

Actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa por extractos de 18 especies vegetales nativas de Guatemala usadas en el tratamiento de afecciones nerviosas

Ortiz, D., Valdez, A., López, L., Gaitán, I., Paz, M., Cruz, S., Álvarez, L y Armando Cáceres
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala
dayrin.ortiz@gmail.com

Resumen

Los síndromes neurodegenerativos producen deterioro de la memoria y conducta. Una de las patologías más frecuentes es la Enfermedad de Alzheimer, asociada a la disminución de los niveles del neurotransmisor acetilcolina (AC), consecuencia del aumento en acetilcolinesterasa (ACE), motivo por el cual los tratamientos se centran en fármacos que aumentan los niveles de AC e inhiben la ACE. Estudios en distintas partes del mundo han descrito algunos metabolitos secundarios vegetales como posible fuente para inhibir la actividad de la enzima. Con el objetivo de encontrar inhibidores de la ACE se evaluó la actividad de extractos (diclorometano y metanol) de plantas nativas usadas en el tratamiento de afecciones nerviosas (*Brugmansia candida*, *Cassia reticulata*, *Chaptalia nutans*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *Dorstenia contrajerva*, *Erythrina berteroana*, *Lantana camara*, *Lippia graveolens*, *Petiveria alliacea*, *Phlebodium pseudoaureum*, *Pimenta dioica*, *Salvia microphylla*, *Solanum nigrescens*, *Tagetes lucida*, *Ternstroemia tepezapote*, *Valeriana prionophylla*, *Vernonia deppeana* y *Wigandia urens* var. *caracasana*). La evaluación se realizó por bioautografía en capa fina y microcolorimetría. Por bioautografía se demostró actividad inhibitoria en todas las especies estudiadas, pero al cuantificar la actividad ninguno inhibe el 50% a 1 mg/mL. Tres especies que mostraron actividad (*L. camara*, *T. lucida* y *V. prionophylla*) fueron fraccionadas por partición líquido:líquido para conocer si al purificar las fracciones se mejora la actividad. Se demostró que las particiones no aumentaron la actividad. Además se encontró actividad moderada en extractos de *D. contrajerva*, *L. graveolens* y *W. urens* var. *caracasana*. Se continuarán los estudios de estas especies para determinar si tienen algún potencial de utilización.

Palabras clave: *Lantana camara*, *Tagetes lucida*, *Valeriana prionophylla*, *Wigandia urens* var. *caracasana*, *Lippia graveolens*, *Chaptalia nutans*.

Abstract

Neurodegenerative syndromes generate memory and behavior deterioration, usually in the elderly. The most common is Alzheimer's disease, which is associated with decreased levels of acetylcholine (ACh) after an increase of acetylcholinesterase (AChE). Worldwide studies have described some secondary metabolites from plants that might inhibit the enzyme activity or retard neuronal deterioration. With the aim of finding inhibitors of AChE, activity was evaluated in extracts (dichloromethane and methanol) of 18 medicinal and aromatic plants used in Guatemala for nervous or memory disorders (*Brugmansia candida*, *Cassia reticulata*, *Chaptalia nutans*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *Dorstenia contrajerva*, *Erythrina berteroana*, *Lantana camara*, *Lippia graveolens*, *Petiveria alliacea*, *Phlebodium pseudoaureum*, *Pimenta dioica*, *Salvia microphylla*, *Solanum nigrescens*, *Tagetes lucida*, *Ternstroemia tepezapote*, *Valeriana prionophylla*, *Vernonia deppeana* and *Wigandia urens* var. *caracasana*). AChE inhibition was assessed qualitatively by two bioautographic TLC assays and quantitatively by a kinetic microcolorimetric evaluation. The results demonstrated activity by bioautography in all species at screening concentration (5 μ l), but when quantified by microcolorimetry no significant activity (>50%) was demonstrated at 1 mg/mL. Three of the species with shown activity (*L. camara*, *T. lucida* and *V. prionophylla*) were partitioned to see if the liquid:liquid partitions presented more activity, but this did not increase the activity. Intermediate activity was also found in extracts from *C. nutans*, *D. contrajerva* var. *houstoni*, *L. graveolens* and *W. urens* var. *caracasana*. Studies will continue regarding the antioxidant activity in order to determine whether there might be some potential use.

Keywords: *Lantana camara*, *Tagetes lucida*, *Valeriana prionophylla*, *Wigandia urens* var. *caracasana*, *Lippia graveolens*, *Chaptalia nutans*.

Introducción

La adquisición y mantenimiento de la memoria es una función multicausal dependiente de factores individuales, colectivos, nutricionales, históricos, traumáticos y ambientales, los que se ven fuertemente influenciados cuando los procesos son acumulativos, degenerativos o simplemente por la edad de los individuos. Al conjunto de síntomas y signos que se desarrollan con la pérdida progresiva de la memoria se les clasifican como síndromes neurodegenerativos que son procesos patológicos del sistema nervioso central que aparecen con el paso del tiempo y que se caracterizan por desórdenes neurológicos que repercuten dañando las células cerebrales, deteriorando así la memoria y el movimiento. Entre ellos se destacan especialmente las enfermedades de Alzheimer (EA), Parkinson y Huntington. (Houghton, Ren & Howes, 2006; Rubinstein, 2006).

El hallazgo más importante asociado con la pérdida de la memoria y habilidades motoras es la disminución del neurotransmisor acetilcolina (AC), por aumento de los niveles de la enzima acetilcolinesterasa (ACE). El proceso se complica conforme se reduce la síntesis de la AC, el aumento de su destrucción, los procesos inflamatorios y la formación de placas β -amiloides. (Houghton *et al.*, 2006; Rubinstein, 2006).

Los tratamientos son escasos y la mayoría se vinculan con la inhibición de la ACE para disminuir la destrucción de AC y garantizar mayores niveles en beneficio de la salud cerebral. Se han investigado muchos compuestos con esta propiedad pero aún no hay un fármaco de elección para este fin (Chopra, Misra & Kuhad, 2011).

Estudios en los últimos años han demostrado que algunas especies vegetales pueden presentar moléculas que tienen actividad inhibitoria de la ACE (IACE), e inclusive han servido de base para el desarrollo de medicamentos que pueden usarse para prevenir o retrasar el desarrollo de EA o bien disminuir la severidad de los síntomas (Akhondzadeh & Abbasi, 2006; Howes & Perry, 2011; Kim, Lee & Lee, 2010; Perry & Howes, 2010; Wilkinson, 2007) particularmente mediante la droga galantamina aislada de varias especies de la familia Amaryllidaceae (Marco & Carreiras, 2006).

La biodiversidad es una fuente de moléculas esperando ser descubiertas para el desarrollo de nuevos productos para el bienestar humano. Estudios realizados en otras partes del mundo demuestran que la biodiversidad puede ser una fuente de moléculas para contrarrestar los síndromes degenerativos, principalmente en lo que respecta a su actividad IACE, particularmente en Asia, Europa y Africa.

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad IACE de los extractos diclorometánicos y metanólicos de 18 especies vegetales medicinales y aromáticas seleccionadas por ser nativas y usarse tradicionalmente para tratar afecciones nerviosas, neurológicas o de la memoria. En los extractos positivos se hizo una partición líquido-líquido para orientar estudios futuros de fraccionamiento bioguiado que permitan aislar y elucidar la estructura responsable de la actividad.

Materiales y Métodos

Obtención y colecta del material vegetal

Plantas: Basado en información etnobotánica de plantas usadas en Guatemala para los trastornos neurológicos, muestra de las 18 especies de plantas fueron recolectadas de las tierras de cultivo o de campos de manejo de acuerdo con

buenas prácticas de colecta y determinadas por uno de los autores (LEA). Las muestras fueron procesadas conforme a técnicas convencionales de secado depositando un ejemplar de herbario en el Herbario del Laboratorio de Productos Naturales Farmaya (CFEH) (Tabla 1). Las plantas fueron secadas a temperatura ambiente hasta obtener <10% de humedad.

Tabla 1. Plantas medicinales y aromáticas usadas para desórdenes nerviosos y de la memoria en Guatemala

Familia	Nombre científico	Nombre popular	Parte usada	Lugar de colección	Voucher #
Asteraceae	<i>Chaptalia nutans</i> L.	Valeriana	Hojas/Raíz	Samayac, Suchitepéquez	CFEH 1084
	<i>Tagetes lucida</i> Cav.	Pericón	Partes aéreas	San Cristobal, Totonicapán	CFEH 1127
	<i>Vernonia deppeana</i> Less.	Suquinay	Hojas	Samayac, Suchitepéquez	CFEH 1122
Fabaceae	<i>Cassia reticulata</i> Wild.	Barajo	Hojas	Samayac, Suchitepéquez	CFEH 1101
	<i>Erythrina berteroa</i> Urban	Pito	Corteza	Santa Rosa-Jalapa	CFEH 1134
Hydrophyllaceae	<i>Wigandia urens</i> var. <i>caracasana</i> Ruiz & Pavón	Chocón	Flores	Acatenango, Sacatepéquez	CFEH 1068
Lamiaceae	<i>Salvia microphylla</i> Kunth.	Mirto	Partes aéreas	ICTA, Chimaltenango	CFEH 1124
Moraceae	<i>Dorstenia contrajerva</i> var. <i>houstoni</i> L.	Contrahierba	Hojas/Raíz	Samayac, Suchitepéquez	CFEH 1082
	<i>Dorstenia contrajerva</i> var. <i>tenuiloba</i> L.	Contrahierba	Raíz	Samayac, Suchitepéquez	CFEH 1123
Myrtaceae	<i>Pimenta dioica</i> L.	Pimienta	Fruta	Santa Cruz, Verapaz	
Phytolaccaceae	<i>Petiveria alliacea</i> L.	Apacín	Hojas/Raíz	Samayac, Suchitepéquez	CFEH 1076
Polypodiaceae	<i>Phlebodium pseudoaureum</i> (Cav.) Lellinger	Calahuala	Fronda/Rizoma	San José Pinula, Guatemala	CFEH 1176
Solanaceae	<i>Brugmansia candida</i> Pers.	Florifundia	Flores	Tecpán, Chimaltenango	CFEH 1089
	<i>Solanum nigrescens</i> Mart. & Gal.	Macuy	Hierba	Tecpán, Chimaltenango	CFEH 1111
Sterculiaceae	<i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larr	Manita	Flores	Tecpán, Chimaltenango	CFEH 1088
Theaceae	<i>Ternstroemia tepezapote</i> Schlect. & Cham.	Tila	Flores	San Pedro Pinula, Jalapa	CFEH 1108
Valerianaceae	<i>Valeriana prionophylla</i> Stand.	Valeriana	Rizoma	San Cristobal, Totonicapán	CFEH 1125
Verbenaceae	<i>Lantana camara</i> L.	Siete negritos	Hojas	Guatemala, Guatemala	CFEH 1166
	<i>Lippia graveolens</i> Kunth.	Orégano	Hojas	Samayac, Suchitepéquez	CFEH 1082

Extracción: De los materiales secos se pesaron 500 g, se pasaron por un tamiz y se colocaron en un percolador donde se agregó disolvente apolar (diclorometano) durante 5 días con recambios diarios del disolvente hasta extraer la mayoría de metabolitos; el menstuo extraído se concentró a presión reducida a una temperatura inferior a los 45°C en un rotavapor con recuperación del disolvente. El proceso se repitió utilizando disolvente polar (metanol). A cada extracto se le determinó el porcentaje de rendimiento a partir del material vegetal seco.

Partición líquido:líquido: Con base en los resultados preliminares de TLC y sugerencias de la literatura, tres extractos (*L. camara*, *T. lucida* y *V. prionophylla*) fueron líquido: líquido dividido sucesivamente con hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol. *Chiranthodendron pentadactylon* Larr., *Dorstenia contrajerva* L., *Lantana camara* L., *Lippia graveolens* HBK, *Petiveria alliacea* L., *Phlebodium pseudoaureum* Cav. Lellinger, *Salvia microphylla* HBK, *Tagetes lucida* Cav., *Ternstroemia tepezapote* Schlecht & Cham. y *Valeriana prionophylla* Stand.

Metodología

Bioautografía con Fast Blue B: La ACE se disolvió en 150 mL de amortiguador Tris-HCl al 0.05M de pH 7.8. Se agregó albúmina de suero bovino (150 mg) con el fin de estabilizar la enzima durante el bioensayo. La solución madre se conservó a 4°C., se introdujeron las placas en un disolvente adecuado (acetona o isopropanol) y luego se secaron cuidadosamente. Se activaron las placas de CCF por 5 min a 100°C. Se asperjaron con la enzima (ACE), se secaron las placas y se incubaron a 37°C por 20 min, se asperjaron con acetato 1-naftilo (250 mg) en EtOH (100 mL) y sal de Fast Blue B No. 48 (400 mg) en agua destilada (160 mL). Esta última disolución se hizo inmediatamente antes de usarla, para evitar a descomposición. Placa recién asperjada con solución de fast blue B y -acetato de 1-naftilo (Peng & Zhao, 2009; Yang *et al.*, 2009).

Técnica microcolorimétrica: Se evaluó la IACE de los extractos a una concentración de 1 mg/mL. En placas de microtitulación se colocaron 25 µL de yoduro de acetiltiocolina 15mM (ATCI), 125 µL de DTNB 3mM, 50 µL de Tris-HCl pH8 con 0.1% albúmina de suero bovino y 25 µL de diluciones de cada extracto. Se midió ocho veces la absorción a 405 nm cada 17 segundos. Se agregó 25 µL de ACE a cada pozo y nuevamente se midió ocho veces la absorción a 405 nm cada 17 segundos. El valor de absorbancia obtenido en cada muestra fue comparado con el blanco y control, que evidenciaban el 0% y 100% de actividad inhibitoria respectivamente y de esta manera se calculó el porcentaje de inhibición.

Interpretación: al presentarse la positividad y al haber calculado los índices de reacción de la actividad de cada extracto, se realizó la

caracterización química (Adsersen, Gaugin, Gudiksen & Jäger, 2006)

Resultados

Se colectaron 18 especies y se prepararon 23 extractos de las hojas, rizomas o raíces con diclorometano y metanol. Donde los rendimientos de cada una de ellas variaron ampliamente, en el caso de diclorometano el rendimiento varió de 7.85±0.79% (*S. microphylla*) y 7.70±0.80% (*W. urens* var. *caracasana*.) a 0.37±0.01% (*P. alliacea*); en el MeOH la variación del rendimiento fue de 33.40±3.40% (*V. prionophylla*) a 3.40±0.02%% (*T. tepezapote*).

La IACE se evaluó mediante el procedimiento cualitativo de CCF donde la mayoría de los extractos mostraron bandas de decoloración por dos bioautografías a una concentración de 5 mL. Un método microcolorimétrico se estableció utilizando eserina para la validación del procedimiento. Ninguno de los extractos inhibieron la ACE más del 50% usando una concentración de 1 mg/ml. La mejor inhibición se logró por medio de la extracción CH₂Cl₂ de la raíz de *D. contrajerva* var. *houstonii* (35±13%), *V. prionophylla* (25±15%), los extractos de MeOH de flores de *W. urens* var. *caracasana* (43±12%) y la raíz de *C. nutans* (29±20%) (Tabla 2).

Tabla 2. Rendimiento de extracción y actividad IACE por 23 extractos

Scientific name	Rendimiento (%)		IACE (%)*	
	CH ₂ Cl ₂	MeOH	CH ₂ Cl ₂	MeOH
<i>Brugmansia candida</i>	2.30±0.20	11.6±1.00	3±36.40	15±6.69
<i>Cassia reticulata</i>	5.80±0.59	18.90±1.90	13±5.96	16±19.95
<i>Chaptalia nutans</i> (hojs)	5.04±0.50	5.00±0.80	-9±4.83	14±20.01
<i>Chaptalia nutans</i> (raíces)	1.80±0.18	20.30±2.00	22±17.02	29±20.01
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	0.57±0.03	6.34±0.80	9±5.03	-40±15.95
<i>Dorstenia contrajerva</i> var. <i>houstoni</i> (hojas)	3.30±0.30	6.28±0.70	29±9.36	-5±6.05
<i>Dorstenia contrajerva</i> var. <i>houstoni</i> (raíces)	1.50±0.29	9.83±0.98	35±13.5	-8±14.83
<i>Dorstenia contrajerva</i> var. <i>tenuiloba</i>	1.04±0.10	10.17±1.00	28±5.14	21±19.53
<i>Erythrina berteroana</i>	3.80±0.38	9.00±0.90	7±18.45	19±11.40
<i>Lantana camara</i>	3.96±0.40	5.95±0.60	10±9.13	16±5.41
<i>Lippia graveolens</i>	6.91±0.69	9.70±0.97	45±4.18	-19±95.63
<i>Petiveria alliacea</i> (hojass)	1.68±0.24	9.96±1.91	16±5.90	-26±10.54
<i>Petiveria alliacea</i> (raíces)	0.37±0.01	4.82±0.35	13±6.09	-6±7.09
<i>Phlebodium pseudoaureum</i> (frondas)	2.90±0.15	18.78±1.70	11±3.77	4±8.50
<i>Phlebodium pseudoaureum</i> (rizomas)	1.97±0.20	7.22±0.70	23±20.15	-38±10.63
<i>Pimenta dioica</i>	5.87±0.60	11.5±0.90	-3±15.09	24±13.51
<i>Salvia microphylla</i>	7.85±0.79	19.03±1.90	27±4.91	-29±7.17
<i>Solanum nigrescens</i>	5.80±0.69	9.80±1.12	1±15.77	7±20.55
<i>Tagetes lucida</i>	3.86±0.39	14.39±1.50	20±10.83	20±29.51
<i>Ternstroemia tepezapote</i>	1.18±0.03	3.40±0.02	6±8.18	-24±34.32
<i>Valeriana prionophylla</i>	1.86±0.20	33.40±3.40	25±15.67	10±6.69
<i>Vernonia deppeana</i>	5.30±0.52	4.90±0.30	6±5.79	3±10.18
<i>Wigandia urens</i> var. <i>caracasana</i>	7.70±0.80	13.70±1.37	11±11.41	43±12-18

*% inhibición por 1 mg/mL

Los tres extractos (*L. camara*, *T. lucida* y *V. prionophylla*) particionados se analizaron por ensayos de bioautografía CCF demostrando actividad a una concentración de 5 µL, pero cuando se cuantificó mediante el método microcolorimétrico, los resultados fueron moderados. En el caso de *L. camara*, el extracto en cloroformo mostró 38±6% de inhibición, mientras que el extracto de *T. lucida* mostró actividad en las cuatro particiones en 28-35% (Tabla 3).

Tabla 3. Rendimiento de particiones secuenciales y actividad IACE por tres extractos seleccionados

<i>Lippia graveolens</i>	6.91±0.69	9.70±0.97	45±4.18	-19±95.63
<i>Petiveria alliacea</i> (hojass)	1.68±0.24	9.96±1.91	16±5.90	-26±10.54
<i>Petiveria alliacea</i> (raíces)	0.37±0.01	4.82±0.35	13±6.09	-6±7.09
<i>Phlebodium pseudoaureum</i> (frondas)	2.90±0.15	18.78±1.70	11±3.77	4±8.50
<i>Phlebodium pseudoaureum</i> (rizomas)	1.97±0.20	7.22±0.70	23±20.15	-38±10.63
<i>Pimenta dioica</i>	5.87±0.60	11.5±0.90	-3±15.09	24±13.51
<i>Salvia microphylla</i>	7.85±0.79	19.03±1.90	27±4.91	-29±7.17
<i>Solanum nigrescens</i>	5.80±0.69	9.80±1.12	1±15.77	7±20.55
<i>Tagetes lucida</i>	3.86±0.39	14.39±1.50	20±10.83	20±29.51
<i>Ternstroemia tepezapote</i>	1.18±0.03	3.40±0.02	6±8.18	-24±34.32
<i>Valeriana prionophylla</i>	1.86±0.20	33.40±3.40	25±15.67	10±6.69
<i>Vernonia deppeana</i>	5.30±0.52	4.90±0.30	6±5.79	3±10.18
<i>Wigandia urens</i> var. <i>caracasana</i>	7.70±0.80	13.70±1.37	11±11.41	43±12-18

Discusión

De acuerdo con una revisión global realizada por Adams, Gmünder y Hamburger (2007) más de 150 especies vegetales en diversas preparaciones y mezclas se utilizan para trastornos cognitivos, en América Central y el Caribe por lo menos cinco especies se utilizan en el contexto de los trastornos cerebrales relacionados con la edad, tres de ellas (*B. candida*, *L. camara* y *T. lucida*.) se incluyeron en esta investigación. De estos sólo *L. camara* se ha estudiado anteriormente, demostrando que no existe ninguna actividad en los extractos de etanol y agua (Vinutha *et al.*, 2007). Extractos de otra especie de este género, *Lantana grisebacii* demostró poca actividad IACE (etanol 22.5±2.5%; agua 10.8±1.0%) para el ensayo microcolorimétrico (Carpinella, Andrione, Ruiz & Palacios, 2010). En el caso de *T. lucida* no se encontraron estudios anteriores, aunque los extractos de *Tagetes minuta* han demostrado una buena actividad IACE (etanol 44.4±12.3%; agua 63.6±4.6%) (Carpinella *et al.*, 2010.).

De las otras especies con una inhibición intermedia de ACE encontramos *D. contrajerva* var. *houstonii* (raíz), *V. prionophylla* (raíz), *W. urens* var. *caracasana* (flor) y *C. nutans* (raíz) las cuales son dignas de adicionales estudios, ya que la inhibición fue interesante y esta actividad se describe por primera vez.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer el apoyo logístico por parte del Laboratorio Farmaya para la recolección de las plantas, determinación y secado, y el apoyo financiero por parte el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT), proyecto FODECYT 39-2008.

Referencias

- Adams, M., Gmünder, F. & Hamburger, M. (2007). Plants traditionally used in age related brain disorders - A survey of ethnobotanical literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 363-381.
- Adersen, A., Gaugin, B., Gudiksen, L. & Jäger, A.K. (2006). Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 104, 418-422.
- Akhondzadeh, S. & Abassi, S.H. (2006). Herbal medicine in the treatment of Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 21, 113-118.
- Barbosa Filho, J.M., Medeiros, K.C.P., Diniz, M.F.F.M., Batista, L.M., Athayde-Filho, P.F., Silva, M.S. *et al.* (2006). Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16, 258-285.
- Calderón, A.I., Cubilla, M., Espinosa, A. & Gupta, M.P. (2010). Screening of plants of Amaryllidaceae and related families from Panama as sources of acetylcholinesterase inhibitors. *Pharmaceutical Biology*. 48, 988-
- Carpinella, M.C., Andrione, D.G., Ruiz, G. & Palacios, S.M. (2010). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts from Argentina. *Phytotherapy Research*, 24, 259-263.

- Chopra, K., Misra, B. & Kuhad, A. (2011). Current perspectives on pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Expert Opinion in Pharmacotherapy*, 12, 335-350.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. & Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry Pharmacology*, 7, 88-95
- Figueiró, M., Ilha, J., Pochmann, D., Porciúncula, L.O., Xavier, L.L., Achaval, M. *et al.* (2010). Acetylcholinesterase inhibition in cognition-relevant brain areas of mice treated with a nootropic Amazonian herbal (Marapuama). *Phytomedicine*. 17, 956-962.
- Houghton, P.J., Ren, Y. & Howes, M.J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Report*, 23, 181-199.
- Howes, M.J. & Perry, E. (2011). The role of phytochemicals in the treatment and prevention of dementia. *Drugs Aging*, 28, 439-468.
- Kalaria, R.J., Maestre, G.E., Arizaga, R., Friedland, R.F., Galasko, D., Hall, K. *et al.* (2008). Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurology*, 7, 812-826.
- Kim, J., Lee, H.J. & Lee, K.W. (2010). Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 112, 1415-1430.
- Marco, L. & Carreiras, C.C. (2006). Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent Patents in CNS Drug Discovery*, 1, 105-111.
- Marston, A., Kissling, I. & Hostettmann, K. (2002). A rapid TLC bioautography method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemistry Analysis*, 13, 51-54.
- Mosquera, O.M., Niño, J., Correa, Y.M. & Hernández, J.A. (2004). Detección *in vitro* de inhibidores de la acetilcolinesterasa en extractos de cuarenta plantas de la flora colombiana mediante el método cromatográfico de Ellman. *Scientia et Technica*, 10, 155-160.
- Peng, S. & Zhao, M. (2009). *Pharmaceutical Bioassays. Methods and Applications*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.. 508 p (pp. 129).993.
- Perry, E. & Howes, M.J.R. (2010). Medicinal plants and dementia therapy: Herbal hopes for brain aging? *CNS Neuroscience Therapy*, 17, 1-16
- Rubinsztein, D.C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, 443, 780-786.
- Siqueira, I.R., Fochesatto, C., da Silva, A.L., Nunes, D.S., Battastini, A.M., Netto, C.A. & Elisabetsky, E. (2003). *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian "nerve tonic", possess anticholinesterase activity. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 75, 645-650.

Vinutha, B., Prashanth, D., Salma, K., Sreeja, S.L., Pratti, D., Padmaja, R. *et al.* (2007). Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 359-363.

Yang, Z., Zhang, X., Duan, D., Song, Z., Yang, M. & Li, S. (2009). Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts. *Journal of Separation Science*, 32, 3257-3259.

Wilkinson, D. (2007). Pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Psychiatry*, 7, 9-14.