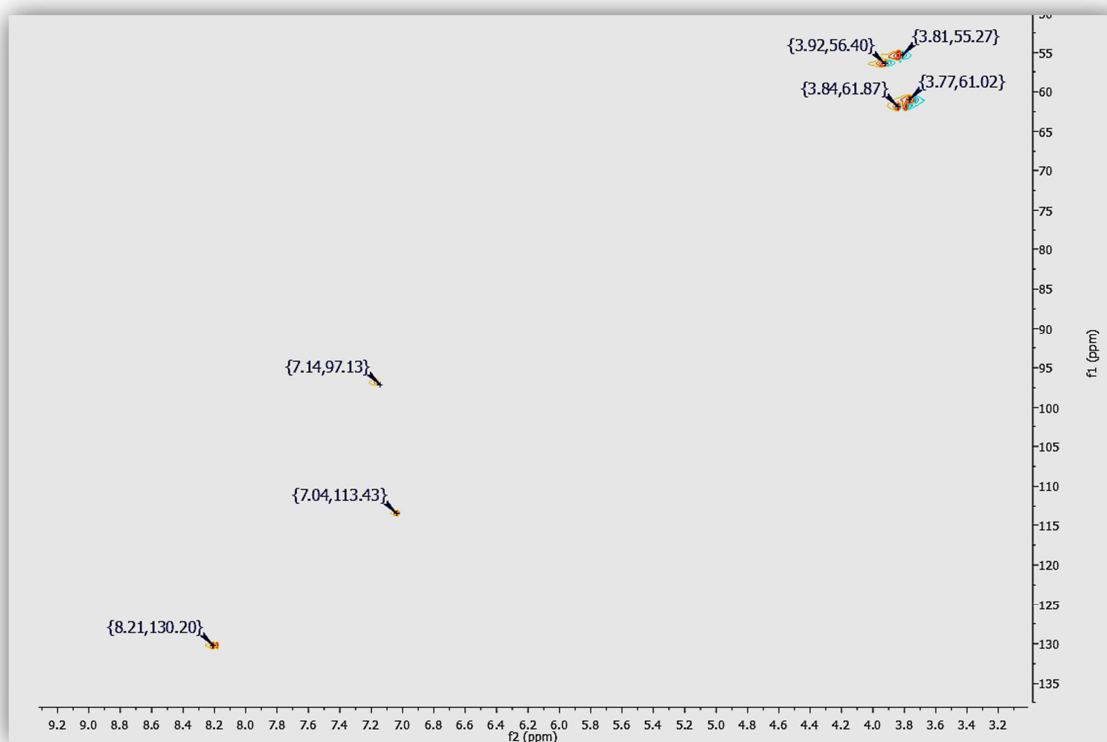
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **25** (DMSO)



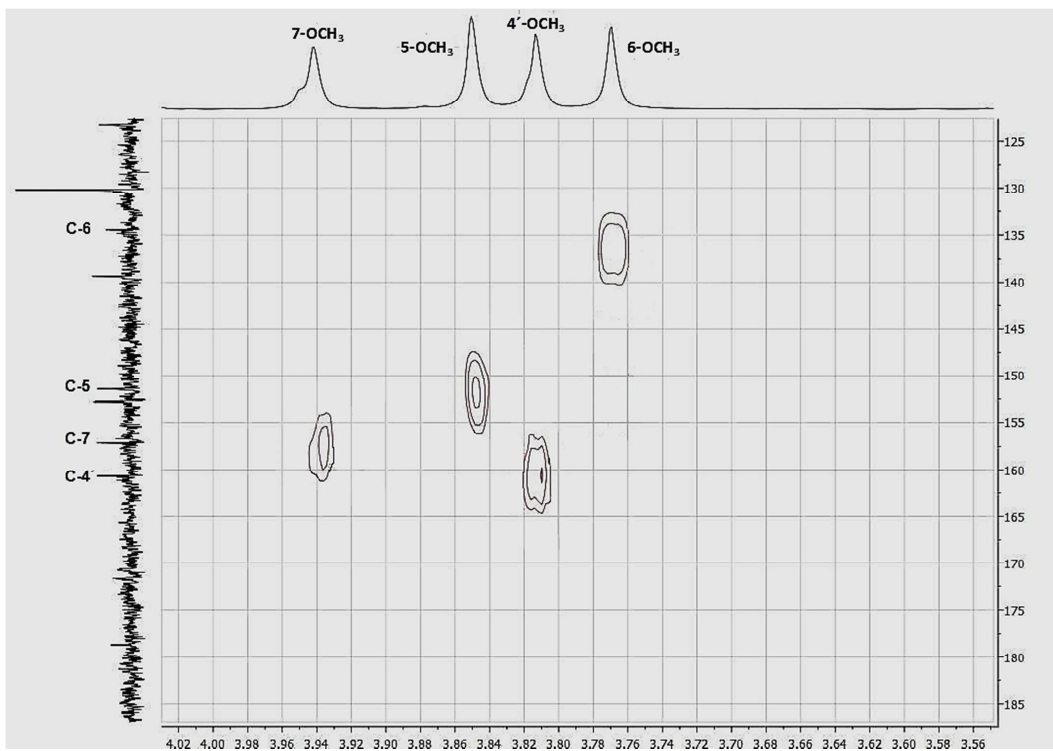
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **25** (DMSO)



Espectro HSQC del compuesto **25** (DMSO)



Espectro HMBC del compuesto **25** (DMSO)



**- Anexo de  
Publicaciones -**

## Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy

Ana Paula Murray<sup>a,b,\*</sup>, María Belén Faraoni<sup>a,c</sup>, María Julia Castro<sup>a</sup>, Natalia Paola Alza<sup>a</sup> and Valeria Cavallaro<sup>a</sup>

<sup>a</sup>INQUISUR-CONICET, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina; <sup>b</sup>Research Member of CONICET; <sup>c</sup>Research Member of CIC

**Abstract:** As acetylcholinesterase (AChE) inhibitors are an important therapeutic strategy in Alzheimer's disease, efforts are being made in search of new molecules with anti-AChE activity. The fact that naturally-occurring compounds from plants are considered to be a potential source of new inhibitors has led to the discovery of an important number of secondary metabolites and plant extracts with the ability of inhibiting the enzyme AChE, which, according to the cholinergic hypothesis, increases the levels of the neurotransmitter acetylcholine in the brain, thus improving cholinergic functions in patients with Alzheimer's disease and alleviating the symptoms of this neurological disorder. This review summarizes a total of 128 studies which correspond to the most relevant research work published during 2006-2012 (1<sup>st</sup> semester) on plant-derived compounds, plant extracts and essential oils found to elicit AChE inhibition.

**Keywords:** Alzheimer's Disease, acetylcholinesterase inhibitors, secondary metabolites, plant extracts, essential oils.

### INTRODUCTION

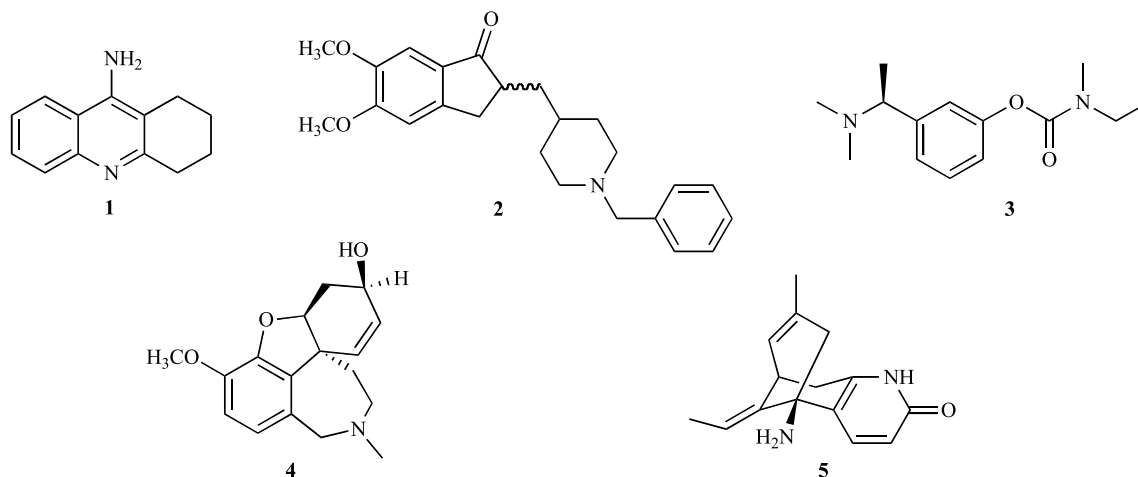
Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder associated with memory impairment and cognitive deficit. It is characterized by low levels of acetylcholine in the brain of AD patients. According to the cholinergic hypothesis, the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), an enzyme that catalyzes acetylcholine hydrolysis, increases the levels of acetylcholine in the brain, thus improving cholinergic functions in AD patients. Furthermore, although the general consensus concludes that AChE inhibitors (AChEi) can alleviate AD symptoms, they neither delay nor reverse the disease progress. Most of the drugs currently available for the treatment of AD are AChEi: tacrine (**1**), donepezil (**2**), rivastigmine (**3**) and galanthamine (**4**), all of which have limited effectiveness and some kind of side effect [1]. Tacrine (**1**) and donepezil (**2**), both from synthetic origin, were the first drugs approved for the treatment of cognitive loss in AD patients by US-FDA in 1993 and 1996, respectively. Rivastigmine (**3**) was approved in 2000 (US-FDA) and was designed from the lead compound physostigmine, a natural AChEi alkaloid. Galanthamine (**4**), a natural alkaloid first obtained from *Galanthus* spp. was approved by US-FDA in 2001. Huperzine A (**5**), an alkaloid found in *Huperzia* spp., is an AChEi commercialized as a dietary supplement for memory support and it is used to treat AD symptoms in China. This alkaloid has been thoroughly studied with promising results yielded particularly from the evaluation of cognitive

performance of animals as well as from studies on its efficacy, tolerance and safety.

Taking into account that inhibitors **3**, **4** and **5** are related to natural products and that AChEi are an important therapeutic strategy for the treatment of AD, many research groups have focused their studies on naturally-occurring compounds from plants as potential sources of either new or more effective AChEi. These studies led to the discovery of an important number of secondary metabolites as well as plant extracts, both of which are characterized by their ability to inhibit AChE. On the other hand, the fact that a significantly relevant number of research papers has been recorded in this field during the last decades can be clearly attributed to the development of colorimetric methods which allow a rapid and facile screening of a large number of samples. Ellman's method is the most widely used for the detection of AChEi, even in complex mixtures, and for the quantification of anti-AChE inhibitory activity [2-6].

Several reviews on the newly discovered AChEi obtained from plants, fungus and marine organisms have also been published over the last years [7-10]. The majority of these AChEi belong to the alkaloid group, including indole, isoquinoline, quinolizidine, piperidine and steroidal alkaloids. On the other hand, several non-alkaloidal and potent AChEi have been obtained from natural sources, including terpenoids, flavonoids and other phenolic compounds. Interestingly, although literature demonstrates to be rich in the study on AChEi obtained from plants, this issue keeps on being the center of attention for research as confirmed by the increasing number of studies published every year. Therefore, the purpose of this review is to provide a comprehensive summary of the literature, particularly that published during 2006-2012 (1<sup>st</sup> semester) on plant-derived compounds, plant

\*Address correspondence to this author at the INQUISUR-CONICET, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina; Tel: 54 291 4595101 ext. 3538; Fax: 54 291 4595187; E-mail: [apmurray@uns.edu.ar](mailto:apmurray@uns.edu.ar)



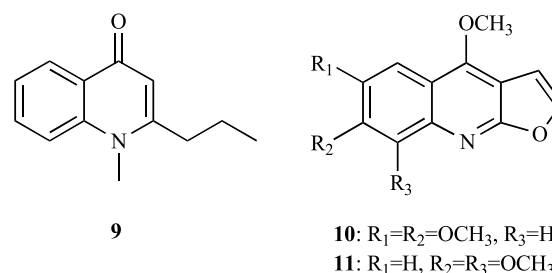
extracts and essential oils which have been reported to inhibit AChE. Readers interested not only in previous findings but also in synthetic/semisynthetic AChEi or natural AChEi of fungal, marine or microbial origin are recommended to see the above-mentioned reviews [i.e. 7-10]. For the sake of brevity and in order to focus our attention on the most relevant findings, only those research papers reporting quantified results ( $IC_{50}$  and/or percentage of inhibition at a given concentration) were included. Extracts or essential oils with  $IC_{50} > 0.5$  mg/ml were considered weakly active and were therefore not taken into account in the present review. With a few exceptions, only molecules with  $IC_{50} < 50$   $\mu$ M have been considered. Furthermore, unless otherwise stated, those results on AChE inhibition included in the present review refer to *in vitro* assays carried out with AChE from electric eel.

#### ALKALOIDS WITH AChE INHIBITORY ACTIVITY

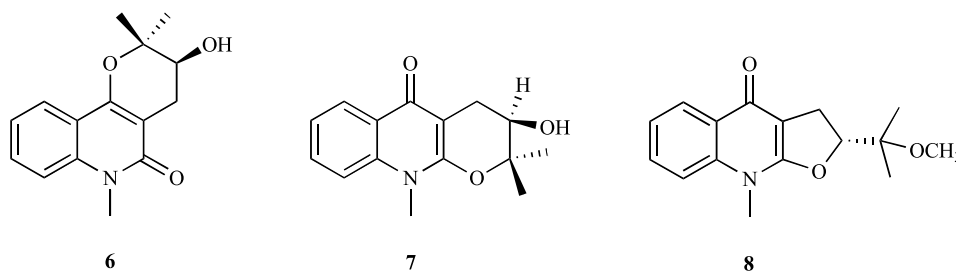
The quinoline alkaloids 3-hydroxy-2,2,6-trimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyrano[3,2-c] quinoline-5-one (**6**), ribalinine (**7**) and methyl isoplatydesmine (**8**) isolated from the aerial parts of *Skimmia laureola* (Rutaceae) were found to be linear mixed inhibitors of AChE with  $K_i = 110.0$ , 30.0 and 30.0  $\mu$ M, respectively [11]. These alkaloids were also observed to evidence butyrylcholinesterase (BChE) inhibition.

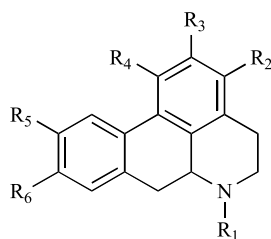
On the other hand, of the several alkaloids that were isolated from the active extracts of *Esenbeckia leiocarpa* (Rutaceae), leptomerine (**9**) and kokusaginine (**10**) with  $IC_{50}$  values of 2.5 and 46  $\mu$ M, respectively, were observed to elicit AChE inhibitory activity [12]. The isolation of

skimmianine (**11**), a furoquinoline alkaloid with very low AChE inhibitory activity, was also reported by the same authors. This alkaloid was observed in another Rutaceae, *Zanthoxylum nitidum*, exhibiting a moderate AChE inhibitory activity ( $IC_{50} = 8.6$   $\mu$ g/ml) [13].

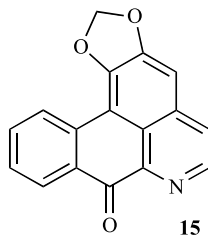


*Nelumbo nucifera* is a well-known medicinal plant belonging to the Nelumbonaceae family which was studied due to its therapeutic potential [14]. N-methylasimilobine (**12**), an aporphine alkaloid with an  $IC_{50} = 1.5$   $\mu$ g/ml which was found to be a non-competitive inhibitor, was recently isolated from this plant [15]. In a random screening, two extracts of *Beilschmiedia* species were observed to exhibit AChE inhibition and a phytochemical study of *B. alioiophylla* and *B. kunstleri* revealed the presence of several alkaloids with  $IC_{50}$  values ranging between 2.0 and 10.0  $\mu$ M [16]. The most potent AChEi were found to be 2-hydroxy-9-methoxyaporphine (**13**), lauretanine (**14**), liriodenine (**15**) and oreobiline (**16**) ( $IC_{50} = 2.0$ -5.0  $\mu$ M), with anti-AChE activity comparable to huperzine A ( $IC_{50} = 1.8$   $\mu$ M). A significant AChE inhibitory activity was also observed in

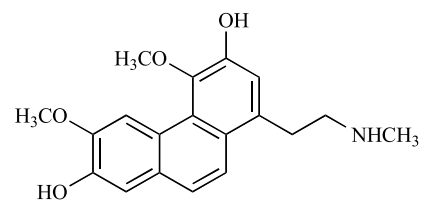




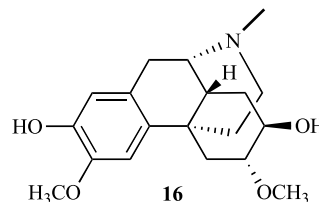
- 12: R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=H, R<sub>3</sub>=OH, R<sub>4</sub>=OCH<sub>3</sub>  
 13: R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=H, R<sub>3</sub>=OH, R<sub>6</sub>=OCH<sub>3</sub>  
 14: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>=OH  
 18: R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=R<sub>6</sub>=OH, R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=OCH<sub>3</sub>  
 19: R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=R<sub>5</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=R<sub>6</sub>=OH  
 20: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=H, R<sub>3</sub>=OH, R<sub>4</sub>=OCH<sub>3</sub>  
 21: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=OH, R<sub>5</sub>+R<sub>6</sub>=OCH<sub>2</sub>O



15



17



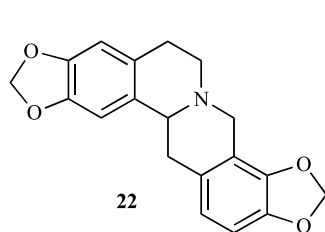
16

secoboldine (17), boldine (18), isoboldine (19), asimilobine (20) and 3-methoxynordomesticine (21) (IC<sub>50</sub> = 8.4 - 10.0 μM).

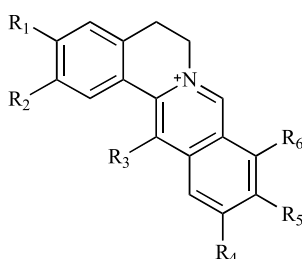
Research on plants from the genus *Corydalis* (Papaveraceae) which are used for the treatment of memory dysfunction in folk medicine reported the presence of benzylisoquinoline alkaloids with anti-AChE activity [7]. The ethanolic extract obtained from the tuber of *C. turtschaninovii* previously found to elicit AChE inhibition was selected to carry out a chemical study which led to the isolation of the isoquinoline alkaloids stylophine (22), epiberberine (23), pseudodehydrocorydaline (24), pseudocopsitine (25) and pseudoberberine (26). In the assay with mouse brain cortex as a source of AChE enzyme, the IC<sub>50</sub> values obtained for each of these alkaloids were 15.8, 6.5, 8.4, 4.3 and 4.5 μM, respectively [17]. In addition, alkaloids 25 and 26, the two most active compounds, were found to elicit anti-amnesic activity [17, 18]. Alkaloids with benzylisoquinoline skeleton from *Corydalis* species having aromatic methylenedioxy groups and a quaternary atom of

nitrogen were observed to show the strongest AChE inhibition [7, 17, 18]. In a more recent work, six protoberberine alkaloids 23, 27 - 31, were identified in rhizomes of *Coptis chinensis* which are traditionally used in Chinese medicine for the treatment of various diseases. *Coptidis* rhizomes and their alkaloids were reported to have cognitive-enhancing and neuroprotective effects and the analysis of the anti-AChE activity of these alkaloids showed that the IC<sub>50</sub> values of berberine (27), palmatine (28), jateorrhizine (29), coptisine (30) and groenlandicine (31) ranged between 0.44 and 0.80 μM while that of epiberberine (23) was slightly higher (IC<sub>50</sub> = 1.07 μM) [19]. Of these alkaloids, compounds 27, 30 and 31 were observed to have an aromatic methylenedioxy group. In this study groenlandicine (31) and berberine (27) were found to be the most active as BChE inhibitors and epiberberine (23) was observed to significantly inhibit β-secretase (BACE1) [19].

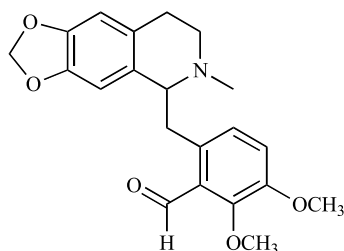
The alkaloids (+)-canadoline (32) and (+)-canadine (33), both isolated from *Corydalis cava* and with an IC<sub>50</sub> = 20.1



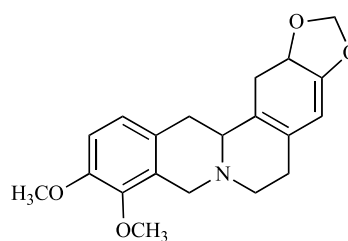
22



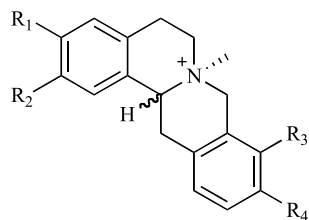
- 23: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>5</sub>+R<sub>6</sub>=OCH<sub>2</sub>O  
 24: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>=H  
 25: R<sub>1</sub>+R<sub>2</sub>=OCH<sub>2</sub>O, R<sub>3</sub>=R<sub>6</sub>=H, R<sub>4</sub>+R<sub>5</sub>=OCH<sub>2</sub>O  
 26: R<sub>1</sub>+R<sub>2</sub>=OCH<sub>2</sub>O, R<sub>3</sub>=R<sub>6</sub>=H, R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=OCH<sub>3</sub>  
 27: R<sub>1</sub>+R<sub>2</sub>=OCH<sub>2</sub>O, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=OCH<sub>3</sub>  
 28: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=R<sub>3</sub>=H  
 29: R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H  
 30: R<sub>1</sub>+R<sub>2</sub>=OCH<sub>2</sub>O, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>5</sub>+R<sub>6</sub>=OCH<sub>2</sub>O  
 31: R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>5</sub>+R<sub>6</sub>=OCH<sub>2</sub>O  
 34: R<sub>1</sub>=R<sub>6</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=R<sub>5</sub>=OH, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H



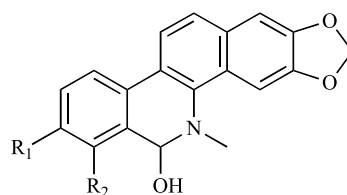
32



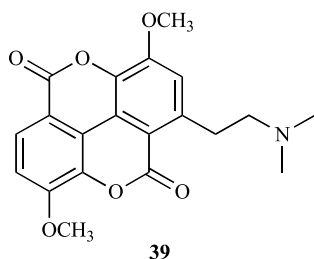
33



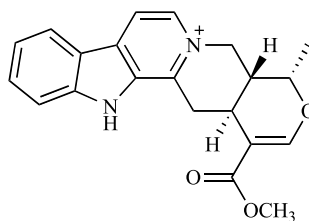
35:  $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=R_3=OH$ ,  $R_4=OCH_3$   
 36:  $R_1=R_3=OCH_3$ ,  $R_2=R_4=OH$



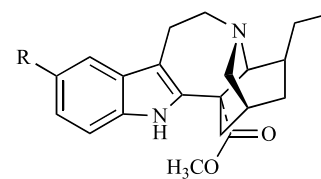
37:  $R_1=R_2=OCH_3$   
 38:  $R_1+R_2=OCH_2O$



39



40



41:  $R=H$   
 42:  $R=OCH_3$   
 43:  $R=OH$

and 12.4  $\mu\text{M}$ , respectively, were observed to elicit a moderate inhibitory activity when tested with AChE from human blood [20].

On the other hand, *Stephania venosa* (Menispermaceae), a Thai medicinal plant, was found to show a high AChE inhibitory activity. The ethanolic extract of *S. venosa* was subjected to bioassay-guided fractionation to identify AChEi [21]. The following moderately active quaternary protoberberine alkaloids could be isolated: stepharanine (**34**), cyclanoline (**35**) and *N*-methyl stepholidine (**36**) with  $IC_{50}$  values of 14.10, 9.23 and 31.30  $\mu\text{M}$ , respectively. A similar fractionation approach was followed to identify the compounds responsible for AChE inhibition in *Chelidonium majus* (Papaveraceae) [22]. Three active constituents were identified, namely 8-hydroxydihydrochelerythrine (**37**), 8-hydroxydihydrosanguinarine (**38**) and berberine (**27**). Compounds **37** and **38**, with no previous record as AChEi, were found to elicit significant anti-AChE activity with an  $IC_{50}$  = 0.61 and 1.37  $\mu\text{M}$ , respectively.

Taspine (**39**) was isolated from the alkaloid-enriched extract obtained from *Magnolia x soulangiana* (Magnoliaceae) [23]. This alkaloid was found not only to show a dose-dependent and long-lasting inhibitory effect on AChE ( $IC_{50}$  = 0.33  $\mu\text{M}$ ) but also to be more potent than galanthamine ( $IC_{50}$  = 3.2  $\mu\text{M}$ ) although its inhibitory activity is comparable to that of tacrine ( $IC_{50}$  = 0.22  $\mu\text{M}$ ). Similar observations were obtained when the *in vitro* assay was performed with human AChE ( $IC_{50}$  = 0.54  $\mu\text{M}$ ). Compound **39** resulted to be inactive against BChE, acting as a selective AChEi.

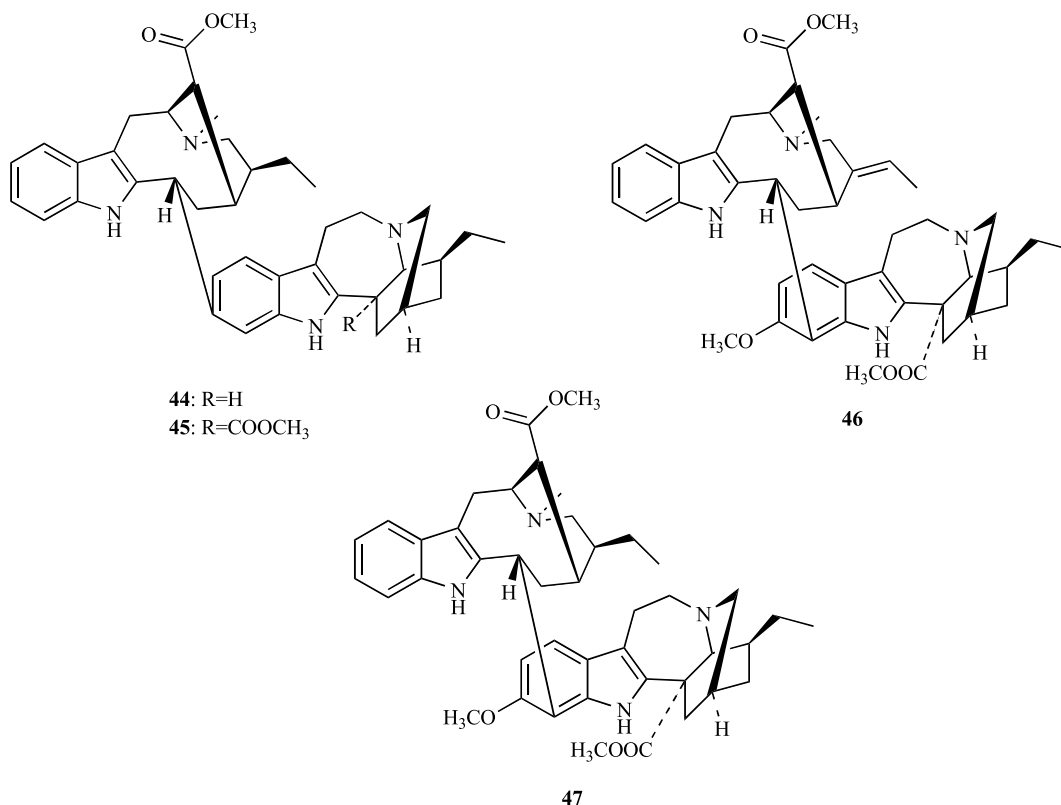
*Catharanthus roseus* (Apocynaceae) is a plant mainly known as a source of vincristine and vinblastine, two alkaloids found in its leaves and appreciated as anticancer compounds. Several other compounds with biological importance can be also found in *C. roseus*. For example, the alkaloid serpentine (**40**), isolated from the roots of this plant,

was reported to be a potent *in vitro* AChEi ( $IC_{50}$  = 0.775  $\mu\text{M}$ ) compared with physostigmine ( $IC_{50}$  = 6.45  $\mu\text{M}$ ) [24].

A bioassay-guided fractionation from the stems of *Ervatamia hainanensis* (Apocynaceae), a plant used in traditional Chinese medicine, allowed the isolation of several monoterpene indole alkaloids, some of them showing a potent AChE inhibitory activity [25]. For example, coronaridine (**41**) and voacangine (**42**), differing from each other only by the methoxy group attached to the aromatic ring, were observed to have an  $IC_{50}$  = 8.6 and 4.4  $\mu\text{M}$ , respectively, these values being similar to that of galanthamine (3.2  $\mu\text{M}$ ). On the other hand, 10-hydroxycoronaridine (**43**) was found to evidence a reduced AChE inhibition ( $IC_{50}$  = 29  $\mu\text{M}$ ), which was attributed to the introduction of a hydroxyl group to the aromatic ring. The indole alkaloids coronaridine (**41**) and voacangine (**42**), both detected in the stalks of *Tabernaemontana australis* (Apocynaceae), had been formerly identified as AChEi but no inhibition values were reported [26].

The genus *Tabernaemontana* is known for the wide variety of unusual bioactive indole alkaloids it produces. Among them, the bisindole alkaloids isolated from *T. divaricata* roots are an interesting example of new structures with potent AChE inhibitory activity. The crude alkaloid extract obtained from the root of *T. divaricata* was found to yield four bisindole alkaloids **44** - **47** [27]. The analysis of AChE inhibition revealed that 19,20-dihydrotabernamine (**44**) and 19,20-dihydroervahanine A (**45**) strongly inhibit AChE, with an  $IC_{50}$  = 0.227 and 0.071  $\mu\text{M}$ , respectively, thus showing that they are significantly more active than galanthamine ( $IC_{50}$  = 0.594  $\mu\text{M}$ ). The fact that inhibition was found to be higher for compound **45** than for compound **44** suggests that the introduction of a carbomethoxy group at C16' increases the enzymatic inhibition. In addition, taking into account that conodurine (**46**) and tabernaegantine (**47**)



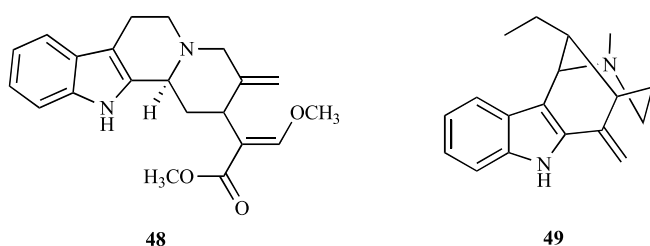


were found to show no activity in AChE, it was suggested that the substitution at C11' and C12' is relevant for AChE inhibitory activity [27].

*Uncaria rhynchophylla* (Rubiaceae) is a Chinese medicine herb used to treat epilepsy. The alkaloid fraction from *U. rhynchophylla* is known for its antiepileptic and neuroprotective effects. Geissoschizine methyl ether (**48**), a strong AChEi, as well as six other weakly active alkaloids were recently isolated from this herb [28]. The active compound **48** was observed to inhibit AChE in a reversible and non-competitive way with an  $IC_{50} = 3.7 \mu\text{g/ml}$ .

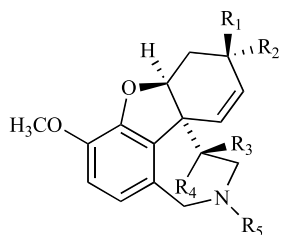
The study of AChE inhibitory activity of Brazilian apocynacea *Himatanthus lancifolius*, commonly known as "agoniada", led to the identification of active extracts in this plant and allowed the isolation of uleine (**49**), an active indole alkaloid, at a high concentration in the alkaloid fraction. The  $IC_{50}$  value observed for this alkaloid was  $0.45 \mu\text{M}$  [29].

As to the Amaryllidaceae family, phytochemical research conducted in the last decades on this family revealed several

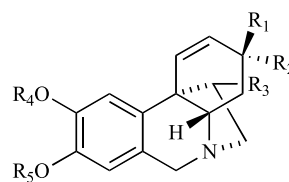


alkaloids with moderate or potent inhibition of AChE [3, 7, 30]. In the search of new natural sources of galanthamine and other Amaryllidaceae alkaloids with anti-AChE activity, bulbs and leaves of *Hippeastrum papilio* collected in the South of Brazil were studied. Galanthamine (**4**), the already known alkaloids narwedine (**50**), haemanthamine (**51**), 11-hydroxyvittatine (**52**), 8-*O*-demethylmaritidine (**53**) and vittatine (**54**) as well as the new alkaloid 11 $\beta$ -hydroxygalanthamine (**55**) were all isolated and of all of them galanthamine was obtained in significant amounts [31]. Compound **55** was observed to elicit AChE inhibition as other galanthamine-type alkaloids do, with an  $IC_{50} = 14.5 \mu\text{M}$ . Furthermore, because habranthine, epimer of **55**, was observed to have an anti-AChE activity similar to that of galanthamine, it was concluded that  $\beta$  configuration at C11 is unfavorable for the interaction with AChE [3, 31]. Other potent AChEi, such as *N*-allylnorgalanthamine (**56**) and *N*-(14-methylallyl)norgalanthamine (**57**), were isolated from *Leucojum aestivum*, an amaryllidacea used for the industrial extraction of galanthamine [32]. *N*-alkylated galanthamine derivatives **56** and **57** were isolated together with galanthamine (**4**), epinorgalanthamine (**58**), narwedine (**50**) and lycorine (**59**), from the mother liquors obtained after the industrial production of galanthamine. Alkaloids **56** and **57**, with  $IC_{50}$  values of 0.18 and 0.16  $\mu\text{M}$ , respectively, resulted to be ten times more potent AChEi than galanthamine ( $IC_{50} = 1.82 \mu\text{M}$ ).

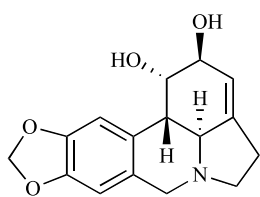
The chemical investigation of *Galanthus rizehensis*, a wild-growing species from Turkey, allowed the isolation of two new Amaryllidaceae alkaloid *N*-oxides, incartine *N*-oxide (**60**) and lycorine *N*-oxide (**61**) and seven



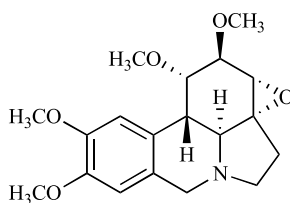
- 50:  $R_1+R_2=O$ ,  $R_3=R_4=H$ ,  $R_5=CH_3$   
 55:  $R_1=R_3=OH$ ,  $R_2=R_4=H$ ,  $R_5=CH_3$   
 56:  $R_1=OH$ ,  $R_2=R_3=R_4=H$ ,  $R_5=-CH_2CH=CH_2$   
 57:  $R_1=OH$ ,  $R_2=R_3=R_4=H$ ,  $R_5=-CH_2C(CH_3)=CH_2$   
 58:  $R_1=R_3=R_4=R_5=H$ ,  $R_2=OH$



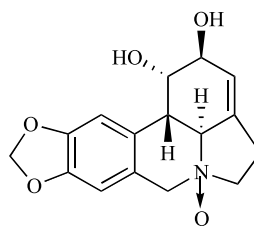
- 51:  $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=OH$ ,  $R_4+R_5=CH_2$   
 52:  $R_1=R_3=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_4+R_5=CH_2$   
 53:  $R_1=OH$ ,  $R_2=R_3=R_5=H$ ,  $R_4=CH_3$   
 54:  $R_1=OH$ ,  $R_2=R_3=H$ ,  $R_4+R_5=CH_2$



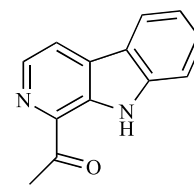
59



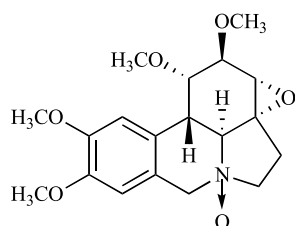
60



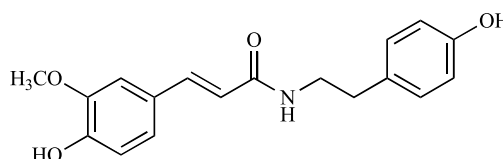
61



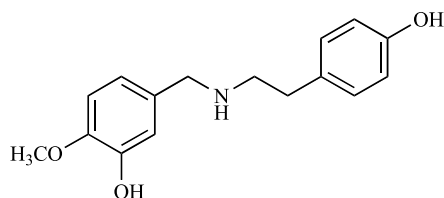
62



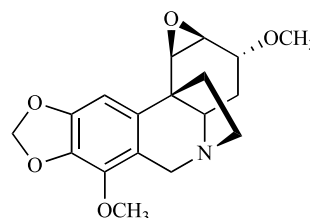
63



64



65



66

known alkaloids namely, 1-acetyl- $\beta$ -carboline (**62**), incartine (**63**), *N*-trans feruloyltyramine (**64**), lycorine (**59**), *O*-methylnorbelladine (**65**), vittatine (**54**) and 11-hydroxyvittatine (**52**) [33]. The potential of these alkaloids as AChEi was analyzed but only incartine *N*-oxide (**60**) was observed to elicit a moderate inhibitory activity ( $IC_{50} = 34.50 \mu M$ ), incartine (**63**) was observed to be weakly active ( $IC_{50} = 106.97 \mu M$ ) and the other alkaloids were found to be inactive. In a bioassay-guided fractionation of an active extract obtained from bulbs of *Nerine bowdenii*, the Amaryllidaceae alkaloid undulatine (**66**) was identified as the most active component of the alkaloid fraction, with an  $IC_{50} = 37 \mu M$  [34].

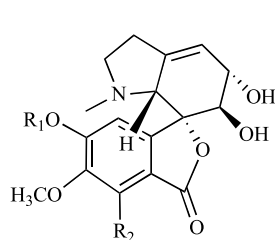
Although benzylphenethylamine alkaloids were considered to belong exclusively to the Amaryllidaceae, some of them

have been found to belong to other families [35]. A new example of this exception was found through the chemical investigation of *Hosta plantaginea* (Liliaceae) [36]. Seventeen benzylphenethylamine alkaloids, including five new alkaloids, **67-71**, along with twelve known compounds [7-deoxy-*trans*-dihydronarciclasine, *O*-methyllycorine, albomaculine, haemanthamine, *O*-demethylhaemanthamine, 8-*O*-demethylmaritadine, haemanthidine, yemenine C, lycorine, pseudolycorine, ungeremine (**72**) and norsanguinine (**73**)] were obtained. Some of these alkaloids were analyzed to determine whether they are AChEi or not.. Ungeremine (**72**) ( $IC_{50} = 3.85 \mu M$ ), norsanguinine (**73**) ( $IC_{50} = 1.43 \mu M$ ) and 8-demethoxy-10-*O*-methylhostasine (**69**) ( $IC_{50} = 2.32 \mu M$ ) were all found to be potent AChE inhibitors.

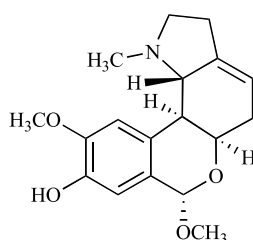
After the isolation of the potent AChEi huperzine A (**5**) from *Huperzia serrata* (Lycopodiaceae), several plants belonging to the genus *Lycopodium* have been investigated in an attempt to find alkaloids with unusual skeletons that could have AChE inhibitory activity [7, 8, 37]. Five new Lycopodium alkaloids, 11 $\alpha$ -hydroxyfawcettidine (**74**), 2 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -dihydroxyfawcettidine (**75**), 8 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -dihydroxyfawcettidine (**76**), 2 $\beta$ -hydroxylycothunine (**77**) and 8 $\alpha$ -hydroxylycothunine (**78**), with the fawcettimine skeleton were isolated from *L. serratum*, along with three known alkaloids, lycothunine (**79**), serratine (**80**) and serratanidine (**81**) [38]. AChE inhibitory activity was analyzed for the alkaloid lycoserramine-H (**82**) previously isolated from *L. serratum* [39] and for compounds **74**, **75**, **78**. Alkaloids **75** and **82** were observed to inhibit AChE with an  $IC_{50}$  = 27.9 and 16.7  $\mu$ M, respectively, while **74** and **78** were observed to show no anti-AChE activity. In another study, three new alkaloids (**83** - **85**) were isolated from *L. carinatum*, a species collected in Malaysia [40]. Carinatamins A (**83**) and B (**84**) were observed to inhibit AChE from bovine erythrocytes with an  $IC_{50}$  = 4.6 and 7.0  $\mu$ M, respectively, whereas carinatumin C (**85**) was observed to show no inhibition ( $IC_{50}$  > 100  $\mu$ M). Alkaloids **83** and **84** were observed to exhibit an AChE inhibitory activity similar to that of huperzine A and huperzine B ( $IC_{50}$  = 0.8 and 8.0  $\mu$ M). Alkaloids from *L. casuarinoides* were also isolated and three new compounds, lycoparins A-C (**86** - **88**), were characterized, of which lycoparin C (**88**) was found to show a moderate AChE inhibitory activity (from bovine erythrocytes) with an  $IC_{50}$  = 25  $\mu$ M [41]. Lycoparin A (**86**) and lycoparin B (**87**), both having a carboxylic acid at C-15 and one or two *N*-methyl groups, were found to show no inhibitory activity.

As to *Sarcococca* and *Buxus* species (Buxaceae), they are known to produce steroidal alkaloids, some of which were

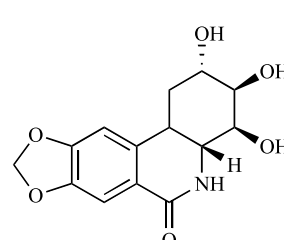
observed to evidence strong AChE inhibition [7, 42, 43]. New steroidal alkaloid AChEi from *S. saligna* and *S. hookeriana* were recently found. In the case of *S. saligna*, the study –which was a continuation of previous research [44, 45]– of the bioactive steroidal alkaloids of this species allowed the isolation of five new compounds (**89-93**) and two already known bases (**94** and **95**) [46]. The new alkaloids 5,14-dehydro-*N*<sub>a</sub>-demethylsaracodine (**89**), 14-dehydro-*N*<sub>a</sub>-demethylsaracodine (**90**), 16-dehydrosarcovine (**91**), 2,3-dehydrosarsalignone (**92**) and 14,15-dehydrosarcovagine D (**93**), as well as the known compounds sarcovagine C (**94**) and salignarine C (**95**) were analyzed as anti-AChE agents. Only **91**, **92** and **95** were observed to exhibit significant AChE inhibition ( $IC_{50}$  = 12.5, 7.0 and 19.7  $\mu$ M, respectively). Compounds **89** - **92**, **94** and **95** were also found to elicit strong and selective BChE inhibition [46]. The bioassay-guided chemical investigation of *S. hookeriana* allowed the isolation of two new pregnane-type steroidal alkaloids, hookerianamide H (**96**) and hookerianamide I (**97**) together with the known alkaloids *N*<sub>a</sub>-methylepipachysamine D (**98**), sarcovagine C (**94**) and dictyophlebine (**99**) [47]. Compounds **94**, **96**, **97**, **98** and **99** were tested for their inhibitory properties towards AChE and all of them were observed to elicit significant inhibitory activity ( $IC_{50}$  2.9 – 34.1  $\mu$ M) as well as a potent anti-BChE activity ( $IC_{50}$  0.3 – 3.6  $\mu$ M). Further studies on *S. hookeriana* yielded two new 5 $\alpha$ -pregnane-type steroidal alkaloids, hookerianamides J (**100**) and K (**101**) [48]. Furthermore, eight known steroidal alkaloids, hookerianamide H (**96**) and hookerianamide I (**97**), chonemorphine (**102**), *N*-methylpachysamine A (**103**), epipachysamine-*E*-5-en-4-one (**104**), vagenine A (**105**), 2,3-dehydrosarsalignone (**92**) and sarcovagine C (**94**), were isolated and characterized. Alkaloids **94**, **100**, **101**, **102**, **103** and **104** were analyzed as AChEi. Compounds **100**, **101**, **102**



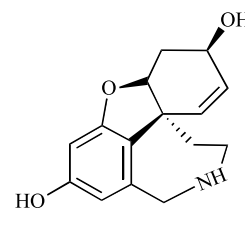
**67**: R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>  
**68**: R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H  
**69**: R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H  
**70**: R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>



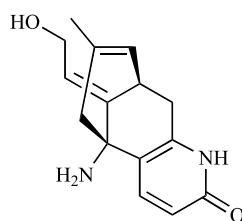
**71**



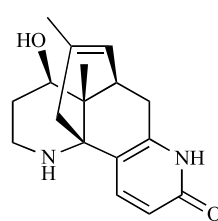
**72**



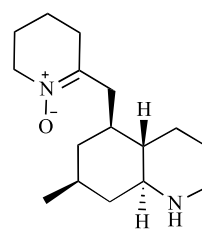
**73**



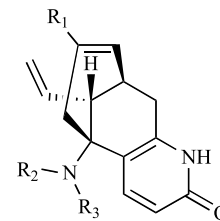
**83**



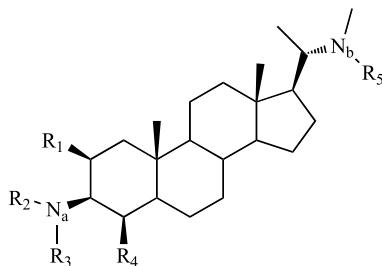
**84**



**85**



**86**: R<sub>1</sub> = COOH, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>  
**87**: R<sub>1</sub> = COOH, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = H  
**88**: R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>OH, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H



**89:** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>=COCH<sub>3</sub>, Δ<sup>5,6</sup>, Δ<sup>14,15</sup>

**90:** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>=COCH<sub>3</sub>, Δ<sup>14,15</sup>

**91:** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=COCH<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>, Δ<sup>16,17</sup>

**92:** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H, R<sub>2</sub>=COCCH<sub>3</sub>=CHCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=O, R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>, Δ<sup>2,3</sup>, Δ<sup>5,6</sup>

**93:** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H, R<sub>2</sub>=COCCH<sub>3</sub>=CHCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=O, R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>, Δ<sup>2,3</sup>, Δ<sup>14,15</sup>

**94:** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H, R<sub>2</sub>=COCCH<sub>3</sub>=CHCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=OCOCH<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>

**95:** R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=COCCH<sub>3</sub>=CHCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>, Δ<sup>5,6</sup>

**96:** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H, R<sub>2</sub>=COH, R<sub>4</sub>=O, R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>, Δ<sup>2,3</sup>

**97:** R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=H, R<sub>2</sub>=PhCO, R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>

**98:** R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=PhCO, R<sub>3</sub>=R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>

**99:** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>

**100:** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H, R<sub>2</sub>=COCH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>=OH, R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>, Δ<sup>16,17</sup>

**101:** R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>, Δ<sup>4,5</sup>, Δ<sup>14,15</sup>

**102:** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>

**103:** R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>

**104:** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>5</sub>=H, R<sub>2</sub>=COCH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>=O, Δ<sup>5,6</sup>

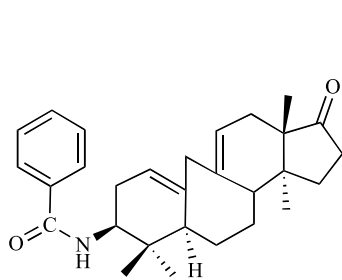
**105:** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H, R<sub>2</sub>=COCH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>=OCOCH<sub>3</sub>

and **103** were observed to inhibit AChE moderately (IC<sub>50</sub> 22.1 – 48.5 μM) while **104** and **94** were found to be more active inhibitors (IC<sub>50</sub> 9.9 and 8.1 μM, respectively).

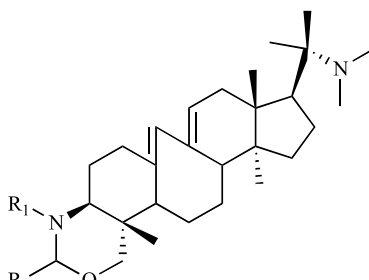
Phytochemical research on *Buxus hyrcana* allowed the identification of several Buxus alkaloids with cholinesterase inhibitory activity [43, 49]. Three new triterpenoidal alkaloids, namely 17-oxo-3-benzoylbuxadine (**106**), buxhyrcamine (**107**) and 31-demethylcyclobuxoviridine (**108**) along with sixteen known compounds, all tested as AChEi, were isolated and characterized in a recent study on *B. hyrcana* collected from Iran [50]. Weak AChE inhibitory activity was observed for N<sub>6</sub>-dimethylcyclobuxoviricine

(**109**), papillozine C (**110**), cyclobuxophylline O (**111**) and arbora-1,9(11)-dien-3-one (**112**) (IC<sub>50</sub> = 35.4 - 47.9 μM). In the same *in vitro* assay, 17-oxo-3-benzoylbuxadine (**106**), buxhyrcamine (**107**), homomoenjodaramine (**113**), buxmicrophylline F (**114**), buxrugulosamine (**115**), moenjodaramine (**116**) and N<sub>20</sub>-formyl-buxaminol E (**117**) were observed to show moderate AChE inhibition (IC<sub>50</sub> = 17.6 - 25.5 μM) while spirofornabuxine (**118**) was found to elicit a strong AChE inhibitory activity (IC<sub>50</sub> = 6.3 μM).

The crude methanolic extract of *B. natalensis*, a plant used to improve memory in the elderly by traditional healers in South Africa, was found to elicit AChE inhibition (IC<sub>50</sub> =



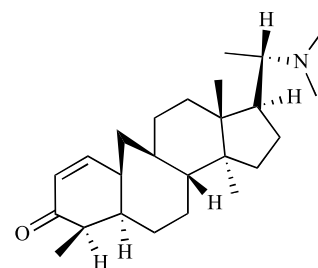
**106**



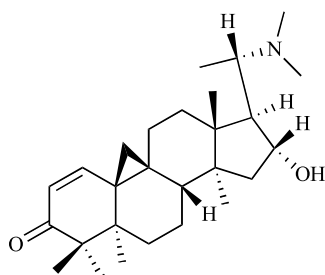
**107:** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H

**113:** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>

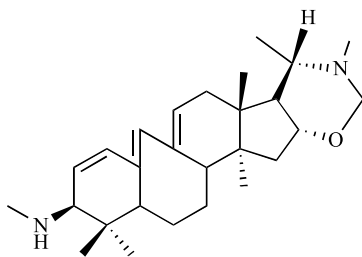
**116:** R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H



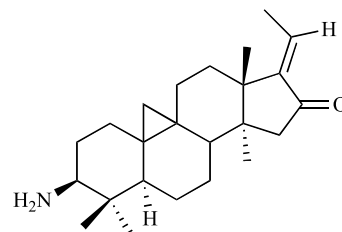
**108**



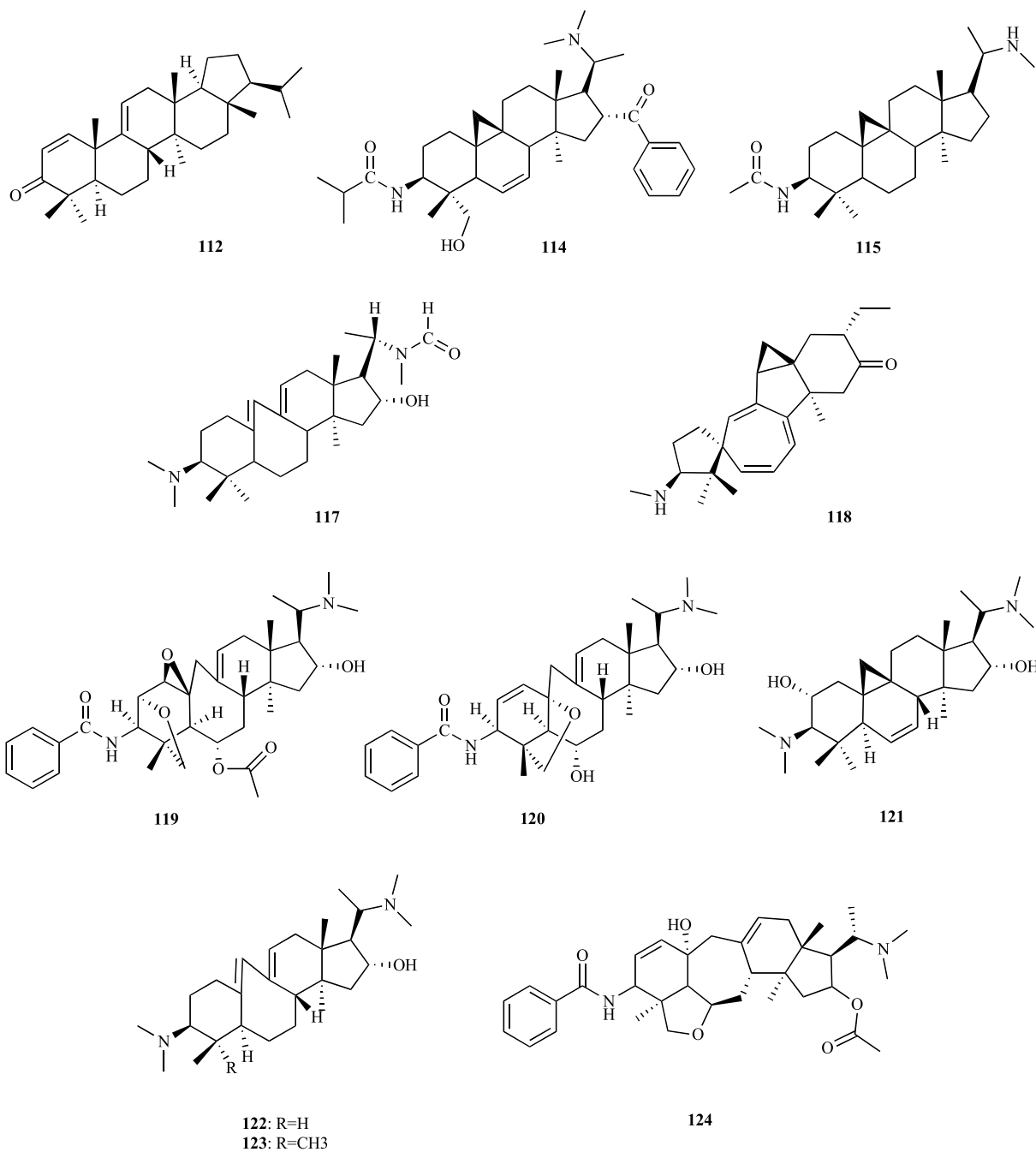
**109**



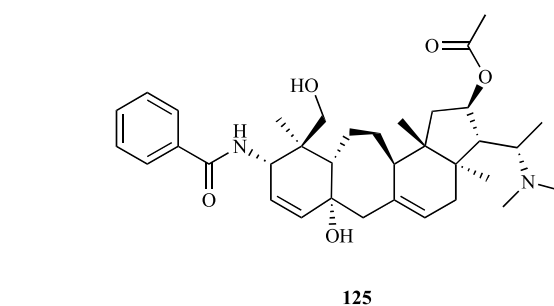
**110**



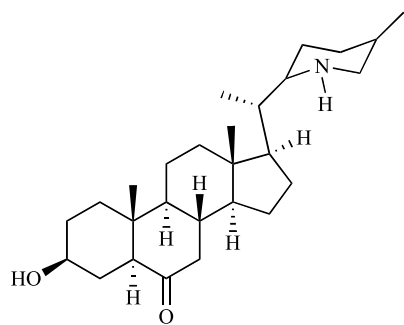
**111**



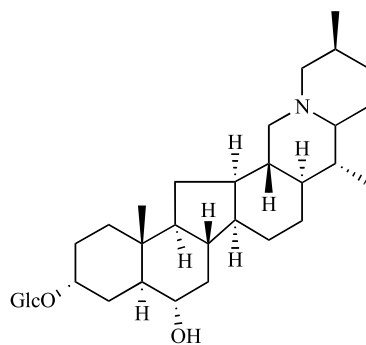
28 µg/mL). The phytochemical study of this extract yielded seven compounds **119** - **125** which were found to show either moderate or strong AChE inhibition [51]. The alkaloids *O*<sup>2</sup>-natafuranamine (**119**), *O*<sup>10</sup>-natafuranamine (**120**), cyclonatinol (**121**) and 31-demethylbuxaminol (**122**) were isolated and characterized for the first time while buxaminol A (**123**) was isolated for the first time as a natural product. Buxafuranamide (**124**) and buxalongifolamidine (**125**) were already known compounds. Compounds **119**, **120** and **124** were observed to exhibit a significantly higher AChE inhibitory activity compared to the rest, with IC<sub>50</sub> values of 3.0, 8.5, and 14.0 µM, respectively. Compounds **121**, **122**, **123** and **125** were observed to be less effective as AChEi (IC<sub>50</sub> = 22.9 – 30.2 µM).



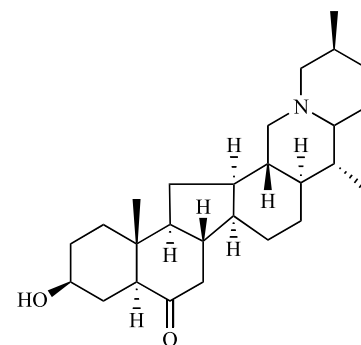
The bulbs of *Fritillaria* species (Liliaceae) which are known to be a traditional medicinal herb called “Beimu” in



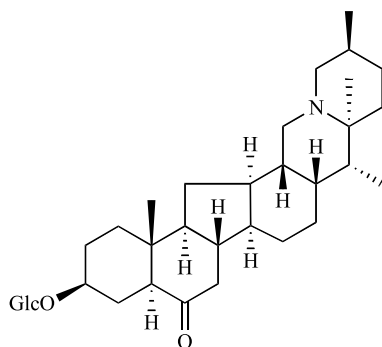
126



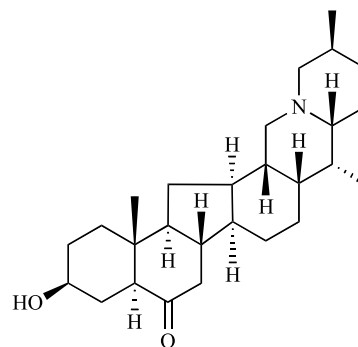
127



128



129

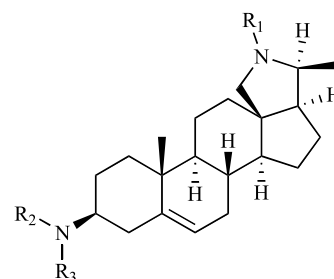


130

China are used as an antitussive, antiasthmatic and expectorant agent. In the past, in a chemical study carried out on alkaloids from *F. imperialis* bulbs new steroidal alkaloids with weak AChE inhibition and great selectivity towards BChE were identified [52]. Thus, taking into account this previous study, the bulbs from five *Fritillaria* species were studied and their alkaloids were identified and evaluated as cholinesterase inhibitors. Eighteen alkaloids were isolated and their effects on human whole blood cholinesterase were assayed. Results showed that *N*-demethyl-puqietinone (**126**) from *F. puziensis*, hupeheninoside (**127**) from *F. hupehensis*, ebeiedinone (**128**) from *F. ebeiensis* var. *purpurea*, yibeinoside A (**129**) from *F. pallidiflora* and chuanbeinone (**130**) from *F. delavayi* showed good AChE inhibition, with  $IC_{50}$  values of 6.4, 16.9, 5.7, 6.5 and 7.7  $\mu$ M, respectively. However, all of them were weaker AChEi than galanthamine ( $IC_{50} = 1.9 \mu$ M). Compounds **127**, **128**, **129** and **130** were found to be stronger inhibitors on plasma BChE than galanthamine, the positive control [53].

In addition, the following steroidal alkaloids: conessine (**131**), isoconessimine (**132**), conessimin (**133**), conarrhimin (**134**) and conimin (**135**) were isolated in a bioassay-guided fractionation from the seeds of *Holarrhena antidysenterica* (Apocynaceae), a common Tibetan drug [54]. Compounds **131**, **133**, **134** and **135** were identified as active constituents against AChE. Conessimin (**133**) was found to be the strongest AChE inhibitor with an  $IC_{50} = 4 \mu$ M whereas conessine (**131**), conarrhimin (**134**) and conimin (**135**) were found to be moderate AChE inhibitors ( $IC_{50} = 21 - 28 \mu$ M). These findings indicate that the elimination of the *N*-methyl

group of pyrrolidine moiety induces a significant increase of activity while the cleavage of either one or two *N*-methyl groups at C-3 position reduces the inhibitory potency. Compound **133** was selected for a kinetic study through which it was demonstrated that its AChE inhibitory activity is both reversible and non-competitive. Molecular docking simulations of these compounds with AChE helped to understand their interactions with AChE and were consistent with the experimental results obtained [54].



**131:**  $R_1=R_2=R_3=CH_3$

**132:**  $R_1=R_2=CH_3, R_3=H$

**133:**  $R_2=R_3=CH_3, R_1=H$

**134:**  $R_1=R_2=R_3=H$

**135:**  $R_1=R_3=H, R_2=CH_3$

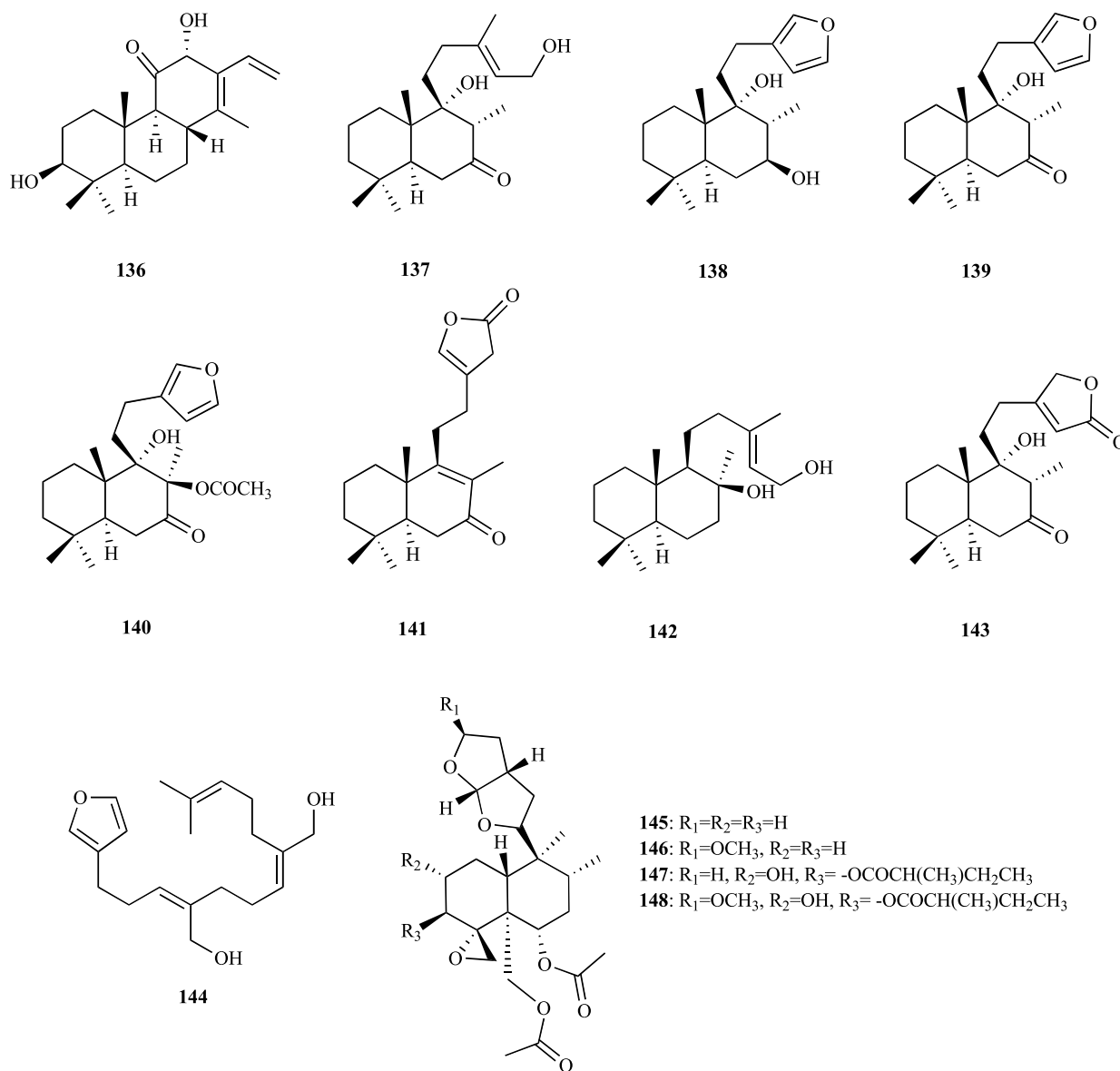
#### NON-ALKALOIDAL COMPOUNDS WITH AChE INHIBITORY ACTIVITY

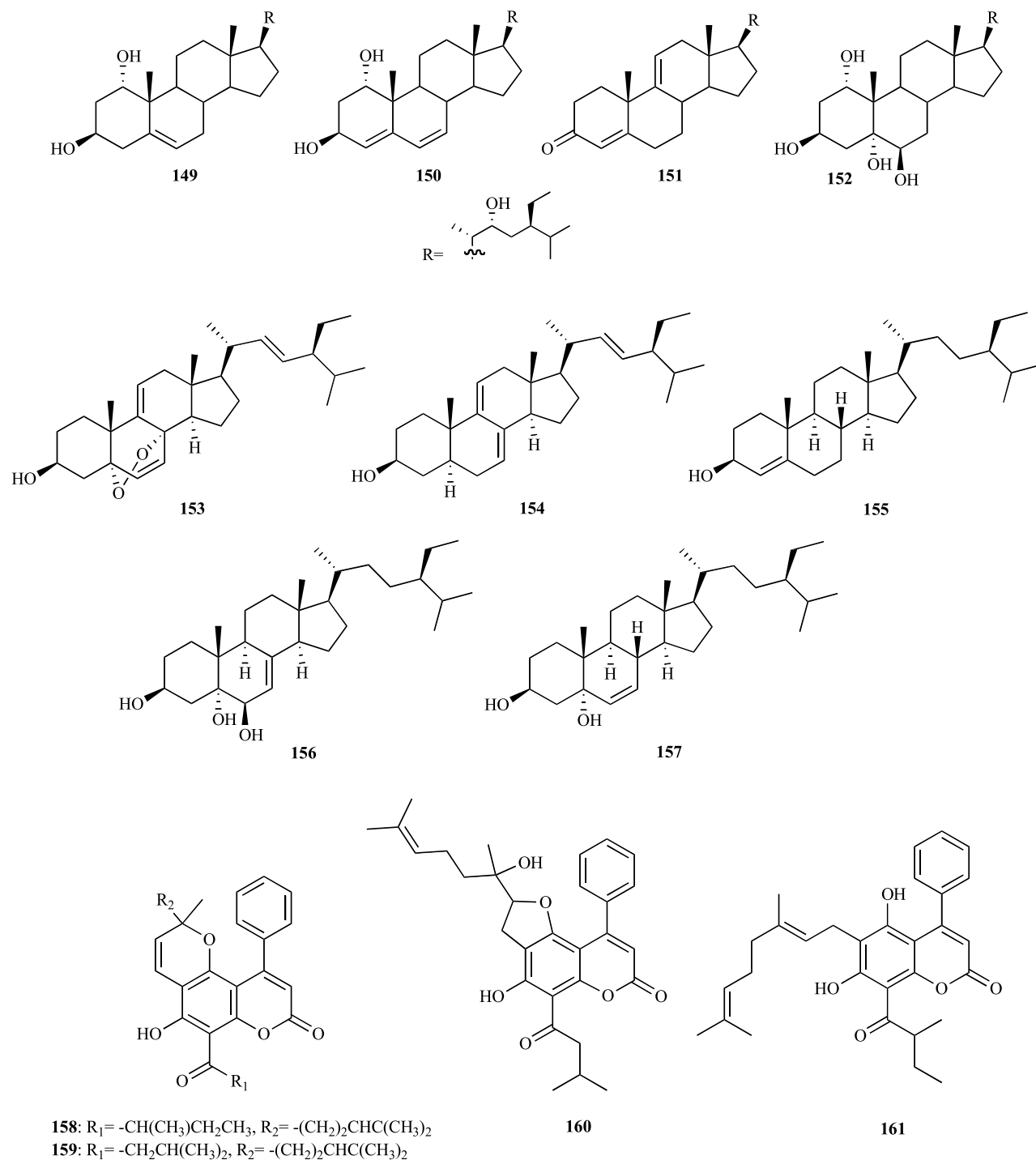
In spite of the fact that the majority of the most potent inhibitors known to date are alkaloids, several non-alkaloidal

AChEi from the plant kingdom and with different structural characteristics (terpenoids, sterols, flavonoids and phenolic compounds, etc) have been recognized as promising lead compounds as anti-AD agents [7-10]. Until 2006 only a few diterpenoids demonstrated to inhibit AChE [7]. However, further recent research has reported a larger number of compounds belonging to this group with the ability to exert either moderate or strong AChE inhibitory activity. In addition, a new cassane diterpene named niloticane (**136**) was isolated from the ethyl acetate bark extract of *Acacia nilotica* subsp. *kraussiana* (Fabaceae), a plant used in African traditional medicine [55]. Niloticane (**136**) was found to show an AChE inhibitory activity similar to that of the positive control galanthamine ( $IC_{50} = 4$  and  $2 \mu M$ , respectively). In addition, one new (**137**) and six known (**138** - **143**) labdane-type diterpenoids were identified as AChE inhibitors present in an active extract obtained from *Leonurus heterophyllus* (Lamiaceae) by bioassay-guided fractionation [56]. Anti-AChE activity in **137** - **143** was

analyzed in rat brain cortex as a source of AChE enzyme. Leoheteronin A (**141**) and leopersin G (**143**), both having a 15,16 epoxy group, were observed to be strong inhibitors with  $IC_{50}$  values of 11.6 and  $12.9 \mu M$ , respectively. The new compounds leoheteronin F (**137**) and leoheteronin D (**142**) were found to show moderate inhibition with  $IC_{50}$  values of 16.1 and  $18.4 \mu M$ , respectively. Leoheterin (**138**), hispanone (**139**) and galeopsin (**140**), all having a furan ring at the side chain, were found to be weakly active ( $IC_{50} = 38.5 - 42.7 \mu M$ ).

*Asparagus adscendens* (Asparagaceae) is a medicinal plant traditionally used as a nerve tonic and remedy for memory impairments in Pakistan. Conyopodiol (**144**), which was isolated from the chloroform fraction of the methanolic extract of *A. adscendens*, was found to elicit AChE and BChE inhibition with an  $IC_{50} = 2.17$  and  $11.21 \mu M$ , respectively [57]. This dual cholinesterase inhibitor was also observed to show potential as a bivalent ligand in molecular docking studies. Four non-competitive AChEi **145**

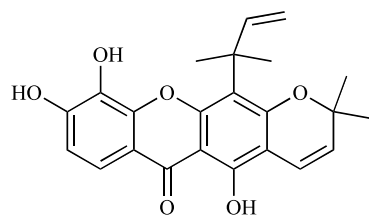




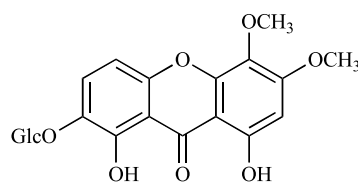
– **148** were obtained in the chemical investigation of *Ajuga bracteosa* (Lamiaceae), another medicinal plant from Pakistan [58]. The diterpenoid dihydroajugapitin (**148**) was found to be the most active against AChE with an  $IC_{50} = 14.0 \mu M$ . Compared to compound **148**, lupulin A (**147**), clerodinin A (**146**) and dihydroclerodinin (**145**) were observed to be less efficient inhibitors ( $IC_{50} = 19.2, 26.5$  and  $35.2$ , respectively) and diterpenoids **145** - **148** were observed to elicit BChE inhibition. These findings indicate that the presence of a methoxy group at C-15 increases cholinesterase inhibitory potential.

From the methanolic extract of *Haloxylon recurvum* (Chenopodiaceae), a plant used in Pakistan for the treatment of several neuronal disorders, four new C-24 alkyated sterols **149** – **152** and five known sterols **153** – **157** were isolated [59]. Compounds **149** – **157** were analyzed as AChEi and were found to inhibit AChE in a concentration-dependent manner acting as non-competitive inhibitors. Haloxysterol B (**150**) and haloxysterol C (**151**), whose  $IC_{50}$  values were  $0.89$  and  $1.0 \mu M$ , respectively, were found to be the most active AChE inhibitors. Their inhibitory activity was observed to be similar to that of galanthamine ( $IC_{50} 0.5$





162



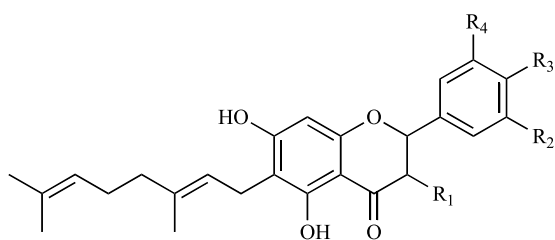
163

$\mu\text{M}$ ). Haloxysterol A (**149**) and 24-ethyl-cholest-6-ene-3,5-diol (**157**) were also observed to show potent AChE inhibition with  $\text{IC}_{50}$  values of 8.3 and 3.5  $\mu\text{M}$ , respectively. Haloxysterol D (**152**), 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxy-(24*S*)-ethyl-cholest-6,9(11),22(*E*)-triene-3 $\beta$ -ol (**153**), (24*S*)-ethyl-cholest-7,9(11),22(*E*)-triene-3 $\beta$ -ol (**154**), lawsaritol (**155**) and 24-ethyl-cholest-7-ene-3,5,6-triol (**156**) were found to elicit a moderate anti-AChE activity ( $\text{IC}_{50}$  = 13.7 - 26.4  $\mu\text{M}$ ).

On the other hand, a bioassay-guided fractionation on the bark of *Mesua elegans* (Clusiaceae) allowed the isolation of the anti-AChE components responsible for the activity observed for the extract. Mesuagenin B (**158**) was the most potent inhibitor ( $\text{IC}_{50}$  = 0.7  $\mu\text{M}$ ) and mesuagenin A (**159**), mesuagenin D (**160**) and 5,7-dihydroxy-8-(3-methylbutanoyl)-6-[(*E*)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl]-4-phenyl-2H-chromen-2-one (**161**) were observed to elicit strong AChE inhibition with  $\text{IC}_{50}$  values of 1.06, 8.73 and 3.06  $\mu\text{M}$ , respectively [60]. This bioassay-guided study is the first report of 4-phenylcoumarins as AChEi.

In the past, some examples of xanthenes with moderate AChE inhibitory activity were reported [7]. Further recent research introduced two new xanthenes, **162** and **163**, to this group of AChEi also with moderate inhibitory activity. Macluraxanthone (**162**) which was obtained from the root of *Maclura pomifera* (Moraceae) was found to elicit non-competitive AChE inhibition ( $\text{IC}_{50}$  = 8.47  $\mu\text{M}$ ) [61]. Furthermore, docking studies yielded results supporting *in vitro* results. Triptexanthoside C (**163**) which was isolated from the methanolic extract of *Gentianella amarella* ssp. *acuta* (Gentianaceae) was observed to elicit AChE inhibition with an  $\text{IC}_{50}$  = 13.8  $\mu\text{M}$  [62].

The methanolic extract of *Paulownia tormentosa* fruits, with a potent inhibitory activity against AChE, was subjected to bioactivity-guided fractionation which allowed the identification of some geranylated flavonoids, such as



**164**:  $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_4=\text{OH}$ ,  $\text{R}_3=\text{OCH}_3$

**165**:  $\text{R}_1=\text{H}$ ,  $\text{R}_2=\text{R}_4=\text{OH}$ ,  $\text{R}_3=\text{OCH}_3$

**166**:  $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{H}$ ,  $\text{R}_3=\text{R}_4=\text{OH}$

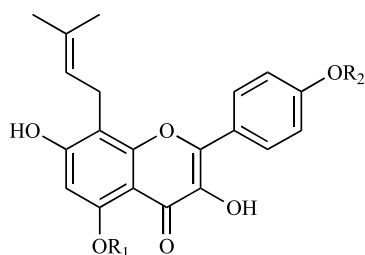
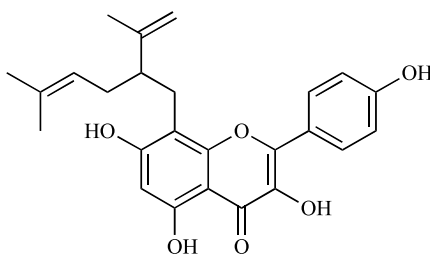
cholinesterase inhibitors, of which the most active resulted to be 6-geranyl-3,3',5,5',7-pentahydroxy-4'-methoxyflavone (**164**), 6-geranyl-3',5,5',7-tetrahydroxy-4'-methoxyflavanone (**165**) and diplacone (**166**), which were observed to show mixed-type inhibition of human AChE with  $\text{IC}_{50}$  = 15.6, 22.9 and 7.2  $\mu\text{M}$ , respectively [63]. In addition, the fact that these compounds were also observed to elicit significant BChE inhibition makes them interesting as potential dual inhibitors.

The flavonols present in *Sophora flavescens* (Fabaceae) were studied for several biological activities relevant for AD. Sophoflavescenol (**167**), icaritin (**168**), demethylanhydroicaritin (**169**), 8-C-lavandurylkaempferol (**170**) and kaempferol (**171**) were all found to be good AChE inhibitors, with  $\text{IC}_{50}$  values of 8.37, 6.47, 6.67, 5.16 and 3.31  $\mu\text{M}$ , respectively [64]. Compounds **167-171** were also found to elicit significant BChE and BACE1 inhibition.

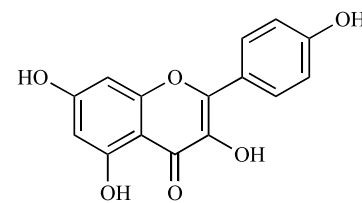
The methanol extract from roots of *Morus lhou* (Moraceae), a polyphenol-rich plant, was found to yield nine flavonoids (**172** - **180**) of which eight showed AChE inhibition [65]. A new flavone, 5'-geranyl-4'-methoxy-5,7,2'-trihydroxyflavone (**172**), was identified as the most potent inhibitor ( $\text{IC}_{50}$  = 10.95  $\mu\text{M}$ ). 5'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyflavone (**173**), kuwanon U (**174**), kuwanon E (**175**), morusin (**176**), cyclomorusin (**178**), neocyclomorusin (**179**) and kuwanon C (**180**) were all observed to be moderate AChE inhibitors ( $\text{IC}_{50}$  = 16.21 - 36.4  $\mu\text{M}$ ) and morusinol (**177**) was observed to be weakly active ( $\text{IC}_{50}$  = 173.49  $\mu\text{M}$ ). C-3 prenylated flavones **176**, **178**, **179** and **180** were found to be noncompetitive inhibitors whereas those unsubstituted at C-3 **172-175** were mixed inhibitors. Flavonoids **172** - **180** were also found to inhibit BChE [65].

On the other hand, three potent AChEi were obtained from *Broussonetia papyrifera*, another plant belonging to the Moraceae family. From the ethanolic extract of the roots of *B. papyrifera* which was found to elicit cholinesterase inhibitory activity, prenylated flavonols **181** - **183** were isolated and characterized [66]. 8-(1,1-dimethylallyl)-5'-(3-methylbut-2-enyl)-3',4',5,7-tetrahydroxyflavonol (**181**), papyriflavonol (**182**) and brousoflavonol (**183**) were observed to inhibit human erythrocyte AChE with  $\text{IC}_{50}$  values of 0.82, 3.1 and 2.7  $\mu\text{M}$ , respectively. Compound **181**, the most potent, acted as a time-dependent, slow reversible inhibitor.

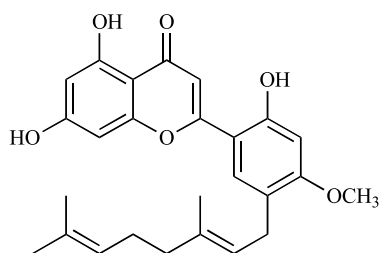
Isoorientin (**184**) and isovitexin (**185**) were identified as the compounds responsible for the AChE inhibition observed in the extracts from flowers and rhizomes of *Iris pseudopumila* (Iridaceae) from Italy [67]. Compound **184**

167: R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H168: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>169: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H

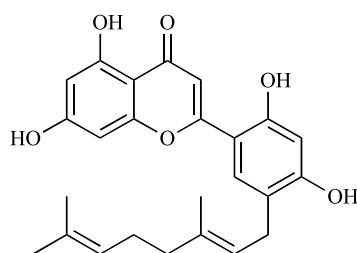
170



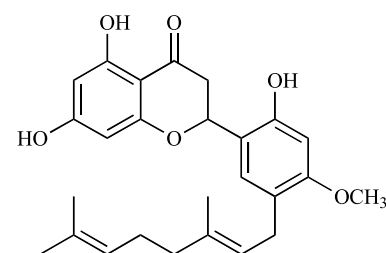
171



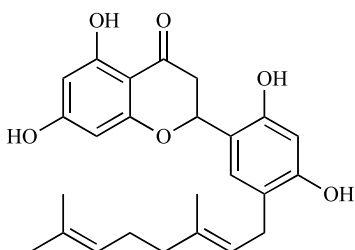
172



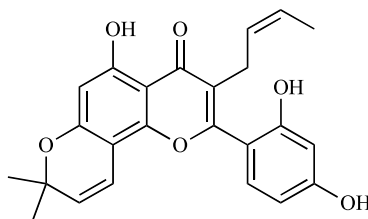
173



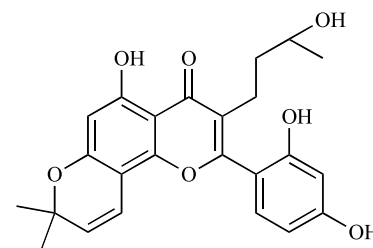
174



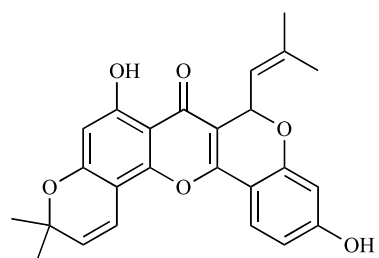
175



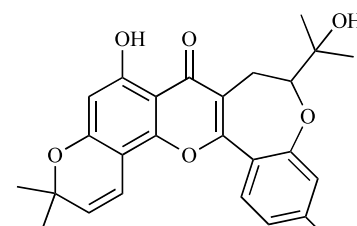
176



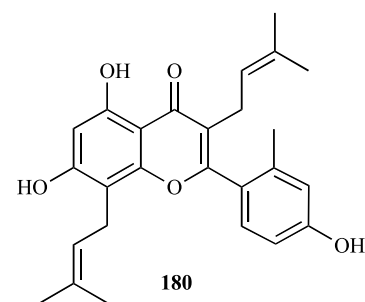
177



178



179

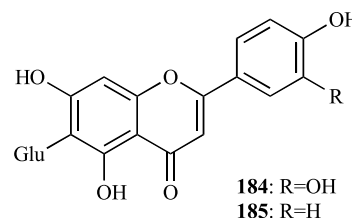
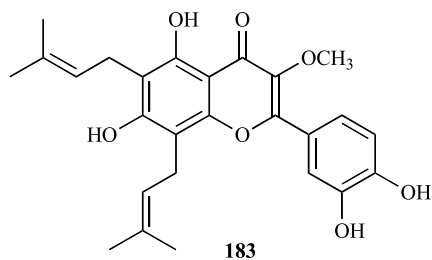
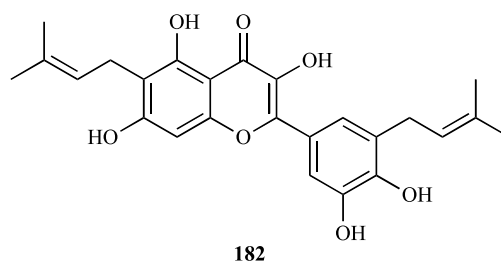
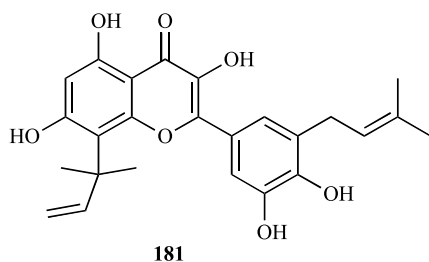


180

was observed to be the highest inhibitor with an IC<sub>50</sub> = 26.8 μM while **185**, lacking the 3'-hydroxy group in ring B, was observed to show an IC<sub>50</sub> value of 36.4 μM. Both compounds were also found to have the ability of significantly inhibiting BChE.

On the other hand, a pterocarpan with moderate AChE inhibition was isolated from the polar extract of *Zygophyllum*

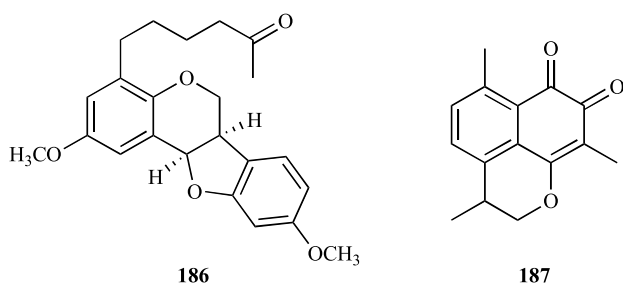
*eurypterum* (Zygophyllaceae) collected in Pakistan. Atricarpan D [(-)-2,9-dimethoxy-4-(5-oxohexyl)pterocarpan] (**186**) was observed to inhibit AChE with an IC<sub>50</sub> = 20.5 μM [68]. Interestingly, three other pterocarpan with similar structure were obtained along with atricarpan D but they were found to be inactive against AChE. Nevertheless, the four pterocarpan were all found to be BChE inhibitors.



A study conducted on AChE and BChE inhibitory activity of coumarins and naphthoquinones obtained from *Mansonia gagei* (Sterculiaceae) proposed a novel class of cholinesterase inhibitor, mansonones or 1,2-naphthoquinones [69]. The level of cholinesterase inhibition observed in this study seemed to correlate to the presence of a fused pyran ring and a substituent at C-6 being present in the molecule. Mansonone E (**187**) was observed to be the most active AChE ( $IC_{50} = 23.5 \mu M$ ) and BChE inhibitor.

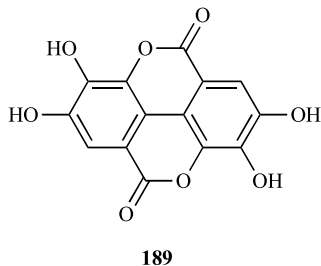
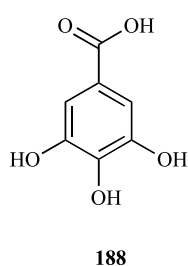
to elicit a notable AChE inhibition ( $IC_{50} = 4.33 \mu M$ ) with respect to huperzine A ( $IC_{50} = 1.6 \mu M$ ), as a reversible mixed-type inhibitor [71].

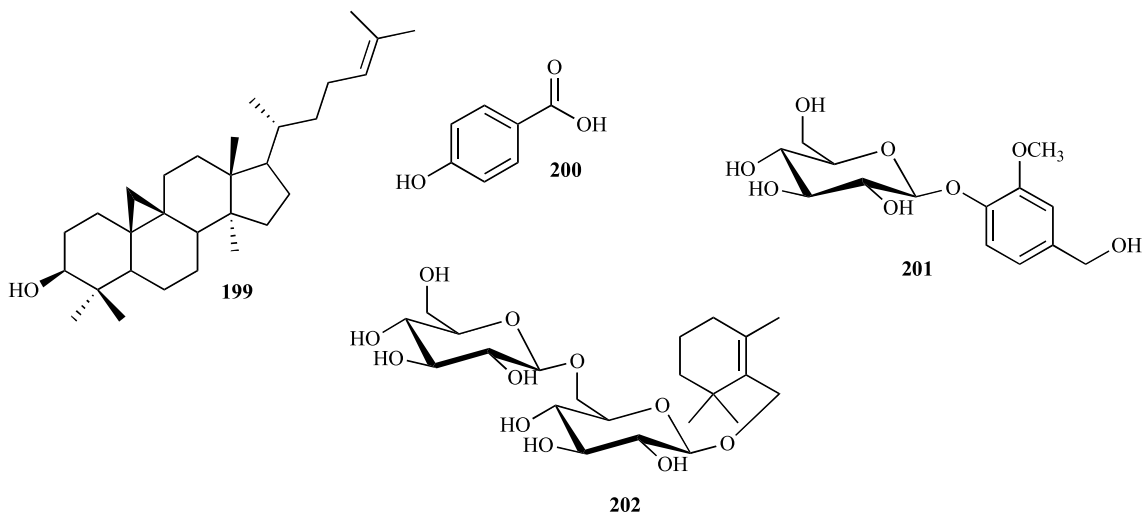
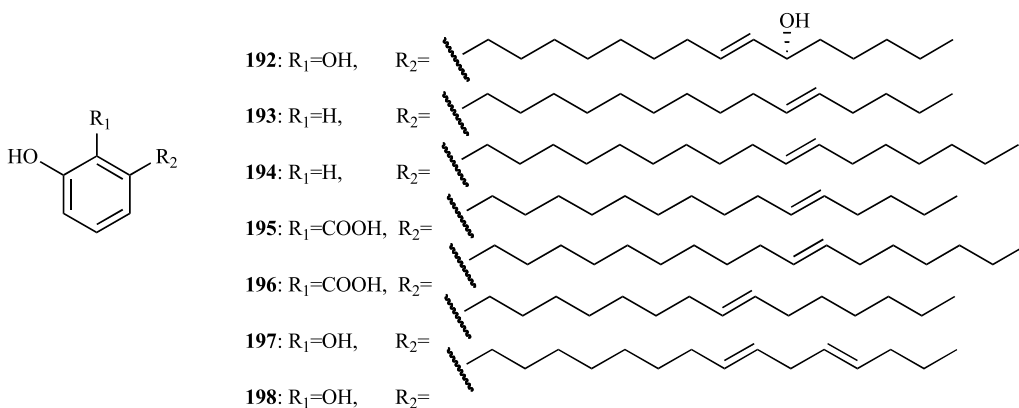
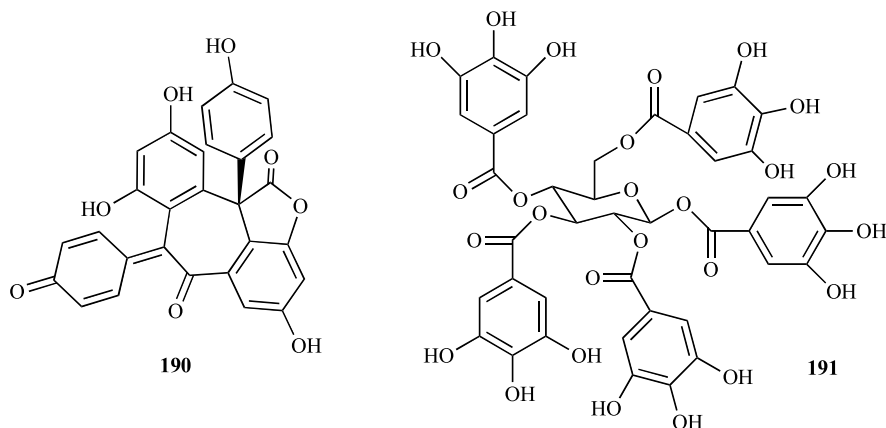
The bioassay-guided fractionation of the extract from *Terminalia chebula* (Combretaceae) fruits allowed the isolation of 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (**191**) which demonstrated to be a significant AChE inhibitor ( $IC_{50} = 29.9 \mu M$ ) [72]. This gallotanin which has been also isolated from other different sources and which is known by its diverse biological activities, was observed to exert good BChE inhibition and potent antioxidant activity (FRAP assay) in this study.



In several studies published during the period covered in the present review various phenolic compounds with different structural characteristics were reported as AChEi. Some of them are structurally simple such as gallic acid (**188**,  $IC_{50} = 5.85 \mu M$ ) and ellagic acid (**189**,  $IC_{50} = 45.63 \mu M$ ) [70]. Hopeahainol A (**190**), which was identified as a new compound isolated from *Hopea hainensis*, was observed

The bioassay-guided extraction of the stem bark of *Knema laurina* (Myristicaceae) yielded two active fractions (dichloromethane and hexane) which were subjected to chromatographic separation. That latter yielded five alkenyl phenol and salicylic acid derivatives **192** - **196**, of which **192** and **193** were new compounds [73]. Compounds **192**, **195** and **196**, all having salicylic acid moiety, were observed to strongly inhibit AChE with an  $IC_{50} = 3.182$ ,  $2.172$  and  $0.573 \mu M$ , respectively. Compounds **193** and **194**, with no carboxyl moiety, were observed to be good AChE inhibitors ( $IC_{50} = 17.224$  and  $13.114 \mu M$ , respectively). These findings suggest that the acidic group is key to good AChE inhibition. It was also observed that anti-AChE activity dramatically decreased when the acidic and the phenolic hydroxy group were methylated. Two catechol alkenyls were isolated from the fruits of *Semecarpus anacardium* (Anacardiaceae), a species used in Ayurvedic medicine for retarding and treatment of memory loss [74]. Compounds **197** and **198** were identified as active components of the dichloromethane extract through a fractionation guided by the detection of AChE inhibition. Microplate assay revealed that these catechol alkenyls are moderate and weak selective AChEi. Compound **197**, with a double bond in the aliphatic chain, was identified as a stronger inhibitor ( $IC_{50} = 39.7 \mu M$ ) with respect to compound **198**, with two double bonds in the aliphatic chain ( $IC_{50} = 108 \mu M$ ).





On the other hand, four structurally diverse AChEi were isolated from the polar extract of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) stamens [75]. Cycloartenol (**199**), *p*-hydroxybenzoic acid (**200**), vanilloloside (**201**) and nuciferoside (**202**) were found to elicit good and noncompetitive inhibition against AChE with an IC<sub>50</sub> = 11.89, 20.07, 4.55 and 3.2 μM, respectively. In the same study, compounds **199**, **200** and **202** were observed to exert moderate BChE inhibition and compounds **199** - **202** were found to show no inhibition against BACE1.

### PLANT EXTRACTS, FRACTIONS AND ESSENTIAL OILS WITH AChE INHIBITORY ACTIVITY

Table 1 summarizes the studies published from 2006 to 2012 on plant extracts, fractions and essential oils that have been found to be good AChE inhibitors (IC<sub>50</sub> < 500 μg/mL). Those plants included in other recent reviews were omitted [76, 77]. Extracts and fractions under further phytochemical studies that led to the discovery of AChE inhibitors were also omitted. Whenever possible, reference is made to the

Table 1. Plant Extracts, Fractions and Essential Oils with AChE Inhibitory Activity

Family and Botanical Name	Type of Extract (Solvent)	Plant's Parts	AChE Inhibition (%)	IC <sub>50</sub>	Refs.
<b>Acanthaceae</b>					
<i>Andrographis paniculata</i>	H <sub>2</sub> O:EtOH	Aerial		222.41 µg/ml	[78]
<b>Amaranthaceae</b>					
<i>Salsola oppositifolia</i>	Alkaloids	Aerial		70.0 µg/ml	[79]
<i>Salsola soda</i>	Alkaloids	Aerial		64.1 µg/ml	[79]
<i>Salsola tragus</i>	Alkaloids	Aerial		30.2 µg/ml	[79]
<b>Amaryllidaceae</b>					
<i>Crinum jagus</i>	MeOH	Leaf	74.25 (42 µg/ml)		[80]
<i>Crinum moorei</i>	50% MeOH PE DCM EtOH	Bulb		21.5 µg/ml 18.9 µg/ml 2.9 µg/ml 22.5 µg/ml	[81]
<i>Nerine undulata</i>	Alkaloids	Bulb		14.3 µg/ml <sup>a</sup>	[82]
<i>Scadoxus multiflorus</i>	Alkaloids	Bulb		313.5 µg/ml <sup>a</sup>	[82]
<i>Sprekelia formosissima</i>	Alkaloids	Bulb		209.7 µg/ml <sup>a</sup>	[82]
<i>Zephyranthes grandiflora</i>	Alkaloids	Bulb		39.2 µg/ml <sup>a</sup>	[83]
<b>Anacardiaceae</b>					
<i>Harpephyllum caffrum</i>	DCM MeOH	Leaf Stem bark Leaf		0.17 mg/ml 0.02 mg/ml 0.12 mg/ml	[84]
<i>Pistacia atlantica</i>	H <sub>2</sub> O	Leaf		0.87 µg/ml	[85]
<i>Pistacia lentiscos</i>	H <sub>2</sub> O	Leaf		13.67 µg/ml	[85]
<i>Sclerocarya birrea</i>	DCM MeOH	Young stem Leaf Operculum Young stem		0.15 mg/ml 0.10 mg/ml 0.35 mg/ml 0.47 mg/ml	[84]
<i>Spondias mombin</i>	MeOH	Root bark	64.77 (42 µg/ml)		[80]
<b>Apiaceae</b>					
<i>Centella asiatica</i>	H <sub>2</sub> O:EtOH	Whole plant		106.55 µg/ml	[78]
<b>Apocynaceae</b>					
<i>Geissospermum vellosii</i>	Alkaloids	Stem bark		2.9 µg/ml	[86]
<b>Araceae</b>					
<i>Colocasia antiquorum</i>	50% MeOH PE DCM	Tuber		7.9 µg/ml 6.4 µg/ml 168.1 µg/ml	[81]
<i>Pinellia ternata</i>	Alkaloids	Tuber		56.2 µg/ml	[87]
<b>Areaceae</b>					
<i>Phoenix dactylifera</i>	Hexane	Seed	52.96 (300 µg/ml)		[88]

Table 1. contd....

Family and Botanical Name	Type of Extract (Solvent)	Plant's Parts	AChE Inhibition (%)	IC <sub>50</sub>	Refs.
<b>Asparagaceae</b>					
<i>Leopoldia comosa</i>	Hexane	Bulb		104.9 µg/ml	[89]
<b>Asphodelaceae</b>					
<i>Aloe ferox</i>	50% MeOH PE DCM	Leaf		84.0 µg/ml 37.7 µg/ml 62.6 µg/ml	[81]
<b>Asteraceae</b>					
<i>Achyrocline tomentosa</i>	Organic	Aerial		0.4847 mg/ml	[90]
<i>Arnica chamissonis</i> ssp. <i>foliosa</i>	MeOH Hexane	Flower		43 µg/ml 29 µg/ml	[91]
<i>Chromolaena tequendamensis</i>	MeOH	Whole plant		359.36 mg/l	[92]
<i>Eupatorium viscidum</i>	Organic	Aerial		0.4792 mg/ml	[90]
<i>Pulicaria stephanocarpa</i>	CHCl <sub>3</sub>	Leaf	61.43 (0.2 mg/ml)		[93]
<i>Schistocarpha sinforosi</i>	MeOH	Whole plant		145.31 mg/l	[92]
<i>Trichocline reptans</i>	Organic	Aerial		0.1118 mg/ml	[90]
<b>Berberidaceae</b>					
<i>Berberis darwinii</i>	MeOH	Stem bark		1.23 µg/ml	[94]
<b>Boraginaceae</b>					
<i>Onosma bracteata</i>	MeOH	Leaf	59.73 (250 µg/ml)		[95]
<b>Buddlejaceae</b>					
<i>Buddleja salviifolia</i>	DCM:MeOH (1:1)	Whole plant		0.05 mg/ml	[96]
<b>Burseraceae</b>					
<i>Boswellia socotranao</i>	CHCl <sub>3</sub>	Resin	71.21 (0.2 mg/ml)		[93]
<b>Cistaceae</b>					
<i>Cistus laurifolius</i>	EtOH	Leaf	80.07 (200 µg/ml)		[97]
<b>Combretaceae</b>					
<i>Terminalia bellirica</i>	MeOH	Fruit		14.37 µg/ml	[70]
<b>Convolvulaceae</b>					
<i>Evolvulus alsinoides</i>	H <sub>2</sub> O:EtOH	Whole plant		141.76 µg/ml	[78]
<i>Ipomoea asarifolia</i>	MeOH	Leaf		0.12 µg/ml	[98]
<b>Crassulaceae</b>					
<i>Kalanchoe brasiliensis</i>	EtOAc	Leaf		0.16 mg/ml	[98]
<b>Cucurbitaceae</b>					
<i>Eureiandra balfourii</i>	MeOH	Tuber	58.61 (0.2 mg/ml)		[93]
<b>Cupressaceae</b>					
<i>Juniperus phoenicea</i>	EtOH	Leaf	53.44 (400 µg/ml)		[99]
<i>Juniperus turbinata</i>	Phenolic	Leaf	83.84 (400 µg/ml)		[99]

Table 1. contd....

Family and Botanical Name	Type of Extract (Solvent)	Plant's Parts	AChE Inhibition (%)	IC <sub>50</sub>	Refs.
<b>Ericaceae</b>					
<i>Rhododendron yedoense</i> var. <i>poukhanense</i>	80% MeOH	Bark		169.01 µg/ml	[100]
<b>Eucommiaceae</b>					
<i>Eucommia ulmoides</i>	H <sub>2</sub> O	Bark		172 µg/ml	[101]
<b>Euphorbiaceae</b>					
<i>Alchornia laxiflora</i>	MeOH	Stem bark	41.12 (42 µg/ml)		[80]
<i>Cephalocroton socotranus</i>	CHCl <sub>3</sub>	Bark	51.1 (0.2 mg/ml)		[93]
<i>Jatropha curcas</i>	MeOH	Leaf		0.25 mg/ml	[98]
<i>Jatropha gossypifolia</i>	MeOH	Leaf		0.05 mg/ml	[98]
<b>Fabaceae</b>					
<i>Acacia nilotica</i>	H <sub>2</sub> O	Root		0.079 mg/ml <sup>b</sup>	[102]
<i>Acacia raddiana</i>	H <sub>2</sub> O	Bark		33.91 µg/ml	[85]
<i>Cassia obtusifolia</i>	EtOH	Seed		81.6 µg/ml <sup>c</sup>	[103]
<i>Chamaecrista mimosoides</i>	DCM:MeOH (1:1) H <sub>2</sub> O	Root		0.03 mg/ml 0.35 mg/ml	[96]
<i>Genista tenera</i>	EtOAc	Aerial	77.0 (70 µg/ml)		[105]
<i>Peltophorum pterocarpum</i>	MeOH	Leaf Stem bark	49.5 (42 µg/ml) 68.85 (42 µg/ml)		[80]
<i>Schotia brachypetala</i>	DCM:MeOH (1:1) H <sub>2</sub> O	Bark		0.27 mg/ml 0.49 mg/ml	[96]
<i>Senna alata</i>	EtOAc	Leaf		0.08 mg/ml	[98]
<i>Spatholobus suberectus</i>	H <sub>2</sub> O EtOH	Whole plant		85 µg/ml 9 µg/ml	[104]
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	EtOAc Alkaloids	Seed		53.00 µg/ml 9.23 µg/ml	[106]
<b>Gobulariaceae</b>					
<i>Globularia alypum</i>	H <sub>2</sub> O	Root		16.67 µg/ml	[85]
<b>Guttiferaceae</b>					
<i>Callophyllum inophyllum</i>	MeOH	Root bark	56.52 (42 µg/ml)		[80]
<b>Hypericaceae</b>					
<i>Hypericum perforatum</i>	MeOH	Whole plant		178 µg/ml	[91]
<b>Illiciaceae</b>					
<i>Illicium verum</i>	H <sub>2</sub> O:EtOH Butanol EtOAc CHCl <sub>3</sub> Oil	Fruit		58.67 µg/ml 44.94 µg/ml 83.75 µg/ml 103.03 µg/ml 39.89 µg/ml	[107]

Table 1. contd....

Family and Botanical Name	Type of Extract (Solvent)	Plant's Parts	AChE Inhibition (%)	IC <sub>50</sub>	Refs.
<b>Lamiaceae</b>					
<i>Cyclotrichium niveum</i>	EtOAc	Whole plant	83.11 (250 µg/ml)		[108]
	DCM		70.82 (250 µg/ml)		
<i>Hyssopus officinalis</i>	Hexane	Whole plant	55.0 (400 µg/ml)		[91]
<i>Lavandula viridis</i>	MeOH	Aerial		244.55 µg/ml	[109]
<i>Marrubium vulgare</i>	Acetone	Aerial	62.70 (25 µg/ml)		[110]
<i>Origanum ehrenbergii</i>	Essential oil	Aerial		0.3 µg/ml	[111]
<i>Origanum majorana</i>	Essential oil	Leaf		36.40 µg/ml	[112]
<i>Origanum syriacum</i>	Essential oil	Aerial		1.7 µg/ml	[111]
<i>Pycnostachys reticulata</i>	50% MeOH	Leaf		28.8 µg/ml	[81]
	EtOH		8.8 µg/ml		
<i>Salvia chionantha</i>	Essential oil	Aerial	56.7 (500 µg/ml)		[113]
<i>Salvia fruticosa</i>	DCM	Whole plant	51.07 (100 µg/ml)		[114]
<i>Salvia leriifolia</i>	Essential oil	Aerial		0.32 µl/ml	[115]
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	H <sub>2</sub> O	Root		50 µg/ml	[104]
	EtOH		5 µg/ml		
<i>Teucrium royleanum</i>	MeOH	Whole plant	52.4 (40 µg/0.2ml)		[116]
<b>Menispermaceae</b>					
<i>Stephania pierrei</i>	EtOH	Tuber		5.68 µg/ml	[117]
<i>Tinospora cordifolia</i>	MeOH	Stem		38.36 µg/ml	[118]
<b>Moraceae</b>					
<i>Dorstenia gigas</i>	CHCl <sub>3</sub>	Leaf	65.12 (0.2 mg/ml)		[93]
<i>Ficus religiosa</i>	MeOH	Stem bark		73.69 µg/ml	[118]
<b>Myristicaceae</b>					
<i>Myristica fragrans</i>	H <sub>2</sub> O:EtOH	Seed		133.28 µg/ml	[78]
<i>Embelia ribes</i>	MeOH	Root		23.04 µg/ml	[118]
<b>Orchidaceae</b>					
<i>Orchis mascula</i>	MeOH	Root	56.99 (250 µg/ml)		[119]
<b>Paeoniaceae</b>					
<i>Paeonia lactiflora</i>	H <sub>2</sub> O	Root		20 µg/ml	[104]
	EtOH		8 µg/ml		
<i>Paeonia veitchii</i>	H <sub>2</sub> O	Root		14 µg/ml	[104]
	EtOH		45 µg/ml		
<b>Papaveraceae</b>					
<i>Corydalis intermedia</i>	MeOH	Whole plant	84 (100 µg/ml)		[120]
	H <sub>2</sub> O	Tuber	97 (100 µg/ml)		
		Whole plant	57 (100 µg/ml)		
		Tuber	78 (100 µg/ml)		



Table 1. contd....

Family and Botanical Name	Type of Extract (Solvent)	Plant's Parts	AChE Inhibition (%)	IC <sub>50</sub>	Refs.
<b>Papaveraceae</b>					
<i>Corydalis solid</i> ssp. <i>laxa</i>	MeOH	Whole plant	89 (100 µg/ml)		[120]
	H <sub>2</sub> O	Tuber	96 (100 µg/ml)		
		Whole plant	78 (100 µg/ml)		
		Tuber	85 (100 µg/ml)		
<i>Corydalis solid</i> ssp. <i>slivenensis</i>	MeOH	Whole plant	82 (100 µg/ml)		[120]
	H <sub>2</sub> O	Tuber	97 (100 µg/ml)		
		Whole plant	48 (100 µg/ml)		
		Tuber	87 (100 µg/ml)		
<b>Phyllanthaceae</b>					
<i>Emblica officinalis</i>	MeOH	Fruit		29.26 µg/ml	[70]
<b>Pinaceae</b>					
<i>Pinus halepensis</i>	EtOH	Needle	60.15 (200 µg/ml)		[121]
	Essential oil	Twig	83.91 (200 µg/ml)		
<i>Pinus heldreichii</i> subsp. <i>leucodermis</i>	Essential oil	Needle		51.1 µg/ml	[122]
<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>nigra</i>	Essential oil	Needle		94.4 µg/ml	[122]
<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>calabrica</i>	Essential oil	Needle		101.5 µg/ml	[122]
<i>Pinus pinaster</i>	Pycnogenol	Bark	63.33 (200 µg/ml)		[121]
<b>Piperaceae</b>					
<i>Piper nigrum</i>	EtOH	Fruit		30.67 µg/ml	[117]
<b>Poaceae</b>					
<i>Cymbopogon jawarancusa</i>	MeOH	Whole plant	72.36 (250 µg/ml)		[95]
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	Essential oil	Fresh leaf (mountain reg./ desert reg.)		0.26 / 0.67 mg/ml	[123]
		Dried leaf (mountain reg./ desert reg.)		0.44 / 0.52 mg/ml	
		Dried root (mountain reg./ desert reg.)		0.27 / 0.32 mg/ml	
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	Hexane	Shoot (mountain reg./ desert reg.)		0.50 / 0.54 mg/ml	[124]
	DCM			0.57 / 0.30 mg/ml	
	EtOAc			0.23 / 0.30 mg/ml	
	MeOH			0.23 / 0.25 mg/ml	
	H <sub>2</sub> O			0.46 / 0.04 mg/ml	
<b>Polygonaceae</b>					
<i>Fallopia multiflora</i>	H <sub>2</sub> O	Root		13 µg/ml	[104]
	EtOH			65 µg/ml	
<i>Rheum palmatum</i>	H <sub>2</sub> O	Root and Rizhome		32 µg/ml	[104]
	EtOH			18 µg/ml	
<i>Ruprechtia apetala</i>	EtOH	Aerial		0.0779 mg/ml	[90]
<b>Portulacaceae</b>					
<i>Portulaca oleracea</i>	Alkaloids	Upper part		29.4 µg/ml	[87]

Table 1. contd....

Family and Botanical Name	Type of Extract (Solvent)	Plant's Parts	AChE Inhibition (%)	IC <sub>50</sub>	Refs.
<b>Rhamnaceae</b>					
<i>Rhamnus prinoides</i>	H <sub>2</sub> O	Root		0.201 mg/ml <sup>b</sup>	[102]
<b>Rosaceae</b>					
<i>Leucosidea sericea</i>	PE	Leaf		0.16 mg/ml	[125]
	DCM	Stem		0.14 mg/ml	
	MeOH			0.24 mg/ml	
	PE			0.26 mg/ml	
<b>Rubiaceae</b>					
<i>Galium odoratum</i>	Hexane	Whole plant	53.1 (400 µg/ml)		[91]
<i>Morinda citrifolia</i>	EtOH	Fruit		138.4 µg/ml	[126]
	CHCl <sub>3</sub>			78.11 µg/ml	
<i>Morinda lucida</i>	MeOH	Leaf	40.15 (42 µg/ml)		[80]
<b>Rutaceae</b>					
<i>Citrus aurantifolia</i>	Essential oil	Leaf		139 µg/ml	[127]
<i>Citrus medica</i>	Essential oil	Peel		171.3 µg/ml	[128]
<i>Ruta graveolens</i>	MeOH	Whole plant	59.1 (100 µg/ml)		[91]
	Hexane			34 µg/ml	
<i>Zanthoxylum coco</i>	Organic	Aerial		0.1579 mg/ml	[90]
<b>Solanaceae</b>					
<i>Solanum leucocarpum</i>	MeOH	Whole plant		204.59 mg/l	[92]
<i>Withania somnifera</i>	MeOH	Root		33.38 µg/ml	[118]
<i>Witheringia coccoloboides</i>	MeOH	Whole plant		220.68 mg/l	[92]
<b>Valerianaceae</b>					
<i>Nardostachys jatamansi</i>	H <sub>2</sub> O:EtOH	Rhizome		130.11 µg/ml	[78]
	MeOH			47.21 µg/ml	[118]
<b>Zingiberaceae</b>					
<i>Kaempferia parviflora</i>	EtOH	Rhizome		20.64 µg/ml	[117]

DCM: dichloromethane; MeOH: methanol; EtOH: ethanol; PE: petroleum ether; EtOAc: ethyl acetate

<sup>a</sup>Human blood AChE.

<sup>b</sup>Bovine erythrocyte AChE.

<sup>c</sup>Mouse brain homogenized.

part of the plant used in each study reported. AChE inhibitory activity is reported in the same way as it was reported by authors and IC<sub>50</sub> values were chosen instead of inhibition percentages when both were available.

#### CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

CONICET, CIC, UNS and ANPCYT.

#### REFERENCES

- [1] Chopra, K.; Misra, S.; Kuhad, A. Current perspectives on pharmacotherapy of Alzheimer's. *Expert. Opin. Pharmacother.*, **2011**, *12*, 335-350.
- [2] Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, *7*, 88-95.
- [3] Lopez, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci.*, **2002**, *71*, 2521-2529.
- [4] Rhee, I.K.; van de Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae

- using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chromatogr. A*, **2001**, *915*, 217-223.
- [5] Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem. Anal.*, **2002**, *13*, 51-54.
- [6] Di Giovanni, S.; Borloz, A.; Urbain, A.; Marston, A.; Hostettmann, K.; Carrupt, P.A.; Reist, M. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2008**, *33*, 109-119.
- [7] Houghton, P.J.; Ren, Y.; Howes, M.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.*, **2006**, *23*, 181-199.
- [8] Williams, P.; Sorribas, A.; Howes, M.J. Natural Products as a source of Alzheimer's drugs leads. *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, *28*, 48-77.
- [9] Mukherjee, P.K.; Kumar, V.; Mal, M.; Houghton, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, **2007**, *14*, 289-300.
- [10] Orhan, G.; Orhan, I.; Subutay-Oztekin, N.; Ak, F.; Sener, B. Contemporary anticholinesterase pharmaceuticals of natural origin and their synthetic analogues for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent Pat. CNS Drug. Discov.*, **2009**, *4*, 43-51.
- [11] Rahman, A.U.; Khalid, A.; Sultana, N.; Ghayur, M.N.; Mesaik, M.A.; Khan, M.R.; Gilani, A.H.; Choudhary, M.I. New natural cholinesterase inhibiting and calcium channel blocking quinoline alkaloids. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2006**, *21*, 703-710.
- [12] Cardoso-Lopes, E.M.; Maier, J.A.; da Silva, M.R.; Regasini, L.O.; Simote, S.Y.; Lopes, N.P.; Pirani, J.R.; da Silva Bolzani, V.; Marx Young, M.C. Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer Disease. *Molecules*, **2010**, *15*, 9205-9213.
- [13] Yang, Z.; Zhang, D.; Ren, J.; Yang, M. Skimmianine, a furoquinoline alkaloid from *Zanthoxylum nitidum* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. *Med. Chem. Res.*, **2012**, *21*, 722-725.
- [14] Mukherjee, P.K.; Mukherjee, D.; Maji, A.K.; Rai, S.; Heinrich, M. The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) - phytochemical and therapeutic profile. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2009**, *61*, 407-422.
- [15] Yang, Z.; Zhang, X.; Du, J.; Ma, Z.J.; Guo, F.; Li, S.; Yao, X.J. An aporphine alkaloid from *Nelumbo nucifera* as an acetylcholinesterase inhibitor and the primary investigation for structure-activity correlations. *Nat. Prod. Res.*, **2012**, *26*, 387-392.
- [16] Mollataghi, A.; Coudiere, E.; Hadi, A.H.; Mukhtar, M.R.; Awang, K.; Litaudon, M.; Ata, A. Anti-acetylcholinesterase, anti- $\alpha$ -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. *Fitoterapia*, **2012**, *83*, 298-302.
- [17] Hung, T.M.; Na, M.; Dat, N.T.; Ngoc, T.M.; Youn, U.; Kim, H.J.; Min, B.S.; Lee, J.; Bae, K. Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. *J. Ethnopharmacol.*, **2008**, *119*, 74-80.
- [18] Hung, T.M.; Ngoc, T.M.; Youn, U.J.; Min, B.S.; Na, M.; Thuong, P.T.; Bae, K. Anti-amnesic activity of pseudocoptisine from *Corydalis tuber*. *Biol. Pharm. Bull.*, **2008**, *31*, 159-162.
- [19] Jung, H.A.; Min, B.S.; Yokozawa, T.; Lee, J.H.; Kim, Y.S.; Choi, J.S. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. *Biol. Pharm. Bull.*, **2009**, *32*, 1433-1438.
- [20] Chlebek, J.; Macáková, K.; Cahlíkovi, L.; Kurfürst, M.; Kunes, J.; Opletal, L. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). *Nat. Prod. Commun.*, **2011**, *6*, 607-610.
- [21] Ingkaninan, K.; Phengpa, P.; Yuenyongsawad, S.; Khorana, N. Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2006**, *58*, 695-700.
- [22] Cho, K.M.; Yoo, I.D.; Kim, W.G. 8-Hydroxydihydrochelerythrine and 8-Hydroxydihydrosanguinarine with a potent acetylcholinesterase inhibitory activity from *Chelidonium majus* L. *Biol. Pharm. Bull.*, **2006**, *29*, 2317-2320.
- [23] Rollinger, J.M.; Schuster, D.; Baier, E.; Ellmerer, E.P.; Langer, T.; Stuppner, H. Taspine: bioactivity-guided isolation and molecular ligand-target insight of a potent acetylcholinesterase inhibitor from *Magnolia x soulangiana*. *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*, 1341-1346.
- [24] Pereira, D.M.; Ferreres, F.; Oliveira, J.M.; Gaspar, L.; Faria, J.; Valentão, P.; Sottomayor, M.; Andrade, P.B. Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. *Phytomedicine*, **2010**, *17*, 646-652.
- [25] Zhan, Z.J.; Yu, Q.; Wang, Z.L.; Shan, W.G. Indole alkaloids from *Ervatamia hainanensis* with potent acetylcholinesterase inhibition activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 6185-6187.
- [26] Andrade, M.T.; Lima, J.A.; Pinto, A.C.; Rezende, C.M.; Carvalho, M.P.; Epifanio, R.A. Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Muell. Arg) Miens that inhibit acetylcholinesterase enzyme. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 4092-4095.
- [27] Ingkaninan, K.; Changwijit, K.; Suwanborirux, K. Vobasiny-iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2006**, *58*, 847-852.
- [28] Yang, Z.; Duan, D.Z.; Du, J.; Yang, M.J.; Li, S.; Yao, X.J. Geissoschizine methyl ether, a corynanthean-type indole alkaloid from *Uncaria rhynchophylla* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. *Nat. Prod. Res.*, **2012**, *26*, 22-28.
- [29] Seidl, C.; Correia, B.L.; Stinghen, A.E.; Santos, C.A. Acetylcholinesterase inhibitory activity of uleine from *Himatanthus lancifolius*. *Z. Naturforsch. C.*, **2010**, *65*, 440-444.
- [30] Jin, Z. Amaryllidaceae and Scieletium alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, **2007**, *24*, 886-905.
- [31] de Andrade, J.P.; Berkov, S.; Viladomat, F.; Codina, C.; Zuanazzi, J.A.; Bastida, J. Alkaloids from *Hippeastrum papillo*. *Molecules*, **2011**, *16*, 7097-7104.
- [32] Berkov, S.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J. N-Alkylated galanthamine derivatives: Potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 2263-2266.
- [33] Sarikaya, B.B.; Kaya, G.I.; Onur, M.A.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J.; Somer, N.U. Alkaloids from *Galanthus rizehensis*. *Phytochem. Lett.*, **2012**, *5*, 367-370.
- [34] Rijn, R.M.; Rhee, I.K.; Verpoorte, R. Isolation of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Nat. Prod. Res.*, **2010**, *24*, 222-225.
- [35] Mulholland, D.A.; Crouch, N.; Decker, B.; Smith, M. T. The isolation of the Amaryllidaceae alkaloid crinamine from *Dioscorea dregeana*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **2002**, *30*, 183-185.
- [36] Wang, Y.H.; Zhang, Z.K.; Yang, F.M.; Sun, Q.Y.; He, H.P.; Di, Y.T.; Mu, S.Z.; Lu, Y.; Chang, Y.; Zheng, Q.T.; Ding, M.; Dong, J.H.; Hao, X.J. Benzylphenethylamine Alkaloids from *Hosta plantaginea* with Inhibitory Activity against Tobacco Mosaic Virus and Acetylcholinesterase. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 1458-1461.
- [37] Ma, X.; Gang, D.R. The Lycopodium alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, *21*, 752-772.
- [38] Katakawa, K.; Nozoe, A.; Kogure, N.; Kitajima, M.; Hosokawa, M.; Takayama, H. Fawcettimine-related alkaloids from *Lycopodium serratum*. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 1024-1028.
- [39] Takayama, H.; Katakawa, K.; Kitajima, M.; Yamaguchi, K.; Aimi, N. Ten new Lycopodium alkaloids having the lycopodane skeleton isolated from *Lycopodium serratum* Thunb. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2003**, *51*, 1163-1169.
- [40] Choo, C.Y.; Hirasawa, Y.; Karimata, C.; Koyama, K.; Sekiguchi, M.; Kobayashi, J.; Morita, H. Carinatamins A-C, new alkaloids from *Lycopodium carinatum* inhibiting acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 1703-1707.
- [41] Hirasawa, Y.; Kato, E.; Kobayashi, J.; Kawahara, N.; Goda, Y.; Shiro, M.; Morita, H. Lycoparins A-C, new alkaloids from *Lycopodium casuarinoides* inhibiting acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 6167-6171.
- [42] Howes, M.-J.R.; Houghton, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors of natural origin. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.*, **2009**, *3*, 67-86.
- [43] Devkota, K.P.; Lenta, B.N.; Fokou, P.A.; Sewald, N. Terpenoid alkaloids of the Buxaceae family with potential biological importance. *Nat. Prod. Rep.*, **2008**, *25*, 612-630.
- [44] Rahman, A.U.; Ul-Haq, Z.; Khalid, A.; Anjum, S.; Khan, M.R.; Choudhary, M.I. Pregnane-Type steroidal alkaloids of *Sarcococca saligna*: a new class of cholinesterase inhibitors. *Helv. Chim. Acta*, **2002**, *85*, 678-688.
- [45] Rahman, A.U.; Feroz, F.; Ul-Haq, Z.; Nawaz, S.A.; Khan, M.R.; Choudhary, M.I. New steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna*. *Nat. Prod. Res.*, **2003**, *17*, 235-241.
- [46] Rahman, A.U.; Feroz, F.; Naem, I.; Ul-Haq, Z.; Nawaz, S.A.; Khan, N.; Khan, M.R.; Choudhary, M.I. New pregnane-type

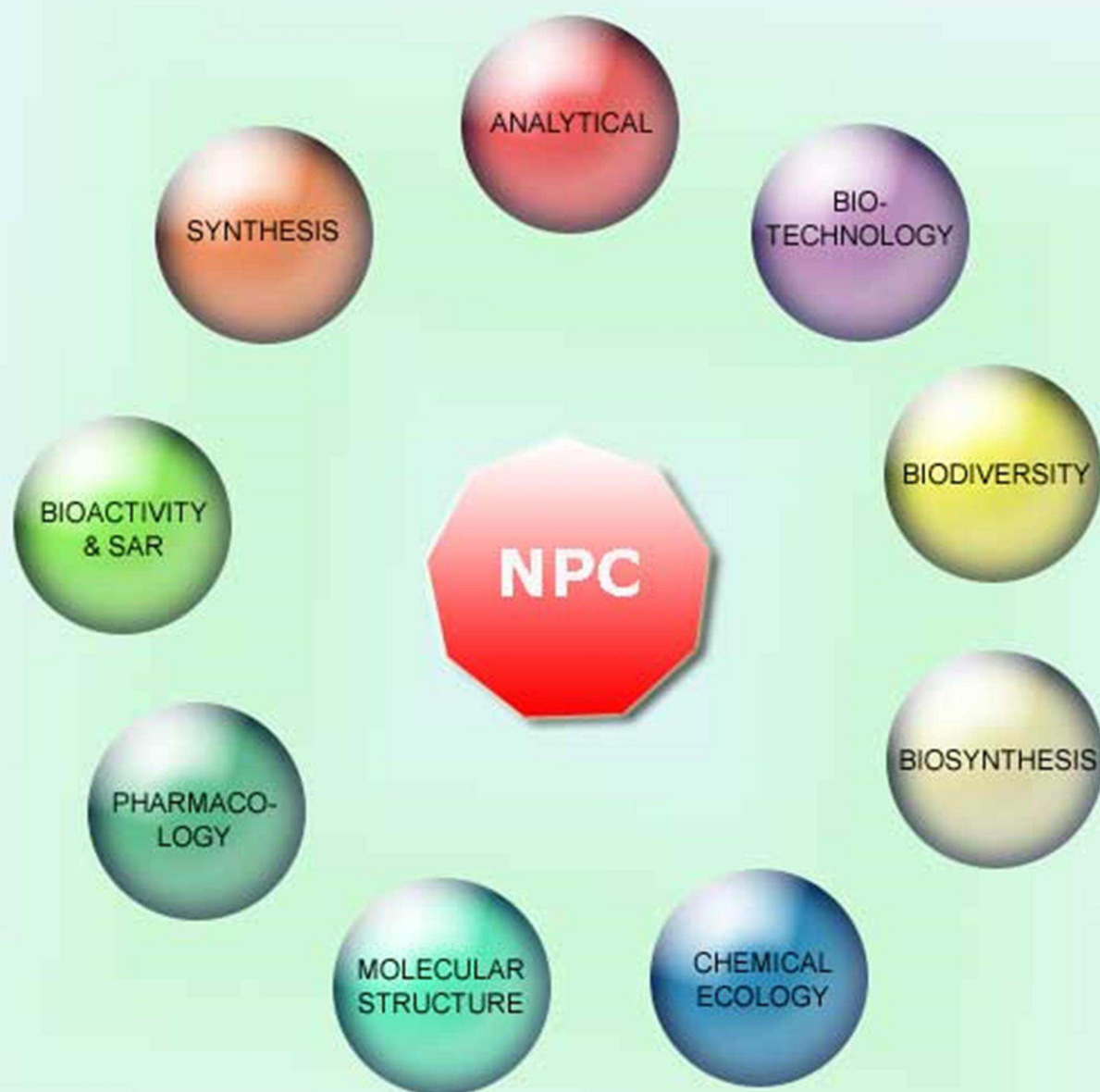
- steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna* and their cholinesterase inhibitory activity. *Steroids*, **2004**, *69*, 735-741.
- [47] Devkota, K.P.; Lenta, B.N.; Choudhary, M.I.; Naz, Q.; Fekam, F.B.; Rosenthal, P.J.; Sewald, N. Cholinesterase inhibiting and antiplasmodial steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2007**, *55*, 1397-1401.
- [48] Devkota, K.P.; Lenta, B.N.; Wansi, J.; Choudhary, M.I.; Kisangau, D.P.; Naz, Q.; Samreen; Sewald, N. Bioactive 5 $\alpha$ -Pregnane-type steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71*, 1481-1484.
- [49] Ata, A. In *Studies in Natural Products Chemistry*, 1st Edition, Vol. 38, Rahman, A.U., Ed.; Elsevier B.V.: Amsterdam, **2012**; pp. 225-245.
- [50] Ata, A.; Iverson, C.D.; Kalhari, K.S.; Akhter, S.; Betteridge, J.; Meshkatsadat, M.H.; Orhan, I.; Sener, B. Triterpenoidal alkaloids from *Buxus hircana* and their enzyme inhibitory, anti-fungal and anti-leishmanial activities. *Phytochemistry*, **2010**, *71*, 1780-1786.
- [51] Matochko, W.L.; James, A.; Lam, C.W.; Kozera, D.; Ata, A.; Gangan, R. Triterpenoidal alkaloids from *Buxus natalensis* and their acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 1858-1862.
- [52] Rahman, A.U.; Akhtar, M.N.; Choudhary, M.I.; Tsuda, Y.; Sener, B.; Khalid, A.; Parvez, M. New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and their cholinesterase inhibiting activities. *Chem. Pharm. Bull.*, **2002**, *50*, 1013-1016.
- [53] Lin, B.Q.; Ji, H.; Li, P.; Fang, W.; Jiang, Y. Inhibitors of acetylcholine esterase *in vitro* - Screening of steroidal alkaloids from *Fritillaria* species. *Planta Med.*, **2006**, *72*, 814-818.
- [54] Yang, Z.; Duan, D.Z.; Xue, W.W.; Yao, X.J.; Li, S. Steroidal alkaloids from *Holarrhena antidysenterica* as acetylcholinesterase inhibitors and the investigation for structure-activity relationships. *Life Sci.*, **2012**, *90*, 929-933.
- [55] Eldeen, I.M.; Van Heerden, F.R.; Van Staden, J. *In vitro* biological activities of niloticane, a new bioactive cassane diterpene from the bark of *Acacia nilotica* subsp. *kraussiana*. *J. Ethnopharmacol.*, **2010**, *128*, 555-560.
- [56] Hung, T.M.; Luan, T.C.; Vinh, B.T.; Cuong, T.D.; Min, B.S. Labdane-type diterpenoids from *Leonurus heterophyllus* and their cholinesterase inhibitory activity. *Phytother. Res.*, **2011**, *25*, 611-614.
- [57] Khan, I.; Nisar, M.; Khan, N.; Saeed, M.; Nadeem, S.; Fazal-ur-Rehman; Ali, F.; Karim, N.; Kaleem, W.A.; Qayum, M.; Ahmad, H.; Khan, I.A. Structural insights to investigate Conyopodioid as a dual cholinesterase inhibitor from *Asparagus adscendens*. *Fitoterapia*, **2010**, *81*, 1020-1025.
- [58] Riaz, N.; Nawaz, S.A.; Mukhtar, N.; Malik, A.; Afza, N.; Ali, S.; Ullah, S.; Muhammad, P.; Choudhary, M.I. Isolation and enzyme-inhibition studies of the chemical constituents from *Ajuga bracteosa*. *Chem. Biodivers.*, **2007**, *4*, 72-83.
- [59] Ahmed, E.; Nawaz, S.A.; Malik, A.; Choudhary, M.I. Isolation and cholinesterase-inhibition studies of sterols from *Haloxylon recurvum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 573-580.
- [60] Awang, K.; Chan, G.; Litaudon, M.; Ismail, N.H.; Martin, M.T.; Gueritte, F. 4-Phenylcoumarins from *Mesua elegans* with acetylcholinesterase inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 7873-7877.
- [61] Khan, M.T.; Orhan, I.; Senol, F.S.; Kartal, M.; Sener, B.; Dvorská, M.; Smejkal, K.; Slapetová, T. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem. Biol. Interact.*, **2009**, *181*, 383-389.
- [62] Urbain, A.; Marston, A.; Sintro Grilo, L.; Bravo, J.; Purev, O.; Purevsuren, B.; Batsuren, D.; Reist, M.; Carrupt, P.-A.; Hostettmann, K. Xanthenes from *Gentianella amarella* ssp. *acuta* with acetylcholinesterase and monoamine oxidase inhibitory activities. *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71*, 895-897.
- [63] Cho, J.K.; Ryu, Y.B.; Curtis-Long, M.J.; Ryu, H.W.; Yuk, H.J.; Kim, D.W.; Kim, H.J.; Lee, W.S.; Park, K.H. Cholinesterase inhibitory effects of geranylated flavonoids from *Paulownia tomentosa* fruits. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *2595*-2602.
- [64] Jung, H.A.; Jin, S.E.; Park, J.S.; Choi, J.S. Antidiabetic complications and anti-alzheimer activities of sophoflavescenol, a prenylated flavonol from *Sophora flavescens*, and its structure-activity relationship. *Phytother. Res.*, **2011**, *25*, 709-715.
- [65] Kim, J.Y.; Lee, W.S.; Kim, Y.S.; Curtis-Long, M.J.; Lee, B.W.; Ryu, Y.B.; Park, K.H. Isolation of cholinesterase-inhibiting flavonoids from *Morus lhou*. *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, *59*, 4589-4596.
- [66] Ryu, H.W.; Curtis-Long, M.J.; Jung, S.; Jeong, I.Y.; Kim, D.S.; Kang, K.Y.; Park, K.H. Anticholinesterase potential of flavonols from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) and their kinetic studies. *Food Chem.*, **2012**, *132*, 1244-1250.
- [67] Conforti, F.; Rigano, D.; Menichini, F.; Loizzo, M.R.; Senatore, F. Protection against neurodegenerative diseases of *Iris pseudopumila* extracts and their constituents. *Fitoterapia*, **2009**, *80*, 62-67.
- [68] Ahmad, V.U.; Iqbal, S.; Nawaz, S.A.; Choudhary, M.I.; Farooq, U.; Ali, S.T.; Ahmad, A.; Bader, S.; Kousar, F.; Arshad, S.; Tareen, R.B. Isolation of four new pterocarpanes from *Zygophyllum eurypterum* (syn. *Z. atriplicoides*) with enzyme-inhibition properties. *Chem. Biodivers.*, **2006**, *3*, 996-1003.
- [69] Changwong, N.; Sabphon, C.; Ingkaninan, K.; Sawasdee, P. Acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitory activities of Mansorins and Mansonones. *Phytother. Res.*, **2012**, *26*, 392-396.
- [70] Nag, G.; De, B. Acetylcholinesterase inhibitory activity of *Terminalia chebula*, *Terminalia bellerica* and *Emblca officinalis* and some phenolic compounds. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2011**, *3*, 121-124.
- [71] Ge, H.M.; Zhu, C.H.; Shi, D.H.; Zhang, L.D.; Xie, D.Q.; Yang, J.; Ng, S.W.; Tan, R.X. Hopeahainol A: An acetylcholinesterase inhibitor from *Hopea hainanensis*. *Chemistry*, **2008**, *14*, 376-381.
- [72] Sancheti, S.; Um, B.H.; Seo, S.H. 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose: A cholinesterase inhibitor from *Terminalia chebula*. *S. Afr. J. Bot.*, **2010**, *76*, 285-288.
- [73] Akhtar, M.N.; Lam, K.W.; Abas, F.; Maulidiani, H.; Ahmad, S.; Shah, S.A.; Rahman, A.U.; Choudhary, M.I.; Lajis, N.H. New class of acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Knema laurina* and their structural insights. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 4097-4103.
- [74] Adhami, H. R.; Linder, T.; Kaehlig, H.; Schuster D.; Zehl, M.; Krenn, L. Catechol alkenyls from *Semecarpus anacardium*: Acetylcholinesterase inhibition and binding mode predictions. *J. Ethnopharmacol.*, **2012**, *139*, 142-148.
- [75] Jung, H.A.; Jung, Y.J.; Hyun, S.K.; Min, B.S.; Kim, D.W.; Jung, J.H.; Choi, J.S. Selective cholinesterase inhibitory activities of a new monoterpene diglycoside and other constituents from *Nelumbo nucifera* stamens. *Biol. Pharm. Bull.*, **2010**, *33*, 267-272.
- [76] Adewusi, E.A.; Moodley, N.; Steenkamp, V. Medicinal plants with cholinesterase inhibitory activity: a review. *Afr. J. Biotechnol.*, **2010**, *9*, 8257-8276.
- [77] Barbosa Filho, J.M.; Medeiros, K.C.P.; Diniz, M.F.; Batista, L.M.; Athayde-Filho, P.F.; Silva, M.S.; da-Cunha, E.V.L.; Silva Almeida, J.R.G.; Quintans-Júnior, L.J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Braz. J. Pharmacogn.*, **2006**, *16*, 258-285.
- [78] Mukherjee, P.K.; Kumar, V.; Houghton, P.J. Screening of Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Phytother. Res.*, **2007**, *21*, 1142-1145.
- [79] Tundis, R.; Menichini, F.; Conforti, F.; Loizzo, M.R.; Bonesi, M.; Statti, G.; Menichini, F. A potential role of alkaloid extracts from *Salsola* species (Chenopodiaceae) in the treatment of Alzheimer's disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2009**, *24*, 818-824.
- [80] Eluffoye, T.O.; Obuotor, E.M.; Sennuga, A.T.; Agbedahunsi, J.M.; Adesanya, S.A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some selected Nigerian medicinal plants. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2010**. DOI: 10.1590/S0102-695X2010000400002.
- [81] Fawole, O.A.; Amoo, S.O.; Ndhlala, A.R.; Light, M.E.; Finnie, J.F.; Van Staden, J. Anti-inflammatory, anticholinesterase, antioxidant and phytochemical properties of medicinal plants used for pain-related ailments in South Africa. *J. Ethnopharmacol.*, **2010**, *127*, 235-241.
- [82] Cahlíková, L.; Benešová, N.; Macáková, K.; Urbanová, K.; Opletal, L. GC/MS analysis of three Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Commun.*, **2011**, *6*, 1255-1258.
- [83] Cahlíková, L.; Valterová, I.; Macáková, K.; Opletal, L. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2011**. DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000089.

- [84] Moyo, M.; Ndhkala, A.R.; Finnie, J.F.; Van Staden, J. Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. *Food Chem.*, **2010**, *123*, 69-76.
- [85] Benamar, H.; Rached, W.; Derdour, A.; Marouf, A. Screening of Algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Biol. Sci.*, **2010**, *10*, 1-9.
- [86] Lima, J.A.; Costa, R.S.; Epifânio, R.A.; Castro, N.G.; Rocha, M.S.; Pinto, A.C. *Geissospermum vellosii* stem bark. Anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. *Pharmacol. Biochem. Be.*, **2009**, *92*, 508-513.
- [87] Yang, Z.; Zhang, D.; Ren, J.; Yang, M.; Li, S. Acetylcholinesterase inhibitory activity of the total alkaloid from traditional Chinese herbal medicine for treating Alzheimer's disease. *Med. Chem. Res.*, **2012**, *21*, 734-738.
- [88] Sekeroglu, N.; Senol, F.S.; Orhan, I.E.; Gulpinar, A.R.; Kartal, M.; Sener, B. *In vitro* prospective effects of various traditional herbal coffees consumed in Anatolia linked to neurodegeneration. *Food Res. Int.*, **2012**, *45*, 197-203.
- [89] Loizzo, M.R.; Tundis, R.; Menichini, F.; Bonesi, M.; Frega, N.G.; Menichini, F. Radical scavenging activity and cholinesterase inhibitory activity of *Leopoldia comosa* (L.) bulbs. *Progr. Nutr.*, **2011**, *13*, 300-303.
- [90] Carpinella, M.C.; Andriano, D.G.; Ruiz, G.; Palacios, S.M. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts from Argentina. *Phytother. Res.*, **2010**, *24*, 259-263.
- [91] Wszelaki, N.; Kuciun, A.; Kiss, A.K. Screening of traditional European herbal medicines for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Acta Pharm.*, **2010**, *60*, 119-128.
- [92] Niño, J.; Hernández, J.A.; Correa, Y.M.; Mosquera, O.M. *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **2006**, *101*, 783-785.
- [93] Bakthir, H.; Ali, N.A.A.; Arnold, N.; Teichert, A.; Wessjohann, L. Anticholinesterase activity of endemic plant extracts from Soqotra. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, **2011**, *8*, 296-299.
- [94] Habtemariam, S. The therapeutic potential of *Berberis darwinii* stem-bark: Quantification of berberine and *in vitro* evidence for Alzheimer's disease therapy. *Nat. Prod. Commun.*, **2011**, *6*, 1089-1090.
- [95] Ashraf, M.; Ahmad, K.; Ahmad, I.; Ahmad, S.; Arshad, S.; Shah, S.M.; Nasim, F. Acetylcholinesterase and NADH oxidase inhibitory activity of some medicinal plants. *J. Med. Plant. Res.*, **2011**, *5*, 2086-2089.
- [96] Adewusi, E.A.; Moodley, N.; Steenkamp, V. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.*, **2011**, *77*, 638-644.
- [97] Akkol, E.K.; Orhan, I.E.; Yeşilada, E. Anticholinesterase and antioxidant effects of the ethanol extract, ethanol fractions and isolated flavonoids from *Cistus laurifolius* L. leaves. *Food Chem.*, **2012**, *131*, 626-631.
- [98] Feitosa, C.M.; Freitas, R.M.; Luz, N.N.N.; Bezerra, M.Z.B.; Trevisan, M.T.S. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. *Braz. J. Biol.*, **2011**, *71*, 783-789.
- [99] Tavares, L.; McDougall, G.J.; Fortalezas, S.; Stewart, D.; Ferreira, R.B.; Santos, C.N. The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four *Juniperus* species found in Portugal. *Food Chem.*, **2012**, *135*, 562-570.
- [100] Lee, S.-H.; Sancheti, S.A.; Bafna, M.R.; Sancheti, S.S.; Seo, S.-Y. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense* bark. *J. Med. Plants Res.*, **2011**, *5*, 248-254.
- [101] Kwon, S.-H.; Lee, H.-K.; Kim, J.A.; Hong, S.I.; Kim, S.-Y.; Jo, T.-H.; Park, Y.-I.; Lee, C.-K.; Kim, Y.-B.; Lee, S.-Y.; Jang, C.-G. Neuroprotective effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. bark on amyloid beta<sub>25-35</sub>-induced learning and memory impairments in mice. *Neurosci. Lett.*, **2011**, *487*, 123-127.
- [102] Crowch, C.M.; Okello, E.J. Kinetics of acetylcholinesterase inhibitory activities by aqueous extracts of *Acacia nilotica* (L.) and *Rhamnus prinoides* (L'Hér.). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, **2009**, *3*, 469-475.
- [103] Kim, D.H.; Yoon, B.H.; Kim, Y.W.; Lee, S.; Shin, B.Y.; Jung, J.W.; Kim, H.J.; Lee, Y.S.; Choi, J.S.; Kim, S.Y.; Lee, K.T.; Ryu, J.H. The seed extract of *Cassia obtusifolia* ameliorates learning and memory impairments induced by scopolamine or transient cerebral hypoperfusion in mice. *J. Pharmacol. Sci.*, **2007**, *105*, 82-93.
- [104] Lin, H.Q.; Ho, M.T.; Lau, L.S.; Wong, K.K.; Shaw, P.C.; Wan, D.C. Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease. *Chem. Biol. Interact.*, **2008**, *175*, 352-354.
- [105] Rauter, A.P.; Martins, A.; Lopes, R.; Ferreira, J.; Serralheiro, L.M.; Araújo, M.E.; Borges, C.; Justino, J.; Silva, F.V.; Goulart, M.; Thomas-Oates, J.; Rodrigues, J.A.; Edwards, E.; Noronha, J.P.; Pinto, R.; Mota-Filipe, H. Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. *J. Ethnopharmacol.*, **2009**, *122*, 384-393.
- [106] Satheeshkumar, N.; Mukherjee, P.K.; Bhadra, S.; Saha, B.P. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum graecum* L and its constituents. *Phytomedicine*, **2010**, *17*, 292-295.
- [107] Bhadra, S.; Mukherjee, P.K.; Kumar, N.S.; Bandyopadhyay, A. Anticholinesterase activity of standardized extract of *Illicium verum* Hook. f. fruits. *Fioterapia*, **2011**, *82*, 342-346.
- [108] Orhan, I.; Senol, F.S.; Gulpinar, A.R.; Kartal, M.; Sekeroglu, N.; Deveci, M.; Kan, Y.; Sener, B. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*, *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. pallida*. *Food Chem. Toxicol.*, **2009**, *47*, 1304-1310.
- [109] Costa, P.; Gonçalves, S.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Romano, A. Inhibitory effect of *Lavandula viridis* on Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation, antioxidant and anti-cholinesterase properties. *Food Chem.*, **2011**, *126*, 1779-1786.
- [110] Orhan, I.E.; Belhattach, R.; Şenol, F.S.; Gulpinar, A.R.; Hoşbaş, S.; Kartal, S. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Ind. Crop. Prod.*, **2010**, *32*, 566-571.
- [111] Loizzo, M.R.; Menichini, F.; Conforti, F.; Tundis, R.; Bonesi, M.; Saab, A.M.; Statti, G.A.; Cindio, B.; Houghton, P.J.; Menichini, F.; Frega, N.G. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chem.*, **2009**, *117*, 174-180.
- [112] Mossa, A.T.; Nawwar, G.A. Free radical scavenging and antiacetylcholinesterase activities of *Origanum majorana* L. essential oil. *Hum. Exp. Toxicol.*, **2011**, *30*, 1501-1513.
- [113] Tel, G.; Öztürk, M.; Duru, M.E.; Harmandar, M.; Topçu, G. Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, *48*, 3189-3193.
- [114] Şenol, F.S.; Orhan I.; Celep F.; Kahraman, A.; Doğan, M.; Yilmaz, G.; Şener, B. Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. *Food Chem.*, **2010**, *120*, 34-43.
- [115] Loizzo, M.R.; Menichini, F.; Tundis, R.; Bonesi, M.; Conforti, F.; Nadjafi, F.; Statti, G.A.; Frega, N.G.; Menichini, F. *In vitro* biological activity of *Salvia lerifolia* benth essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease. *J. Oleo Sci.*, **2009**, *58*, 443-446.
- [116] Ahmad, B.; Mukarram Shah, S.M.; Khan, H.; Hassan Shah, S.M. Enzyme inhibition activities of *Teucrium royleanum*. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, **2007**, *22*, 730-732.
- [117] Tappayuthpijarn, P.; Itharat, A.; Makchuchit, S. Acetylcholinesterase inhibitory activity of Thai traditional nootropic remedy and its herbal ingredients. *J. Med. Assoc. Thai.*, **2011**, *94*, S183-S189.
- [118] Vinutha, B.; Prashanth, D.; Salma, K.; Sreeja, S.L.; Pratiti, D.; Padmaja, R.; Radhika, S.; Amit, A.; Venkateshwarlu, K.; Deepak, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *109*, 359-363.
- [119] Ashraf, M.; Ahmad, K.; Ahmad, I.; Ahmad, S.; Arshad, S.; Shah, S.M.; Nasim, F. Acetylcholinesterase and NADH oxidase inhibitory activity of some medicinal plants. *J. Med. Plant. Res.*, **2011**, *5*, 2086-2089.
- [120] Adersen, A.; Gauguin, B.; Gudiksen, L.; Jäger, A.K. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction

- for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, **2006**, *104*, 418-422.
- [121] Ustun, O.; Senol, F.; Kurkcuoglu, M.; Orhan, I.; Kartal, M.; Baser, K. Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Ind. Crop. Prod.*, **2012**, *38*, 115-123.
- [122] Bonesi, M.; Menichini, F.; Tundis, R.; Loizzo, M.R.; Conforti, F.; Passalacqua, N.G.; Statti, G.A.; Menichini, F. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of *Pinus* species essential oils and their constituents. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, **2010**, *25*, 622-628.
- [123] Khadri, A.; Serralheiro, M.L.M.; Nogueira, J.M.F.; Neffati, M.; Smiti, S.; Araújo, M.E.M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC-mass spectrometry and <sup>13</sup>C NMR. *Food Chem.*, **2008**, *109*, 630-637.
- [124] Khadri, A.; Neffati, M.; Smiti, S.; Falé, P.; Lino, A.R.L.; Serralheiro, A.M.; Araújo, M.E.M. Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. *LWT-Food Sci. Technol.*, **2010**, *43*, 331-336.
- [125] Aremu, A.O.; Amoo, S.O.; Ndhala, A.R.; Finnie, J.F.; Stadenm J.V. Antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibition, iridoid content and mutagenic evaluation of *Leucosidea sericea*. *Food Chem. Toxicol.*, **2011**, *49*, 1122-1128.
- [126] Pachauri, S.D.; Tota, S.; Khandelwal, K.; Verma, P.R.; Nath, C.; Hanif, K.; Shukla, R.; Saxena, J.K., Dwivedi, A.K. Protective effect of fruits of *Morinda citrifolia* L. on scopolamine induced memory impairment in mice: A behavioral, biochemical and cerebral blood flow study. *J. Ethnopharmacol.*, **2012**, *139*, 34-41.
- [127] Chaiyana, W.; Okonogi, S. Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. *Phytomedicine*, **2012**, *19*, 836-839.
- [128] Menichini, F.; Tundis, R.; Bonesi, M.; de Cindio, B.; Loizzo, M.R.; Conforti, F.; Statti, G.A.; Menabeni, R.; Bettini, R.; Menichini, F. Chemical composition and bioactivity of *Citrus medica* L. cv. Diamante essential oil obtained by hydrodistillation, cold-pressing and supercritical carbon dioxide extraction. *Nat. Prod. Res.*, **2011**, *25*, 789-799.

# NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all  
Aspects of Natural Products Research



Volume 9. Issue 2. Pages 145-292. 2014  
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)  
[www.naturalproduct.us](http://www.naturalproduct.us)

**EDITOR-IN-CHIEF****DR. PAWAN K AGRAWAL**

Natural Product Inc.  
7963, Anderson Park Lane,  
Westerville, Ohio 43081, USA  
agrawal@naturalproduct.us

**EDITORS****PROFESSOR ALEJANDRO F. BARRERO**

Department of Organic Chemistry,  
University of Granada,  
Campus de Fuente Nueva, s/n, 18071, Granada, Spain  
afbarre@ugr.es

**PROFESSOR ALESSANDRA BRACA**

Dipartimento di Chimica Bioorganica e Biofarmacia,  
Universita di Pisa,  
via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy  
braca@farm.unipi.it

**PROFESSOR DEAN GUO**

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs,  
School of Pharmaceutical Sciences,  
Peking University,  
Beijing 100083, China  
gda5958@163.com

**PROFESSOR YOSHIHIRO MIMAKI**

School of Pharmacy,  
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,  
Horinouchi 1432-1, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan  
mimaki@ps.toyaku.ac.jp

**PROFESSOR STEPHEN G. PYNE**

Department of Chemistry  
University of Wollongong  
Wollongong, New South Wales, 2522, Australia  
spyne@uow.edu.au

**PROFESSOR MANFRED G. REINECKE**

Department of Chemistry,  
Texas Christian University,  
Forts Worth, TX 76129, USA  
m.reinecke@tcu.edu

**PROFESSOR WILLIAM N. SETZER**

Department of Chemistry  
The University of Alabama in Huntsville  
Huntsville, AL 35809, USA  
wsetzer@chemistry.uah.edu

**PROFESSOR YASUHIRO TEZUKA**

Institute of Natural Medicine  
Institute of Natural Medicine, University of Toyama,  
2630-Sugitani, Toyama 930-0194, Japan  
tezuka@inm.u-toyama.ac.jp

**PROFESSOR DAVID E. THURSTON**

Department of Pharmaceutical and Biological Chemistry,  
The School of Pharmacy,  
University of London, 29-39 Brunswick Square,  
London WC1N 1AX, UK  
david.thurston@pharmacy.ac.uk

**HONORARY EDITOR****PROFESSOR GERALD BLUNDEN**

The School of Pharmacy & Biomedical Sciences,  
University of Portsmouth,  
Portsmouth, PO1 2DT U.K.  
axuf64@dsl.pipex.com

**ADVISORY BOARD**

Prof. Viqar Uddin Ahmad  
Karachi, Pakistan

Prof. Giovanni Appendino  
Novara, Italy

Prof. Yoshinori Asakawa  
Tokushima, Japan

Prof. Roberto G. S. Berlinck  
São Carlos, Brazil

Prof. Anna R. Bilia  
Florence, Italy

Prof. Maurizio Bruno  
Palermo, Italy

Prof. César A. N. Catalán  
Tucumán, Argentina

Prof. Josep Coll  
Barcelona, Spain

Prof. Geoffrey Cordell  
Chicago, IL, USA

Prof. Fatih Demirci  
Eskişehir, Turkey

Prof. Dominique Guillaume  
Reims, France

Prof. Ana Cristina Figueiredo  
Lisbon, Portugal

Prof. Cristina Gracia-Viguera  
Murcia, Spain

Prof. Duvvuru Gunasekar  
Tirupati, India

Prof. Hisahiro Hagiwara  
Niigata, Japan

Prof. Kurt Hostettmann  
Lausanne, Switzerland

Prof. Martin A. Iglesias Arteaga  
Mexico, D. F., Mexico

Prof. Leopold Jirovetz  
Vienna, Austria

Prof. Vladimir I Kalinin  
Vladivostok, Russia

Prof. Niel A. Koorbanally  
Durban, South Africa

Prof. Chiaki Kuroda  
Tokyo, Japan

Prof. Hartmut Laatsch  
Göttingen, Germany

Prof. Marie Lacaillé-Dubois  
Dijon, France

Prof. Shoen-Sheng Lee  
Taipei, Taiwan

Prof. Imre Mathe  
Szeged, Hungary

Prof. Ermino Murano  
Trieste, Italy

Prof. M. Soledade C. Pedras  
Saskatoon, Canada

Prof. Luc Pieters  
Antwerp, Belgium

Prof. Peter Proksch  
Düsseldorf, Germany

Prof. Phila Raharivelomanana  
Tahiti, French Polynesia

Prof. Luca Rastrelli  
Fisciano, Italy

Prof. Stefano Serra  
Milano, Italy

Prof. Monique Simmonds  
Richmond, UK

Dr. Bikram Singh  
Palampur, India

Prof. John L. Sorensen  
Manitoba, Canada

Prof. Johannes van Staden  
Scottsville, South Africa

Prof. Valentin Stonik  
Vladivostok, Russia

Prof. Winston F. Tinto  
Barbados, West Indies

Prof. Sylvia Urban  
Melbourne, Australia

Prof. Karen Valant-Vetschera  
Vienna, Austria

**INFORMATION FOR AUTHORS**

Full details of how to submit a manuscript for publication in Natural Product Communications are given in Information for Authors on our Web site <http://www.naturalproduct.us>.

Authors may reproduce/republish portions of their published contribution without seeking permission from NPC, provided that any such republication is accompanied by an acknowledgment (original citation)-Reproduced by permission of Natural Product Communications. Any unauthorized reproduction, transmission or storage may result in either civil or criminal liability.

The publication of each of the articles contained herein is protected by copyright. Except as allowed under national "fair use" laws, copying is not permitted by any means or for any purpose, such as for distribution to any third party (whether by sale, loan, gift, or otherwise); as agent (express or implied) of any third party; for purposes of advertising or promotion; or to create collective or derivative works. Such permission requests, or other inquiries, should be addressed to the Natural Product Inc. (NPI). A photocopy license is available from the NPI for institutional subscribers that need to make multiple copies of single articles for internal study or research purposes.

**To Subscribe:** Natural Product Communications is a journal published monthly. 2014 subscription price: US\$2,395 (Print, ISSN# 1934-578X); US\$2,395 (Web edition, ISSN# 1555-9475); US\$2,795 (Print + single site online); US\$595 (Personal online). Orders should be addressed to Subscription Department, Natural Product Communications, Natural Product Inc., 7963 Anderson Park Lane, Westerville, Ohio 43081, USA. Subscriptions are renewed on an annual basis. Claims for nonreceipt of issues will be honored if made within three months of publication of the issue. All issues are dispatched by airmail throughout the world, excluding the USA and Canada.



## Alkaloids from *Habranthus tubispathus* and *H. jamesonii*, two Amaryllidaceae with Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibition Activity

Valeria Cavallaro<sup>a</sup>, Natalia P. Alza<sup>a</sup>, María G. Murray<sup>b</sup> and Ana P. Murray<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>INQUISUR-CONICET, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Av. Alem 1253, B8000CPB, Bahía Blanca, Argentina

<sup>b</sup>INBIOSUR-CONICET Departamento Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, San Juan 670, B8000CPB, Bahía Blanca, Argentina

apmurray@uns.edu.ar

Received: August 30<sup>th</sup>, 2013; Accepted: November 22<sup>nd</sup>, 2013

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder associated with memory impairment and cognitive deficit. Most of the drugs currently available for the treatment of AD are acetylcholinesterase (AChE) inhibitors. Plants of the Amaryllidaceae family are known to synthesize alkaloids, which have shown AChE inhibitory activity. *Habranthus tubispathus* and *H. jamesonii* are two Amaryllidaceae that can be found growing wild to the southwest of Buenos Aires in Argentina. Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibition was observed for the extracts obtained from bulbs of *H. tubispathus* and bulbs and aerial parts of *H. jamesonii*. The strongest cholinesterase inhibition was observed for the alkaloid extract obtained from the aerial parts for *H. jamesonii* (AChE IC<sub>50</sub> = 0.7 µg/mL; BChE IC<sub>50</sub> = 6.7 µg/mL). The AChE inhibition observed for *H. jamesonii* could be explained by the presence of galanthamine and sanguinine, two potent AChE inhibitors. The levels of lycorine and hippeastidine, moderate AChE inhibitors, observed in the bulbs of *H. tubispathus* could be responsible for the significant AChE inhibition observed. The alkaloids present in these Amaryllidaceae were identified by means of GC-MS analysis. In the case of *H. tubispathus*, hippeastidine and 3-*O*-demethylhippeastidine, were isolated and completely characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy.

**Keywords:** *Habranthus tubispathus*, *Habranthus jamesonii*, Amaryllidaceae, Acetylcholinesterase inhibition, Butyrylcholinesterase inhibition, Alkaloids.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder associated with memory impairment and cognitive deficit. It is characterized by low levels of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in the brain of AD patients. The inhibition of acetylcholinesterase (AChE), the enzyme that catalyzes ACh hydrolysis, is the main therapeutic strategy used to treat AD. AChE inhibitors can alleviate AD symptoms by improving cholinergic functions in AD patients. In the healthy brain, another enzyme, namely butyrylcholinesterase (BChE), is involved in the metabolic degradation of ACh. BChE activity increases as AD progresses. Thus, both enzymes, AChE and BChE, are considered legitimate therapeutic targets for treating the cholinergic deficit characteristic of AD [1].

Amaryllidaceae alkaloids represent a large and still expanding group of isoquinoline alkaloids that have attracted considerable attention due to their interesting pharmacological properties such as antiprotozoal, antibacterial, anticonvulsant, antitumor, antiviral and anticholinesterase activities [2,3]. The Amaryllidaceae family comprises about 1100 species and is widely distributed through tropical and warm regions of the world [4]. Among the Amaryllidaceae genera found in Argentina, the genus *Habranthus*, commonly known as "rain lilies", is represented by 27 species, of which 24 are endemic [5]. Typically, they appear from late spring through autumn, in response to rain. *H. tubispathus* (L'Hér.) Traub and *H. jamesonii* (Baker) Ravenna can be found growing wild to the southwest of Buenos Aires province [6]. *H. tubispathus* is found in grasslands and disturbed areas. In Argentina, its distribution covers the provinces of Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe and Buenos Aires; it can also be found in Chile, Paraguay and Uruguay [7]. *H. jamesonii* is found in sandy soils in the west and center of Argentina (provinces of Catamarca, La Rioja, San Juan, San Luis, Mendoza,

La Pampa, Río Negro, Chubut and in the south of Buenos Aires) [7,8].

In the present study, as part of our ongoing phytochemical and biological activity studies of Argentinean flora, *H. tubispathus* and *H. jamesonii* were investigated for their AChE and BChE inhibitory activity using Ellman's method [9]. The alkaloids present in both extracts were also investigated and, in the case of *H. tubispathus*, two of the main alkaloids were isolated using chromatographic methods and identified by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR and GC-MS analysis.

Bulbs of *H. tubispathus* and bulbs and aerial parts (flowers and leaves) of *H. jamesonii* were extracted separately. The results observed for AChE and BChE inhibition are summarized in Table 1. The alkaloid extract from the aerial parts of *H. jamesonii* showed the highest AChE and BChE inhibitory activity. The alkaloid extract obtained from the bulbs of *H. jamesonii* also exhibited potent AChE and BChE inhibition.

**Table 1:** Acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibition of *Habranthus* species and isolated compounds, expressed as IC<sub>50</sub> values.

Samples	IC <sub>50</sub>	
	AChE <sup>b</sup>	BChE <sup>b</sup>
EE- <i>Ht</i> -b	0.9 mg/mL	> 1 mg/mL
AE- <i>Ht</i> -b	12.5 µg/mL	62.8 µg/mL
EE- <i>Hj</i> -b	34.4 µg/mL	> 2.5 mg/mL
EE- <i>Hj</i> -ap	29.6 µg/mL	> 2.5 mg/mL
AE- <i>Hj</i> -b	1.3 µg/mL	20.8 µg/mL
AE- <i>Hj</i> -ap	0.7 µg/mL	6.7 µg/mL
hippeastidine	104.6 µM	200.8 µM
3- <i>O</i> -demethylhippeastidine	>200 µM	>200 µM
eserine <sup>c</sup>	11.3 nM	14.3 nM

<sup>a</sup> EE: ethanolic extract, AE: alkaloid extract, *Ht*: *H. tubispathus*, *Hj*: *H. jamesonii*, b: bulbs, ap: aerial parts. <sup>b</sup> Results are the mean of three replications. <sup>c</sup> Reference compound.

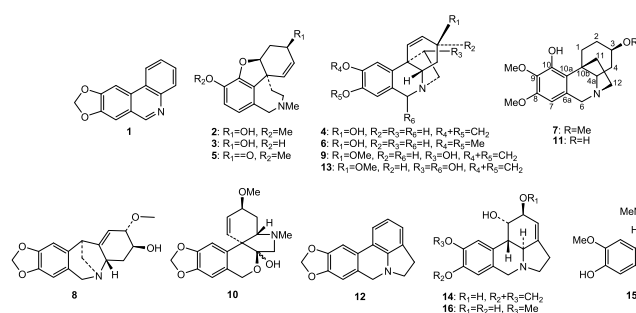


Figure 1: Alkaloids from *H. tubispauthus* and *H. jamesonii*.

In order to identify the alkaloids present in these extracts a GC-MS analysis was performed for each sample. The majority of the alkaloids were identified by comparing their mass spectra with those available in either the spectrometer database or the literature [10, 11]. Sanguinine (3), vittatine (4), narwedine (5), 8-*O*-demethylhomolycorine (15) and lycorine (14) were observed to be the major alkaloids in the aerial parts of *H. jamesonii* (Table 2), whereas the bulbs of *H. jamesonii* proved to be rich in lycorine (14), 8-*O*-demethylhomolycorine (15), galanthamine (2) and sanguinine (3) (Table 2). It is notable that the alkaloid profile differs substantially between the bulbs and the aerial parts of *H. jamesonii*. For example, alkaloids 4 and 5, which were present in traces in the bulbs, were detected in high proportions in the aerial parts. Similarly, while the bulbs of *H. jamesonii* were rich in galanthamine (2) and lycorine (14), these alkaloids were minor constituents of the aerial parts of this plant. Interestingly, our results differ dramatically from those reported by Ortiz *et al.* for *H. jamesonii* bulbs collected in two provinces in the Andean region of Argentina [12]. Our results confirm that alkaloid content depends on the geographical distribution of *H. jamesonii* populations. Intraspecific diversity in alkaloid profiles has also been observed for other Amaryllidaceae genera in populations collected from different locations [13]. The most important differences between our results and those reported by Ortiz *et al.*, are probably the higher levels of galanthamine and sanguinine that we have detected in our study of *H. jamesonii* bulbs, and the fact that in our case, the chemical composition of the aerial parts was also investigated.

When the alkaloid extract of *H. tubispauthus* was submitted for GC-MS analysis nine alkaloids were detected (Table 2). Seven were clearly identified by comparison of their mass spectra with those published either in the literature or stored in the spectrometer database, namely maritidine (6), montanine (8), haemanthamine (9), tazettine (10), haemanthidine (13), lycorine (14) and pseudolycorine (16) [10, 11]. The presence of alkaloids 8, 9 and 14 was in accordance with previous information about alkaloids from *H. tubispauthus* [Prof. B. Maldoni, pers. comm. 2002]. The GC-MS results showed the presence of two compounds, 7 and 11, exhibiting molecular ions at  $m/z = 319$  and 305, respectively, with unidentified MS fragmentation patterns. Several chromatographic separations allowed the isolation and purification of 7 (5.1 mg) and 11 (3.6 mg), along with lycorine. Compounds 7 and 11 proved to be crinine-type alkaloids with the unusual feature of a hydroxyl group at C-10.

The mass spectrum of 7 showed a molecular ion peak at  $m/z$  319 (100%), indicating a molecular formula  $C_{18}H_{25}NO_4$ , and a fragmentation pattern similar to that observed for hippeastidine, an alkaloid isolated from *Hippeastrum añañuca* [14]. Pacheco *et al.* reported the structural elucidation of hippeastidine based on X-ray diffraction of its picrate and provided limited information about its mass spectrum and  $^1H$  NMR spectrum (100 MHz) [14]. In order to confirm the identity of compound 7,  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR data were recorded (Table 3). Signals were assigned with the aid of correlations observed in  $^1H$ - $^1H$  COSY, HSQC, HMBC and NOESY experiments. We observed that the spectroscopic data obtained for alkaloid 7 was all in agreement with the structure proposed by Pacheco *et al.* in 1978 for hippeastidine [14]. This structure was confirmed by Watson *et al.* in 1982 through X-ray diffraction of a crystalline sample of this alkaloid [15]. Alkaloid 7 was, therefore, unambiguously identified as hippeastidine and a complete assignment of  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR signals was achieved.

Interestingly, although a large number of alkaloids has been isolated or detected in plants belonging to the Amaryllidaceae family over the past decades, as far as we know, hippeastidine has only been isolated from *Hippeastrum añañuca*, until now, when we found it as one of the main alkaloids in *H. tubispauthus* [3a, 14].

The other unidentified alkaloid isolated from *H. tubispauthus*, compound 11, showed a molecular ion peak at  $m/z$  305 (100%) in

Table 2: Alkaloids identified in *H. tubispauthus* and *H. jamesonii*

Alkaloid	RT (min)	M <sup>+</sup> and m/z (rel. int.)	Species			Ref. <sup>b</sup>
			<i>H. tubispauthus</i> (%)		<i>H. jamesonii</i> (%)	
			bulbs	bulbs	aerial parts	
Trisphaeridine (1)	18.73	223(100), 222(40), 167(15), 165(14), 164(20), 138(32)	-	< 1	< 1	[10]
Galanthamine (2)	20.61	287(80), 286(100), 270(11), 244(19), 230(15), 216(37)	-	18.5	3.5	[10]
Sanguinine (3)	21.26	273(100), 272(85), 256(22), 202(41), 160(50)	-	10.9	21.9	[10]
Vittatine (4)	21.74	271(100), 252(29), 199(68), 187(65), 173(26)	-	< 1	20.6	[10]
Narwedine (5)	21.81	285(84), 284(100), 242(23), 228(12), 216(30), 199(27)	-	< 1	14.7	[10]
Maritidine (6)	22.29	287(91), 268(8), 244(34), 215(100), 203(61), 189(24), 128(24), 115(30), 71(2), 56(20)	2.1	-	-	[11]
Hippeastidine (7)	23.73	319(100), 304(18), 288(39), 258(20), 233(84), 218(30), 206(27), 163(16), 115(14)	42.6	< 1	< 1	[14]
Montanine (8)	23.79	301(100), 270 (82), 257(7), 252(26), 223(26)	< 1	-	-	[10]
Haemanthamine (9)	23.99	301(13), 272 (100), 240(24), 225(11), 211(21)	8.6	-	-	[10]
Tazettine (10)	24.27	331(22), 316(8), 298(22), 247(100), 230(12)	< 1	-	-	[10]
3- <i>O</i> -demethylhippeastidine (11)	24.30	305 (100), 304 (26), 290(17), 288(18), 277(28), 276(28), 246(17), 234(50), 233(72), 232(33), 218(28), 217(20), 206(30), 115(16), 91(18)	15.0	-	-	
Anhydrolycorine (12)	24.34	251(66), 250(100), 192(14), 191(15), 165(5), 164(3), 139(3), 124(4)	-	-	4.5	[11]
Haemanthidine (13)	25.15	317(63), 284(57), 233(62), 211(64), 201(93), 199(90), 181(52), 173(66), 115(100), 56(46)	< 1	-	-	[11]
Lycorine (14)	25.57	287(23), 286(13), 268(20), 250(13), 227(63), 226 (100)	28.6	33.8	9.1	[10]
8- <i>O</i> -demethylhomolycorine (15)	26.74	301(-), 192(1), 164(5), 110(9), 109(100), 108(31), 94(6), 82(7)	-	29.8	22.8	[11]
Pseudolycorine (16)	26.80	289(26), 288(15), 270(18), 252(7), 230 (10), 229(67), 228 (100)	< 1	-	-	[10]

<sup>a</sup> For GC conditions see the Experimental section, <sup>b</sup> Reference for MS data.

**Table 3:** NMR data for compounds **7** and **11**.

Position	<b>7</b>		<b>11</b>	
	$\delta_c^a$	$\delta_H^b$ mult ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_c^a$	$\delta_H^b$ mult ( <i>J</i> in Hz)
1	25.9 t	1.76 t (14.5, 4.2) 3.28 d (14.5)	26.4 t	1.79 m 3.27 d (14.4)
2	26.9 t	1.42 m 2.02 d (13.2)	30.3 t	1.52 m 1.91 os
3	76.7 d	3.22 m	67.6 d	3.57 m
4 $\beta$	31.6 t	1.27 dd (23.7, 11.6)	35.6 t	1.33 dd
4 $\alpha$		2.23 dd (23.7, 11.2)		2.08 br s
4a	68.1 d	3.38 d (11.6)	67.8 d	3.19 t
6 $\beta$	59.9 t	4.00 d (15.8)	60.7 t	3.86 d (15.4)
6 $\alpha$		4.59 d (15.8)		4.49 d (15.4)
6a	123.7 s		124.9 s	
7	101.2 d	6.23 s	100.8 d	6.22 s
8	135.5 s		135.0 s	
9	151.7 s		151.2 s	
10	148.1 s		147.8 s	
10a	124.2 s		126.6 s	
10b	44.1 s		43.4 s	
11endo	34.2 t	1.98 os 2.44 m	34.9 t	1.95 os 2.38 m
11exo				
12endo	51.8 t	3.13 m	51.4 t	2.96 br s
12exo		3.67 t (12.2, 11.8)		3.53 os
3-OCH <sub>3</sub>	54.9 q	3.35 s		
8-OCH <sub>3</sub>	59.9 q	3.72 s	59.7 q	3.77 s
9-OCH <sub>3</sub>	55.1 q	3.77 s	54.8 q	3.79 s

<sup>a</sup> Recorded at 75 MHz in methanol-*d*<sub>4</sub>; multiplicity by DEPT <sup>b</sup> Recorded at 300 MHz in methanol-*d*<sub>4</sub>.

its mass spectrum, suggesting a molecular formula C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub> (Table 2). The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of **11** were very similar to those recorded for alkaloid **7**, except for the absence of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C signals corresponding to the methoxy group attached to C-3 and differences observed in the chemical shifts of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C resonances corresponding to positions 2 and 4 (Table 3). Based on this information, compound **11** was identified as 3-*O*-demethylhippeastidine. This alkaloid was isolated also from *H. añañuca*, but in this case the identification was based on limited spectroscopic data: only four proton resonances (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and two fragmentations from the molecular ion in the mass spectrum were reported [16].

The presence of the alkaloids galanthamine (**2**) and sanguinine (**3**) could be related to the high AChE inhibitory activity of *H. jamesonii*. Alkaloid **2** has been shown to be a potent AChE inhibitor (IC<sub>50</sub> 1.07 μM) while alkaloid **3** (3-*O*-demethylgalanthamine) is ten times more potent than **2** as an AChE inhibitor [3b]. The higher levels of **2** found in the aerial parts of *H. jamesonii* could be responsible for the better cholinesterase inhibition observed in this case, compared with the activity observed for the bulb extract. Among the alkaloids present in *H. tubispathus* bulbs, hippeastidine (**7**) was observed to be the most active, while 3-*O*-demethylhippeastidine (**11**) proved to be inactive against both AChE and BuChE, at the tested concentrations (Table 1). Both species produce lycorine (**14**) in good amounts (Table 2), which has shown significant AChE inhibition in previous reports with IC<sub>50</sub> values ranging from 152 μM to 450 μM [3b, 17, 18].

In conclusion, we have observed that both species exhibit potent AChE and BChE inhibition. The best activity was observed for the aerial parts of *H. jamesonii*. We have also studied the alkaloids profile for both species, and this work is the first report of a phytochemical study of *H. tubispathus*. Our results show that the *H. jamesonii* population found in the southwest of Buenos Aires province is a rich source of galanthamine, one of the approved drugs for AD treatment. The cholinesterase inhibition observed could be explained by the main alkaloids present in these Amaryllidaceae. In addition, we have isolated the main alkaloids of *H. tubispathus*, completely characterized them using spectroscopic methods, and evaluated them as cholinesterase inhibitors.

## Experimental

**General:** NMR measurements, including COSY, HSQC, HMBC and NOESY experiments, were carried out on a Bruker ARX300 spectrometer. Chemical shifts are given in ppm (δ) with TMS as an internal standard. Silica gel 60 (Merck) was used for CC. Analytical TLC was performed on Silicagel 60 F<sub>254</sub> sheets (0.2 mm thickness, Merck). *p*-Anisaldehyde-acetic acid spray reagent, Dragendorff's reagent and UV light (254 and 366 nm) were used for detection. UV spectra were recorded on a JASCO V-630BIO spectrophotometer. Acetylcholinesterase from electric eel (type VI-S), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), acetylthiocholine iodide (ATCI), butyrylthiocholine iodide (BTCI) and eserine were purchased from Sigma. Butyrylcholinesterase (horse serum) was purchased from MP Biomedicals.

**Plant material:** *H. tubispathus* and *H. jamesonii* were collected during the flowering period (November 2009 and 2012, respectively) in, respectively, Bahía Blanca and Salitral de la Vidriera, an area with a low shrubby halophytic steppe near the estuary, 20 km from Bahía Blanca city, Argentina. Voucher specimens were identified by Dra Maria Gabriela Murray and deposited in the Herbarium of the Universidad Nacional del Sur (BBB) in Bahía Blanca, Argentina, under the numbers Murray, M.G. 545 (*H. tubispathus*) and Murray M.G. 541 (*H. jamesonii*).

**Alkaloids extraction and isolation:** Fresh bulbs of *H. tubispathus* (1 kg) were cut into small pieces and macerated with ethanol (96% v/v) at room temperature for 2 weeks and then extracted with boiling ethanol for 3 h. Both extracts were combined and evaporated to dryness under reduced pressure. Dry extract (73 g) was dissolved in 2% HCl (600 mL) and filtered 1 h later. The remaining solution was basified (pH 9) with NaHCO<sub>3</sub> 3 M and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 600 mL). The dichloromethane extract was evaporated under reduced pressure and tested for alkaloids on TLC (Silicagel 60, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O 85:14:1). This CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract (0.28 g) was Dragendorff's positive, so was submitted for GC-MS analysis.

Bulbs of *H. jamesonii* (544 g) were extracted with ethanol at room temperature for 2 weeks. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the ethanolic extract (36 g) was treated with 2% HCl (450 mL) for 1 h and then filtered. A 3 M NaHCO<sub>3</sub> solution was added until pH 9 and the aqueous solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 500 mL). The alkaloid extract (0.15 g) was analyzed by GC-MS. The aerial parts of *H. jamesonii* (162 g) were treated in a similar way to obtain the ethanolic extract (2.3 g) and the alkaloid extract (24 mg).

A portion of *H. tubispathus* alkaloid extract (226.4 mg) was subjected to CC over silicagel 60 (70-230 mesh, 11.3 g) eluting with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gradually enriched with MeOH. Fractions of 5 mL were collected (190 in total) and combined according to their TLC profiles monitored by UV light (254 nm and 366 nm) and Dragendorff's reagent. Fractions 122-123 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 94:6) redissolved in MeOH led to spontaneous crystallization of lycorine (**14**) (7.4 mg). Hippeastidine (**7**) (5.1 mg) was isolated from fractions 143-148 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 87.5:12.5). Fraction 190 (MeOH 100%) was submitted to preparative TLC (20 cm x 20 cm x 0.25 mm, silica gel F<sub>254</sub>, *n*-BuOH:AcOH:H<sub>2</sub>O 12:3:5) and 3-*O*-demethylhippeastidine (**11**) (3.6 mg) was obtained.

**GC-MS analysis:** Gas chromatography-mass spectrometry analyses were performed on a Hewlett Packard 6890/MSD 5972 instrument operating in EI mode at 70 eV, equipped with a capillary column (HP-5 30 m x 0.25 mm, 0.25 μm film thickness). Mass range was

from  $m/z$  35 - 500 amu. The carrier gas was helium with a flow rate of 1 mL/min. The GC oven temperature program was held at 100°C for 2 min, programmed at 15°C/min to 180 °C, hold for 1 min, and then programmed at 5°C/min to 280°C, and held for 10 min at 280°C. The injection block temperature was 280°C. Samples were dissolved in MeOH. Results were analyzed using NBS75K.LMSDATA. Alkaloids were identified by comparing their MS and retention times with those reported in the literature.

**Cholinesterase inhibition assay:** Electric eel (*Torpedo californica*) AChE and horse serum BChE were used as sources of both

cholinesterases. AChE and BChE inhibitory activities were measured as previously reported [19]. All reactions were performed in triplicate. IC<sub>50</sub> values were determined with GraphPad Prism 5. Eserine (99%) was used as the reference AChE/BChE inhibitor.

**Acknowledgments** - This work was financially supported by the National Research Council of Argentina (CONICET), Universidad Nacional del Sur (Argentina) and ANPCYT. A.P.M. and M.G.M. are Research Members of CONICET. N.P.A. and V.C. are grateful to CONICET for their doctoral fellowships.

## References

- [1] (a) Selkoe DJ. (2012) Preventing Alzheimer's disease. *Science*, **2012**, 1488-1492; (b) Léon R, Garcia AG, Marco-Contelles J. (2013) Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease. *Medicinal Research Reviews*, **33**, 139-189; (c) Tayeb HO, Yang HD, Price BH, Tarazi FI. (2012) Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, **134**, 8-25; (d) Greig NH, Lahiri DK, Sambamurti K. (2002) Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *International Psychogeriatrics*, **14**, 77-91.
- [2] Murray AP, Faraoni MB, Castro MJ, Alza NP, Cavallaro V. (2013) Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Current Neuropharmacology*, **11**, 388-413.
- [3] (a) Jin Z. (2013) Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Products Reports*, **30**, 849-868; (b) López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. (2002) Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*, **71**, 2521-2529; (c) Osorio EJ, Berkov S, Brun R, Codina C, Viladomat F, Cabezas F, Bastida J. (2010) *In vitro* antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry Letters*, **3**, 161-163; (d) Cheesman L, Nair JJ, van Staden J. (2012). Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophone disticha* (Amaryllidaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **140**, 405-408; (e) da Silva AF, de Andrade JP, Bevilacqua L, de Souza MM, Izquierdo I, Henriques AT, Silveira Zuanazzi JA. (2006) Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, **85**, 148-154; (f) Cahlíková L, Benešová N, Macáková K, Urbanová K, Opletal L. (2011) GC/MS analysis of three Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*, **6**, 1255-1258.
- [4] Meerow AW, Snijman DA. (1998) Amaryllidaceae. In *The Families and Genera of Vascular Plants III*. K. Kubitzki (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Germany. 83-110.
- [5] Zuloaga FO, Morrone O, Belgrano MJ, Marticorena C, Marchesi E. (Eds). (2008) *Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay)*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Vol **107**, St. Louis, Missouri, 1-983.
- [6] Lamberto SA, Valle AF, Aramayo EM, Andrada AC. (1997) *Manual ilustrado de las plantas silvestres de la región de Bahía Blanca*. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur (Ed.). Bahía Blanca, Argentina. 1-548.
- [7] Arroyo SC. (1990) *Habranthus* (Amaryllidaceae) en Argentina y Uruguay. *Parodiána*, **6**, 11-30.
- [8] Ravenna PF. (1969) *Amaryllidaceae*. In *Flora Patagónica*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Correa MN. (Ed.). Buenos Aires, Argentina. 152-164.
- [9] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88-95.
- [10] Berkov S, Bastida J, Nikolova M, Viladomat F, Codina C. (2008) Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochemical Analysis*, **19**, 411-419.
- [11] de Andrade JP, Pigni NB, Torras-Claveria L, Berkov S, Codina C, Viladomat F, Bastida J. (2012) Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: mass spectral studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **70**, 13-25.
- [12] Ortiz JE, Berkov S, Pigni N, Theoduloz C, Roitman G, Tapia A, Bastida J, Feresin GE. (2012) Wild Argentinian Amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids. *Molecules*, **17**, 13473-13482.
- [13] (a) Berkov S, Bastida J, Sidjimova B, Viladomat F, Codina C. (2011) Alkaloid diversity in *Galanthus elwesii* and *Galanthus nivalis*. *Chemistry & Biodiversity*, **8**, 115-130; (b) Berkov S, Georgieva L, Kondakova V, Viladomat F, Bastida J, Atanassov A, Codina C. (2013) The geographic isolation of *Leucojum aestivum* populations leads to divergation of alkaloid biosynthesis. *Biochemical Systematics and Ecology*, **46**, 152-161.
- [14] Pacheco P, Silva M, Steglich W. (1978) Alkaloids of Chilean Amaryllidaceae I. Hippeastidine and epi-homolycorine two novel alkaloids. *Revista Latinoamericana de Química*, **9**, 28-32.
- [15] Watson WH, Volker Z. (1982) Hippeastidine C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N. *Crystal Structure Communications*, **11**, 157-1652.
- [16] Pacheco P, Silva M, Sammes P, Watson W. (1982) Estudio químico en Amaryllidaceae chilenas II. Nuevos alcaloides de *Hippeastrum añahuca* Phil. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, **27**, 289-290.
- [17] Houghton P, Agbedahunsi J, Adegbulugbe A. (2004) Choline esterase properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. *Phytochemistry*, **65**, 2893-2896.
- [18] Pagliosa LB, Monteiro SC, Silva KB, de Andrade JP, Dutilh J, Bastida J, Cammarota M, Zuanazzi JA. (2010) Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine*, **17**, 698-701.
- [19] Richmond V, Murray AP, Maier MS. (2013) Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of polyhydroxylated sulfated steroids: structure/activity studies, *Steroids*, doi: 10.1016/j.steroids.2013.08.003

<b>Cyclic Dipeptides Produced by Marine Sponge-Associated Bacteria as Quorum Sensing Signals</b> Gennaro Roberto Abbamondi, Salvatore De Rosa, Carmine Iodice and Giuseppina Tommonaro	229
<b>Isolation of the Tetrapeptide Apicidins G, H and I from the Fungus <i>Fusarium semitectum</i></b> Suciati and Mary J. Garson	233
<b>The Co-identity of Lipiarmycin A3 and Tiacumicin B</b> Angelo Bedeschi, Piera Fonte, Giovanni Fronza, Claudio Fuganti and Stefano Serra	237
<b>PSY-1, a <i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairii</i> Extract, Inhibits Cancer Cell Metastasis by Interfering with MMPs</b> Zao-qian Zheng, Ying-Ying Fu, Bo-Heng Li, Mei-Ling Zhang, Xiu-Li Yang, Chuan-wei Xin, Jia-na Shi, Yin Ying and Ping Huang	241
<b>Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated from <i>Swietenia macrophylla</i> Leaves</b> Darah Ibrahim, Chong Chai Lee and Lim Sheh-Hong	247
<b>Aroma Profile of Star Anise and the Structure-odor Relationship of Anethole</b> Toshio Hasegawa, Haruna Seimiya, Takashi Fujihara, Noriko Fujiwara and Hideo Yamada	251
<b>The Essential Oil of <i>Populus balsamifera</i> Buds: its Chemical Composition and Cytotoxic Activity</b> Marianne Piochon-Gauthier, Jean Legault, Muriel Sylvestre and André Pichette	257
<b>Comparative Chemical Study and Cytotoxic Activity of <i>Uvariadendron angustifolium</i> Essential Oils from Benin</b> Jean-Pierre Noudogbessi, Magali Gary-Bobo, Aristide Adomou, Elvis Adjalian, Guy Alain Alitonou, Félicien Avlessi, Marcel Garcia, Dominique C. K. Sohounhloué and Chantal Menut	261
<b>Composition of Essential Oil from <i>Tagetes minuta</i> and its Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Activities</b> Nasser A. Awadh Ali, Farukh S. Sharopov, Ali G. Al-kaf, Gabrielle M. Hill, Norbert Arnold, Saeed S. Al-Sokari, William N. Setzer and Ludger Wessjohann	265
<b>Chemical Composition of the Essential Oil of <i>Croton bonplandianus</i> from India</b> Rajesh K. Joshi	269
<b>Chemical Composition of <i>Angelica panicii</i> Essential Oil Determined by Liquid and Headspace GC-MS Techniques</b> Strahinja R. Simonović, Vesna P. Stankov-Jovanović, Violeta D. Mitić, Marija D. Ilić, Goran M. Petrović and Gordana S. Stojanović	271
<b>Chemical Description and Essential Oil Yield Variability of Different Accessions of <i>Salvia lavandulifolia</i></b> Jaime Usano-Aleman, Jesús Palá-Paúl, Manuel Santa-Cruz Rodríguez and David Herraiz-Peñalver	273
<b>Antimicrobial Constituents and Synergism Effect of the Essential Oils from <i>Cymbopogon citratus</i> and <i>Alpinia galanga</i></b> Sarin Tadtong, Rith Watthanachaiyingcharoen and Narisa Kamkaen	277
<b><i>In vitro</i> Antibacterial Activity of <i>Libanotis montana</i> Essential Oil in Combination with Conventional Antibiotics</b> Dragoljub L. Miladinović, Budimir S. Ilić, Tatjana M. Mihajilov-Krstev, Jovana L. Jović and Marija S. Marković	281
<b><u>Review/Account</u></b>	
<b>Modernization of Ayurveda: A Brief Overview of Indian Initiatives</b> Ambarish Mukherjee, Mousumi Banerjee, Vivekananda Mandal, Amrithesh C. Shukla and Subhash C. Mandal	287

# Natural Product Communications

## 2014

Volume 9, Number 2

### Contents

<u>Original Paper</u>	<u>Page</u>
<b>Volatile Glycosides from the Leaves of <i>Morus alba</i> with a Potential Contribution to the Complex Anti-diabetic Activity</b> Attila Hunyadi, Ibolya Herke, Katalin Veres, Anna Erdei, András Simon and Gábor Tóth	145
<b>A New Eudesmane Sesquiterpene from <i>Dichrocephala integrifolia</i></b> Fang Qin, Yi-Bing Wu, Rui-xia Guo, Mei Dong, Françoise Sauriol, Qing-Wen Shi, Yu-Cheng Gu and Hiromasa Kiyota	149
<b>Evaluation of the Anti-melanoma Activities of Sarcophine, (+)-7<math>\alpha</math>,8<math>\beta</math>-Dihydroxydepoxy sarcophine and Sarcophytolide from the Red Sea Soft Coral <i>Sarcophyton glaucum</i></b> Pawel T. Szymanski, Safwat A. Ahmed, Mohamed M. Radwan, Sherief I. Khalifa and Hesham Fahmy	151
<b>Steroidal Aglycones from Stems of <i>Marsdenia tenacissima</i> that Inhibited the Hedgehog Signaling Pathway</b> Lin Zhang, Feng-yang Chen, Shi-fang Xu, Yi-ping Ye and Xiao-yu Li	155
<b>Chemical Constituents, and their Cytotoxicity, of the Rare Wood Decaying Fungus <i>Xylaria humosa</i></b> Sirirath Sodngam, Sasiphimol Sawadsitang, Nuttika Suwannasai and Wiyada Mongkolthanaruk	157
<b>Alkaloids from <i>Habranthus tubispathus</i> and <i>H. jamesonii</i>, two Amaryllidaceae with Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibition Activity</b> Valeria Cavallaro, Natalia P. Alza, María G. Murray and Ana P. Murray	159
<b>Further Characterization of Foliar Flavonoids in <i>Crossostephium chinense</i> and their Geographic Variation</b> Ayumi Uehara, Junichi Kitajima, Goro Kokubugata and Tsukasa Iwashina	163
<b>Hawaiian Propolis: Comparative Analysis and Botanical Origin</b> Saori Inui, Takahiro Hosoya and Shigenori Kumazawa	165
<b>Nutritional and Functional Properties of Aqueous and Hydroalcoholic Extracts from Argentinean Propolis</b> Fátima C. Danert, Catiana Zampini, Roxana Ordoñez, Luis Maldonado, Enrique Bedascarrasbure and María Inés Isla	167
<b>Anti-trypanosomal Phenolic Derivatives from <i>Baccharis uncinella</i></b> Simone dos S. Grecco, Maria Júlia P. Félix, João Henrique G. Lago, Érika G. Pinto, André G. Tempone, Paulete Romoff, Marcelo José P. Ferreira and Patricia Sartorelli	171
<b>Polyphenols in Representative <i>Teucrium</i> Species in the Flora of R. Macedonia: LC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup> Profile and Content</b> Ilija Mitreski, Jasmina Petreska Stanoeva, Marina Stefova, Gjoshje Stefkov and Svetlana Kulevanova	175
<b>In vitro Inhibitory Effects of <i>Limonium contortirameum</i> and <i>L. virgatum</i> Extracts from Sardinia on <math>\alpha</math>-Amylase, <math>\alpha</math>-Glucosidase and Pancreatic Lipase</b> Marzia Foddai, Violet Kasabri, Giacomo L. Petretto, Emanuela Azara, Angela Sias, Fatma U. Affi, Giovanna Delogu, Mario Chessa and Giorgio Pintore	181
<b>Search for Skin-whitening Agent from <i>Prunus</i> Plants and the Molecular Targets in Melanogenesis Pathway of Active Compounds</b> Kazuya Murata, Keisuke Takahashi, Haruka Nakamura, Kimihisa Itoh and Hideaki Matsuda	185
<b>In Silico Prediction of Tyrosinase and Adenyl Cyclase Inhibitors from Natural Compounds</b> Pedro Fong, Henry H. Y. Tong and Chi M. Chao	189
<b>Molecular Docking and Reaction Kinetic Studies of Chrysin Binding to Serum Albumin</b> Bingli Jiang, Anran Zhao, Jianhua Miao, Pengfei Chang, Hailin Chen, Weigao Pan and Cuiwu Lin	195
<b>Anthocyanins from the Flowers of Nagai Line of Japanese Garden Iris (<i>Iris ensata</i>)</b> Kaori Kitahara, Yoshinori Murai, Sang Woo Bang, Junichi Kitajima, Tsukasa Iwashina and Yukio Kaneko	201
<b>New Chromone and Triglyceride from <i>Cucumis melo</i> Seeds</b> Sabrin R. M. Ibrahim	205
<b>Five New Acylphloroglucinol Glycosides from the Leaves of <i>Eucalyptus robusta</i></b> Qian-Yi Guo, Xiao-Jun Huang, Bing-Xin Zhao, Yu-Qing Jian, Shi-Lin Luo, Ying Wang and Wen-Cai Ye	209
<b>Usonic acid and Triacylglycerides Production by the Cultured Lichen Mycobiont of <i>Ramalina celastri</i></b> Alejandra T. Fazio, Mónica T. Adler and Marta S. Maier	213
<b>A New Lignan Glycoside from <i>Chamaecyparis obtusa</i> var. <i>breviramea</i> f. <i>crippsi</i></b> Jian Xu, Guang-Zhi Zeng, Ke-Li Chen, Yi-Mei Liu, Zhang-Hua Sun, Ning-Hua Tan and Yu-Mei Zhang	215
<b>Synthesis of 2-Acetyl-1,4-Dimethoxynaphthalene, A Potential Intermediate for Disubstituted Naphtho[2,3,c]pyran-5,10-dione</b> Kimberly Chinae, Willian Vera and Ajoy K. Banerjee	217
<b>Anthraquinone and Naphthoquinone Derivatives from the Roots of <i>Coptosapelta flavescens</i></b> Wipapan Kongyen, Vatcharin Rukachaisirikul, Souwalak Phongpaichit, Nongyao Sawangjaroen, Phruksa Songsing and Hattaya Madardam	219
<b>Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>, Vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Enterococcus faecium</i> active Dimeric Isobutyrylphloroglucinol from <i>Ivesia gordonii</i></b>	221
<b>Biological Studies of Turmeric Oil, Part 3: Anti-Inflammatory and Analgesic Properties of Turmeric Oil and Fish Oil in Comparison with Aspirin</b> James N. Jacob and Dinesh K. Badyal	225

Continued inside backcover