

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS”

Realizado por:

MARÍA JOSÉ PÉREZ MARVIT

Director del proyecto:

Dr. Lino Arisqueta Herranz, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 09 de marzo de 2020

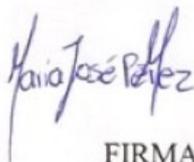
OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, MARÍA JOSÉ PÉREZ MARVIT, con cédula de identidad 1722697040, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA

1722697040

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

“OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.”

Realizado por:

MARÍA JOSÉ PÉREZ MARVIT

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

LINO ARISQUETA HERRANZ

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JUAN CARLOS NAVARRO

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 09 de marzo de 2020

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

El presente Trabajo de Fin de Carrera ha sido realizado dentro del Programa de Investigación de la Universidad Internacional SEK denominado:

BIODIVERSIDAD Y RECURSOS NATURALES APLICADOS A LA GESTIÓN AMBIENTAL Y LA BIOTECNOLOGÍA

Proyecto: “Evaluación de los efectos biológicos de las β -carbolinas de *Banisteriopsis caapi* en modelos celulares”

Perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

DEDICATORIA

A mis padres que han sabido guiarme y brindarme su amor incondicional siempre,

a mi hermana que siempre está a mi lado

a cada uno de mis amigos, que hicieron de la Universidad toda una aventura,

a la persona que ha sabido sacar partes de mí que no sabía tenía ocultas.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

AGRADECIMIENTO

A mi tutor Lino, gracias por el apoyo brindado,
a la Universidad SEK y a cada profesor que ha formado mi camino
al equipo de investigación y a Iván y Galo por su ayuda oportuna.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

Para ser enviado:

To be submitted:

Optimización del método de extracción de β -carbolinas a partir de *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca) y caracterización del extracto para su posterior aplicación en modelos celulares con fines terapéuticos.

María José Pérez¹, Lino Arisqueta^{1*}

¹ Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito,

Ecuador. 03/04/2020 18:02:17

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: Ph.D. Lino Arisqueta,

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ciencias Ambientales y Naturales, Quito, Ecuador.

Teléfono: 0983104230; email: lino.arisqueta@uisek.edu.ec

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

Resumen

Banisteriopsis caapi, planta tradicionalmente empleada para la preparación de la bebida “Ayahuasca”, posee β -carbolinas en sus estructuras vegetativas, alcaloides con propiedades biológicas interesantes: antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitarias, anticancerígenas.

El objetivo de la investigación estuvo orientado a la búsqueda de un método de extracción de β -carbolinas de *Banisteriopsis caapi* que garantice el máximo rendimiento y pureza en el extracto y que sea reproducible a nivel de laboratorio. Para lograrlo se evaluaron diferentes técnicas de extracción: maceración, decocción, Soxhlet, variación de solventes y la utilización de diferentes partes de la planta. El mejor método para futuras extracciones incluye: granulometría fina, maceración en metanol como método de extracción sólido – líquido y cloroformo como solvente de extracción líquido – líquido.

Una vez obtenido el extracto se analizó su pureza y concentración, resultando adecuadas para los tratamientos que se buscaba probar. La composición química del extracto se evaluó a nivel cualitativo y cuantitativo a partir de estándares de referencia de los alcaloides más importantes entre las β -carbolinas de *B. caapi*. Para comprobar la presencia de los alcaloides esperados se analizó el extracto a través de espectroscopia y cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (HPLC). El extracto de *B. caapi*, presentó una pureza adecuada y una concentración elevada de las β – carbolinas de interés para este proyecto.

Posteriormente se realizó una primera evaluación de sus efectos biológicos en cultivos axénicos de bacterias para comprobar su actividad antibacteriana, mediante antibiogramas, como resultado se encontró que el extracto tiene actividad biológica contra bacterias.

Palabras clave: Ayahuasca, HPLC, Espectrofotometría, Alcaloides, IMAOs, Antibiótico, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli*.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

Abstract

Banisteriopsis caapi, plant traditionally used for the preparation of “Ayahuasca” drink, has β -carbolines in its vegetative structures, alkaloids with interesting biological properties: antimicrobial, antifungal, antiparasitic, anticancer.

The objective was searching for a method of extraction of β -carbolines from *Banisteriopsis caapi* that guarantees maximum performance and purity in the extract and that is reproducible at laboratory level. To achieve this, different extraction techniques were evaluated: maceration, decoction, Soxhlet, solvent variation and the use of different parts of the plant. The best method for future extractions includes: fine granulometry, maceration in methanol as a solid-liquid extraction method and chloroform as a liquid-liquid extraction solvent.

Once the extract was obtained, its purity and concentration, suitable for the treatments to be tested, were analyzed. The chemical composition of the extract was evaluated qualitatively and quantitatively based on reference standards of the most important alkaloids among the B.-carbolines of *B. caapi*. To verify the presence of the expected alkaloids, the extract was analyzed by spectroscopy and high efficiency liquid chromatography in reverse phase (HPLC). The extract of *B. caapi*, presented an adequate purity and a high concentration of the β -carbolines of interest for this project.

Subsequently, a first evaluation of its biological effects in axenic cultures of bacteria was performed to check its antibacterial activity, by antibiograms, as a result we found that the extract has biological activity against bacteria.

Keywords: Ayahuasca, HPLC, Spectrophotometry, Alkaloids, MAOIs, Antibiotic, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli*.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

Lista de Tablas

Tabla 1: Reactivos.....	18
Tabla 2: Equipos.	18
Tabla 3: Medios de cultivo.....	19
Tabla 4: Principales bacterias Gram (-) responsables de infecciones nosocomiales.....	25
Tabla 5: Pruebas bioquímicas para <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i>	26
Tabla 6: Listado de extracto de <i>B. caapi</i>	28

Lista de Figuras

Figura 1: Flujo de trabajo de la extracción de alcaloides de <i>B. caapi</i>	20
Figura 2: Efecto de la granulometría sobre la extracción de β -carbolinas de <i>B. caapi</i>	29
Figura 3: Comparación de los métodos de extracción sólido-líquido.	30
Figura 4: Efecto del solvente sobre la extracción de β -carbolinas de <i>B. caapi</i>	31
Figura 5: Identificación de harmina por HPLC.	33
Figura 6: Caracterización del extracto de β -carbolinas de hojas.	34
Figura 7: Efecto del extracto E4 sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>	35

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

1. INTRODUCCIÓN

La medicina se caracteriza por la búsqueda constante de nuevos principios activos y fármacos para tratar enfermedades que no tienen cura, o cuyo tratamiento no ofrece buenos resultados. Dos ámbitos son de particular interés: la búsqueda de quimioterapias contra los distintos tipos de cáncer, más efectivas y con menos efectos adversos; y la lucha contra uno de los problemas de salud más importantes al que nos enfrentamos en el siglo XXI, la resistencia a antibióticos. Como lo indica O'Neill en 2016, la Organización Mundial de la Salud predijo que para el año 2050 la resistencia a antibióticos será la causa del fallecimiento de alrededor de 10 millones de personas al año (O'Neill, 2016). Así mismo, en Ecuador, las investigaciones sobre enfermedades infecciosas desatendidas, tanto bacterianas como víricas o provocadas por parásitos, representan una de las prioridades de investigación para el Ministerio de Salud Pública debido a su alta incidencia y prevalencia (MSP Ecuador, 2016).

La gran biodiversidad de flora ecuatoriana y el conocimiento ancestral en cuanto al uso médico de las plantas, son oportunidades que pueden ser aprovechadas por los investigadores de este país, para el desarrollo de nuevos fármacos de origen natural, con una mayor efectividad en el tratamiento de determinadas enfermedades (Malagón et al., 2016). De hecho, los derivados (directos o indirectos) de plantas, hongos, líquenes y algas (Dias, Urban, & Roessner, 2012), o productos del metabolismo de animales como secreciones corporales y excrementos, componentes presentes en la sangre, nidos y capullos, invertebrados marinos y terrestres pequeños (Costa-Neto, 2005), representan el 50% de la trepeutica moderna a nivel mundial (Gurib-Fakim, 2006), así como más del 50% de los medicamentos aprobados para el tratamiento del cáncer desde 1981 a 2010 (Newman & Cragg, 2012). El uso de los conocimientos ancestrales para el desarrollo de medicamentos ha ido aumentando debido a que

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

el proceso de obtención de fármacos de manera convencional requiere una gran inversión de capital, e investigaciones que pueden llegar a ser muy costosas y largas (Pan et al., 2013).

1.1. *Banisteriopsis caapi*

La ayahuasca es una infusión tradicional indígena preparada en las regiones amazónicas y andinas de América del Sur. Ayahuasca significa “soga de los espíritus” en quechua, de *aya* (espíritu, muerto) y *whaska* (soga, cuerda), ya que según la cosmovisión de los pueblos originarios que la emplean, esta bebida permite que el espíritu salga del cuerpo sin que éste muera. Sus efectos enteógenos (que alteran la conciencia), son empleados con fines espirituales en rituales dirigidos por chamanes (Guimarães & Santos, 2010).

En Ecuador esta infusión se prepara a partir de dos plantas, *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) y *Psychotria viridis* (Ruiz y Pav.), que actúan sinérgicamente para producir los efectos psicotrópicos propios de la bebida. *Psychotria viridis* es rica en N,N-dimetiltriptamina (DMT), un compuesto psicodélico muy potente, a menudo llamado “la molécula de Dios”, y *Banisteriopsis caapi* tiene altas cantidades de alcaloides del tipo β -carbolinas que son necesarios para aumentar la vida media de DMT en el organismo, dando tiempo a que se produzcan los efectos psicodélicos mencionados (Guimarães & Santos, 2010).

El DMT de *P. viridis* actúa como antagonista en el Sistema Nervioso Central (SNC) uniéndose al receptor de 5-hidroxitriptamina de serotonina, neurotransmisor al que se parece estructuralmente, tal y como hacen drogas psicodélicas bien conocidas como el ácido lisérgico de dietilamida (LSD) o la psilocibina (Guimarães & Santos, 2010). Una vez que el DMT ha ingresado al cuerpo de manera oral es rápidamente metabolizado por la monoaminoxidasa (MAO) que se expresa en el tubo digestivo y el hígado (Dennis J. McKenna, 2004). Por esta razón, la preparación de la ayahuasca se realiza a partir de las dos plantas, ya que las β -

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

carbolinas de *B. caapi* son inhibidores competitivos de MAO (IMAOs) (Dennis J. McKenna, Towers, & Abbott, 1984). Esta inhibición favorece la regulación de neurotransmisores del tejido nervioso, lo que tendría un alto potencial farmacológico contra trastornos neurológicos, incluido el Parkinson (Youdim, 2018).

Banisteriopsis caapi es una liana de la familia de las Malpiguiáceas, con 92 especies distribuidas a lo largo de América del Sur: Brasil, Colombia, Bolivia, Ecuador y Perú (Mabberly, 1997). Esta planta ha suscitado un gran interés por su potencial terapéutico en los últimos tiempos, más allá del campo de la psiquiatría. Su alto potencial está dado por la baja toxicidad que representa el uso de su extracto, y por las posibles sinergias que proporcionan la gran variedad de β – carbolinas presentes y que se traducen en una farmacología compleja. De hecho, se han descrito los posibles efectos antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoarios, antioxidantes, antitumorales, antimutagénicos y citotóxicos (Cao, Peng, Wang, & Xu, 2007). Así también, se ha identificado su potencial para inducir la proliferación de células- β pancreáticas tanto *in vitro* como *in vivo* lo que sería de enorme interés para el posible tratamiento de la diabetes tipo I y II (Shirakawa & Kulkarni, 2016). De hecho, la diabetes de tipo II, tiene una prevalencia creciente incluso en los países en vías de desarrollo, asociada al cambio de hábitos de vida (sedentarismo y mala alimentación) y sus complicaciones tienen un impacto profundo en la Salud Pública de Ecuador como demuestra el hecho de que la diabetes mellitus sea, por sí misma, una de las Prioridades de Investigación del Ministerio de Salud Pública de Ecuador, y la única enfermedad endócrina incluida entre esas prioridades (MSP Ecuador, 2013).

Las β -carbolinas encontrados en los distintos tejidos de *B. caapi*, son principalmente la harmina y sus derivados, harmalina, harmol, harmalol, vasina y d-1,2,3,4 tetrahydroharmina (THH) (Morales-García et al., 2017). En estudios sobre la composición alcaloidea de la planta

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

mediante HPLC (*high performance liquid chromatography*), se ha encontrado que el porcentaje mayoritario de las β -carbolinas presentes corresponde a la harmina seguido de la THH y la harmalina. (Serrano-Dueñas, 2001).

En la actualidad, se conocen varios métodos de extracción de alcaloides en función de las especies de plantas empleadas, o los tejidos de los que se obtienen los mismos. A pesar del alto potencial terapéutico que el extracto de *B. caapi* podría llegar a tener, no existe un método estandarizado ni comparativas exhaustivas de los distintos métodos en cuanto a rendimiento, pureza y composición. La evaluación del método específico de extracción es importante para las siguientes fases de investigación del proyecto “Evaluación de los efectos biológicos de las β – carbolinas de *Banisteriopsis caapi* en modelos celulares”. La reproducibilidad del método asegurará resultados homogéneos cuando se evalúen los efectos antitumorales y antiparasitarios en fases ulteriores de la investigación, con poca variabilidad entre extractos e investigadores.

El objetivo de la presente investigación, por tanto, es optimizar el método de extracción de β – carbolinas de *Banisteriopsis caapi* en cuanto al rendimiento y pureza, poniendo énfasis también en la sencillez operativa, y teniendo en cuenta las limitaciones que la legislación ecuatoriana establece en relación a los disolventes orgánicos y otros reactivos. La caracterización molecular del extracto se realizó mediante HPLC de fase reversa. También se ha planteado la evaluación de su efecto antibacteriano, en dos bacterias gram (-) de interés médico, como primera aproximación a los efectos biológicos de las β – carbolinas.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos y equipos.

Todos los disolventes, reactivos y material fungible y no fungible, así como todos los equipos menos el HPLC, fueron proporcionados por la UISEK (tablas 1 y 2).

Tabla 1. Reactivos.

Nombre	Fórmula	Casa comercial
Cloroformo	CHCl ₃	J. T. Baker
Acetato de etilo	C ₄ H ₈ O ₂	Sigma
Metanol	CH ₄ O	Fermont
Hidróxido de potasio 100%	KOH	Merck
Cloruro de potasio 0,88%	KCl	J. T. Baker
Ácido clorhídrico 2%	HCl	Merck
Sulfato de sodio	Na ₂ SO ₄	BAKER ANALYZED
Cloruro de sodio 10%	NaCl	J. T. Baker
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	J. T. Baker
Cloranfenicol	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	MK
Estádar harmina	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O	Sigma

Tabla 2. Equipos.

Nombre	Modelo	Marca
Licuada Industrial	Teko 40 L	Teko
Refrigeradora	Avant	Indurama
Balanza analítica	PA213	OHAUS
Plancha de calentamiento y agitación	HP88854105	Thermo SCIENTIFIC
Centrífuga	XC-2450	Premiere
Bomba de vacío	R-300	BOECO
pH-metro	ORION STAR A111	Thermo SCIENTIFIC
Espectrofotómetro	DR 5000	HACH
Rotavapor	RE301	Yamato
Autoclave	25X-1	All American
Incubadora	B12	Heraeus INSTRUMENTS
Cámara de luz UV	441203	uvitec
Ultracongelador vertical	Serie NV	FDM
HPLC	Series 200	PerkinElmer

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

El aparato de HPLC y las hojas y tallos de *Bannisteriopsis caapi* fueron proporcionados por BIOX, contraparte en el proyecto de investigación. Se nos proporcionó material vegetal pre molido y secado en condiciones controladas de humedad, temperatura y oscuridad.

Tabla 3. Medios de cultivo

Medio de cultivo	Composición por litro
Agar Cetrimida	Peptona pancreática 20 g; cetrimida 0,3g; cloruro magnésico 1,4g; sulfato dipotásico 10g; agar agar 13,6g; pH final 7,2 ± 0,2.
Agar EMB- Levine	Peptona 10g; lactosa 10g; fosfato dipotásico 2g; eosina 0,4g ; azul de metileno 0,065g; agar 15g; pH final 7,1 ± 0,2.
Caldo nutritivo	Digerido peptónico 5g; cloruro de sodio 5g; extracto de carne 1,5g; extracto de levadura 1,5g; pH final 7,4 ± 0,2.
Agar sangre base + sangre	Digerido enzimático de caseína 15g; digerido enzimático de tejido animal 4g; extracto de levadura 2g; cloruro de sodio 5g; agar 14g; sangre 3mL; pH 7,0 ± 0,2.
Bacto agar	Bacto agar 100%; pH final N/A.
Agar citrato de Simmons	Sulfato de magnesio 0,2g ; fosfato dipotásico 1g ; amonio dihidrógeno fosfato 1g ; citrato de sodio 2g ; cloruro de sodio 5g ; azul de bromotimol 0,08 g ; agar 15g ; pH final 6,9 ± 0,2.
Base agar urea	Urea 20g ; cloruro de sodio 5g ; fosfato de potasio 2g ; dextrosa 1g ; peptona (gelatina) 1g ; rojo fenol 0,012 g ; pH final 6,8 ± 0,2.
Medio SIM	Caseina 20g; digerido enzimático de tejido animal 6,1g; citrato férrico de amonio 0,2g; tiosulfato de sodio 0,2g; agar 3,5g; pH final 7,3 ± 0,2.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparación de materia prima (*B. caapi*)

Con la materia prima inicial, se realizó una segunda molienda de dos formas: manual empleando tijeras, y mecánica empleando una licuadora industrial. La granulometría ha sido uno de los parámetros de la extracción para determinar la optimización del método (**Fig.1**).

2.2.2 Extracción Sólido-líquido

2.2.2.1 Maceración

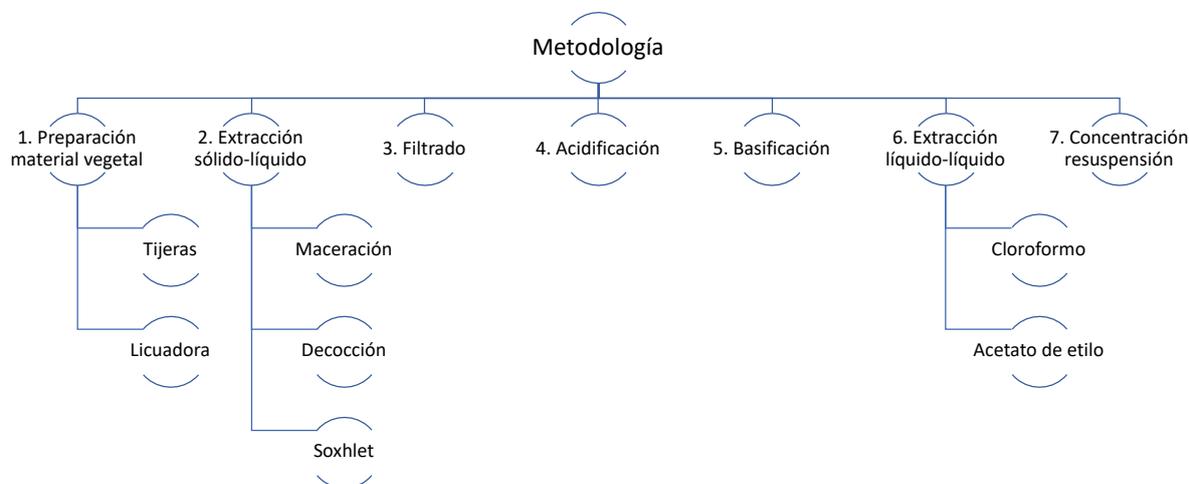


Figura 1. Flujo de trabajo de la extracción de alcaloides de *B. caapi*. Los parámetros a tener en cuenta para la elección del método fueron: granulometría, método de extracción sólido – líquido y disolvente para la extracción líquido - líquido.

El material molido se maceró en metanol en una proporción 1: 5 (p/V) en condiciones de oscuridad a 4 °C durante 72h, en un botellón de vidrio ámbar. Una vez transcurrido el tiempo, se filtró el contenido usando papel filtro de 10 cm de diámetro y 11 µm de poro en varios matraces erlenmeyer de 1000 mL.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

2.2.2.2. Soxhlet

Se empleó un equipo Soxhlet en el que se utilizaron 40 gramos de material vegetal seco y molido y 300 mL de metanol como solvente de extracción. Se colocaron los tallos de la planta en el cartucho y el metanol en el balón que conforma el equipo sobre una plancha de calentamiento a 300 °C. La extracción se realizó en 10 ciclos de reflujo, durante aproximadamente 16 horas.

2.2.2.3. Decocción

Se colocó el material vegetal en una olla junto con agua destilada en una proporción 1:6 (p/v). La olla se calentó con la ayuda de una plancha de calentamiento a 90 °C. El proceso de decocción duró 3 horas. Se dejó enfriar durante 1 hora más y se procedió a filtrar la muestra tal y como se indicó para el proceso de maceración.

Una vez obtenido el producto de la extracción por cualquiera de los tres métodos de extracción sólido – líquido detallados arriba, se realizó una concentración del extracto en el rotavapor a ± 70 °C y 45 rpm. Se concentró el extracto hasta llegar a aproximadamente un tercio de su volumen inicial. El disolvente recuperado se almacenó para su uso en limpieza de materiales o se descartó en contenedores especiales. Finalmente se recuperó el extracto ya concentrado para la siguiente fase.

2.2.3. Acidificación

El extracto concentrado se llevó a pH ácido utilizando ácido clorhídrico (HCl) al 2%. Para ello se midió el volumen del extracto obtenido con el objetivo de agregar el ácido en proporción 1:3 (extracto:HCl). El extracto se colocó en una probeta de 1L para agregar el

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

volumen adecuado de HCl, que se vertió suavemente por las paredes del recipiente. Se dejó precipitar el extracto en refrigeración a 4 °C durante 24 horas. Posteriormente, se centrifugó la muestra en tubos falcon de 500 mL a 500 X g durante 5 minutos para eliminar el máximo de precipitado y facilitar la filtración. Finalmente, se filtró el sobrenadante de la precipitación tal como se realizó en la extracción sólido-líquido.

2.2.4. Basificación

El extracto ya filtrado se pasó a un vaso de precipitación de 1000 mL en el que se colocó un agitador magnético. Agregando gota a gota una solución saturada de KOH se llevó a pH = 10. Al igual que con la acidificación, se dejó precipitar el extracto durante 24 horas a 4 °C, se centrifugó y filtró.

2.2.5. Extracción líquido - líquido

El extracto se colocó en un embudo de decantación de 1000 mL junto con el disolvente orgánico para la extracción. Con el objetivo de escoger el mejor disolvente, se utilizaron dos distintos: acetato de etilo y cloroformo. Ambos disolventes se emplearon en iguales proporciones respecto del extracto acuoso - metanólico. Para una apropiada comparación, ambas extracciones se realizaron a partir de volúmenes equivalentes del mismo extracto acuoso - metanólico. Se añadió el disolvente (acetato de etilo o cloroformo) en proporción 1:3 (v/v) (extracto: disolvente) al embudo de decantación, se agitó vigorosamente durante 1 minuto para poner todo el extracto en contacto con el disolvente, y se dejó decantar durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se observa una clara separación entre la fase con el disolvente que contiene las β -carbolinas y la fase acuosa con el resto de componentes. En el caso del acetato de etilo la fase con el disolvente quedó en la parte superior del embudo mientras que con el

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

cloroformo quedó en la parte inferior debido a las diferencias en la densidad de los dos disolventes. Tomando esto en cuenta se recogió la fase volátil orgánica en una probeta para medir su volumen.

Lavado del extracto orgánico

Con el objetivo de eliminar cualquier impureza o contaminantes de la fase acuosa, el extracto se limpió con KCl al 0,88% en proporción 1:2 (v/v) (KCl:extracto). Se colocó todo en un nuevo embudo de decantación, se agitó durante 1 minuto y se dejó reposar por 15 minutos. Pasado este tiempo se recogió la fase orgánica volátil ya limpia. Posteriormente, se filtró en un embudo con papel filtro que contenía un gramo de Na₂SO₄.

Concentración

La fase orgánica se evaporó hasta el secado en el rotavapor a presión reducida, temperatura inferior a 70 °C, 45 rpm durante aproximadamente 20 min o hasta obtener el extracto seco de alcaloides de *B. caapi*. El extracto seco se reconstituyó en 15 mL de metanol limpio, se trasvasó a viales de vidrio y se almacenó protegido de la luz a – 80 °C.

2.2.6. Caracterización del extracto por espectrofotometría y HPLC

Una primera aproximación a la caracterización y análisis de rendimiento de los extractos, se realizó mediante espectrofotometría. Se hizo un espectro de absorbancia entre 200 – 600 nm y se midió el área bajo la curva correspondiente a los máximos teóricos de absorbancia que según referencias bibliográficas tienen las β – carbolinas (Wang et al., 2010). Los espectros de absorbancia se realizaron por duplicado empleando diluciones 1/500 de los distintos extractos para evitar efectos de saturación en los valores de absorbancia. Para el cálculo del

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

rendimiento de cada método, el área bajo la curva se dividió por la masa de tejido vegetal de partida empleada para la extracción sólido – líquido (**Tabla 6**). A ese valor se le designó como “Área bajo la curva normalizada por unidad de masa de partida” (ANM) y se indica en todos los gráficos de espectrofotometría (**Figuras 2 – 4**).

El análisis de β – carbolinas por HPLC por fase reversa se realizó según describen (Wang et al., 2010). Brevemente, se empleó una columna C18 (Hypersil GOLDTM, ThermoScientific) de 150 mm x 4,6 mm, con tamaño de partícula de 5 μ m. La fase móvil consistió en acetonitrilo con ácido acético (0.1%) (A) y acetato de amonio 50 mM (pH 4.2) (B) aplicado según el siguiente gradiente: 0 – 20 min de 5% A/95% B a 13% A/ 87% B; 20 – 25 min de 13% A/87% B a 22% A/ 78% B; 25 – 30 min de 22% A/78% B a 25% A/ 75% B. Cada corrida fue seguida de 5 min de lavado con 100% acetonitrilo. El periodo de equilibrio fue de 15 min.

2.2.7. Evaluación de acción antibacteriana en cultivo sólido bacteriano

Para la evaluación del efecto antibacteriano del extracto de β – carbolinas, se emplearon cultivos axénicos de dos bacterias distintas de interés médico: *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Ambas son bacterias Gram (-) clasificadas entre las principales responsables de infecciones nosocomiales en pacientes hospitalarios según la OMS (**tabla 4**), (Parker, 1978).

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

Tabla 4. Principales bacterias Gram (-) responsables de infecciones nosocomiales.

Organismo	Patogenicidad
Enterobacteria: <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Escherichia coli</i> enteropatógena	P
Otras clases de <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> - <i>Serratia</i> - <i>Enterobacter</i>	C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , otras <i>Pseudomonas</i>	C
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	C
<i>Acinetobacter</i>	C

P: patógeno “convencional”; causa enfermedades clínicas en personas sanas. C: patógeno “condicional”; causa enfermedades significativas solo en presencia de un factor de predisposición específico. Tomado de REF OMS.

2.2.7.1 Aislamiento e identificación de bacterias

Para la obtención de *Pseudomonas aeruginosa* se tomaron muestras de saliva de dos individuos. En el primer caso se realizó un enjuague con agua con sal al 10% durante 30 segundos y se tomó una muestra del enjuague; de la segunda persona se tomó una muestra de hisopado bucal, sin previo enjuague. Las muestras tomadas con un hisopo estéril fueron plantadas en placas petri preparadas con agar Cetrimide, selectivo para *Pseudomonas aeruginosa*.

Se observaron colonias fluorescentes de color verde azulado en la cámara de luz UV después de una incubación a 35°C durante 24h que se emplearon para la identificación fenotípica.

Se realizaron pruebas de ureasa, catalasa y citrato, para verificar la presencia de *P. aeruginosa*. Todas las pruebas bioquímicas se realizaron siguiendo los métodos citados por (Clarke & Cowan, 1952).

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

Escherichia coli se aisló de una muestra de suelo en agar MacConkey y luego en agar EMB-Levine que es selectivo para bacterias Gram (-) y se emplea para la identificación de coliformes. Tras 24 – 48h de incubación a 35 °C, *E. coli* formó colonias redondas de color verde metálico, en las que se realizaron pruebas de motilidad y catalasa. Los resultados de las pruebas bioquímicas y fenotípicas para *P. aeruginosa* y *E. coli* se muestran en la **tabla 5**.

Tabla 5. Pruebas bioquímicas para *P. aeruginosa* y *E. coli*

Microorganismo	catalasa	motilidad	cittrato	ureasa
<i>Escherichia coli</i>	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+ Unipolar	+	-

Para la confirmación de la identificación fenotípica se realizó una segunda identificación molecular mediante proteómica. Las muestras se enviaron al Centro de Investigación Microbiológica en Guayaquil donde realizaron el procedimiento de MALDI – TOF (*Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*) según sus protocolos de diagnóstico (Hervé et al., 2015). La prueba proteómica confirmó la presencia de *E. coli* y *P. aeruginosa* con una alta probabilidad de identificación a nivel de especie y género (*score* de fiabilidad de identificación del microorganismo 2.333 y 2.440 respectivamente). (**Anexo B**)

2.2.7.2 Antibiogramas

Para evaluar el efecto antibacteriano del extracto de *B. caapi* se realizaron antibiogramas mediante el procedimiento de difusión disco-placa, siguiendo la metodología planteada por Bauer, Kirby et. al. (Bauer, Kirby, Sherris, & Turck, 1966).

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

Para la obtención de las bacterias en las condiciones óptimas para realizar el antibiograma, se inocularon de 3 a 5 colonias de las placas de cultivo axénico de *P. aeruginosa* y *E. coli* en Caldo Nutritivo y se incubaron durante 18 a 24h, tal y como se indica en Herrera, 1999. De este cultivo líquido se sembraron 100 µl en placas de Caldo Nutritivo con agar (15g/L), para obtener un césped de bacterias. Las placas fueron divididas en 6 secciones donde se colocaron los trozos de papel filtro (0,5 cm diámetro) conteniendo 4 concentraciones de extracto (E4) crecientes, así como el control positivo y negativo. El control negativo consistió en metanol mientras que el control positivo consistió en 12 µl de cloranfenicol (30 mg/ml). Las 4 concentraciones distintas de extracto consistieron en 1, 3, 6 y 12 aplicaciones de 25 µl de E4 respectivamente. Tras cada aplicación, se dejó evaporar el metanol en que el extracto estaba disuelto. Tras 36h de incubación a 35°C, se procedió a fotografiar las placas para la cuantificación digital de los halos de inhibición empleando el programa informático Measure 2.0.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

3. RESULTADOS

En la **tabla 6** se especifica el método de extracción, el solvente empleado y la cantidad de materia vegetal empleada para la comparación del mejor método de extracción mediante siete extractos (E1-E7).

Tabla 6. Listado de extractos de *B. caapi*

Extracto (E)	Técnica de extracción	Solvente	Planta	Cantidad
1	Maceración con Metanol	Cloroformo	Tallos cortados	100g
2	Decocción	Cloroformo	Tallos molidos	54g
3	Soxhlet	Cloroformo	Tallos molidos	40g
4	Maceración con Metanol	Cloroformo	Tallos molidos	270 g
5	Maceración con Metanol	Acetato de etilo	Tallos molidos	270 g
6	Maceración con Metanol	Cloroformo	Hojas	20 g
7	Maceración con Metanol	Cloroformo	Tallos molidos	250g

3.1. La granulometría fina y el rendimiento de la extracción

En la **figura 2** se muestran los espectros de absorbancia obtenidos mediante maceración con granulometría grande (a) y granulometría fina (b). El rendimiento por unidad de masa fue casi un 40% mayor con la granulometría fina.

3.2. El método de extracción sólido – líquido más efectivo para la extracción de β – carbolinas de *B. caapi*

El efecto de los distintos métodos de extracción (decocción, maceración y Soxhlet) sobre el rendimiento se muestra en la **figura 3**. El mejor método de extracción sólido – líquido, desde el punto de vista del rendimiento fue el Soxhlet, con un rendimiento 5 veces superior a la maceración y 10 veces superior a la decocción, siendo este último método el menos efectivo. Sin embargo, desde el punto de vista operativo, el Soxhlet es el método más

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

engorroso. Requiere estar todo el rato vigilando y contando el número de reflujos, lo que impide poder realizar otras tareas simultáneamente. Además, requiere la combinación de solventes inflamables con elevadas temperaturas, ya que el metanol no se evapora tan fácilmente como otros solventes empleados habitualmente en el Soxhlet como el éter de petróleo. Esto hace que, además de engorroso, resulte un poco peligroso en comparación con la maceración y la decocción. Por otro lado, no sabemos bien cuál es el efecto de las elevadas temperaturas sobre las propiedades de nuestro extracto de alcaloides. Por todo ello, se decidió emplear el método de maceración para los extractos subsiguientes.

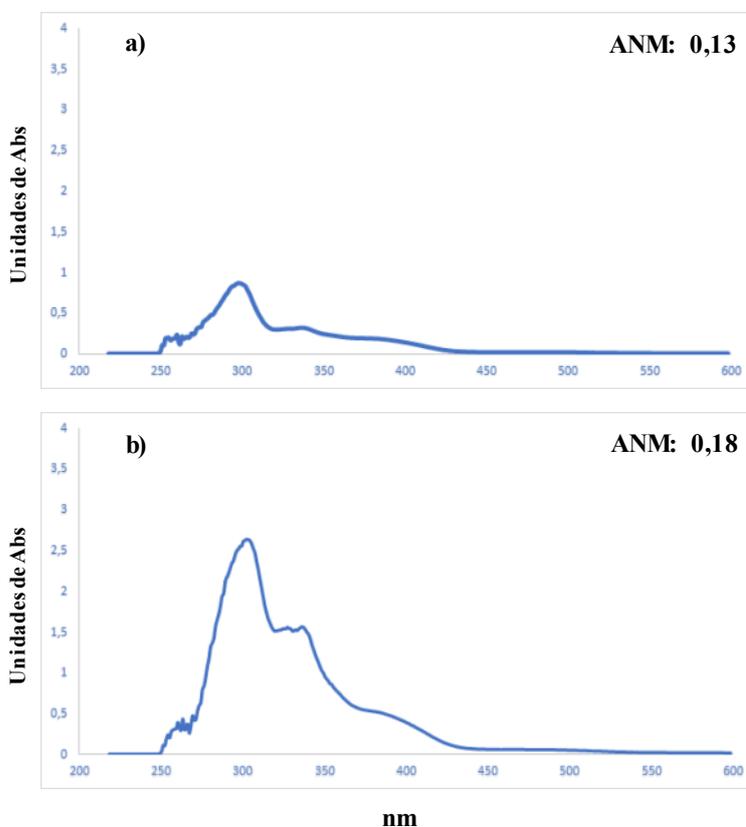


Figura 2. Efecto de la granulometría sobre la extracción de carbolinas de *B. caapi*. a), granulometría grande E1 y b), granulometría fina E3, ambas diluciones 1/500. ANM: área bajo la curva normalizada por unidad de masa de partida.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

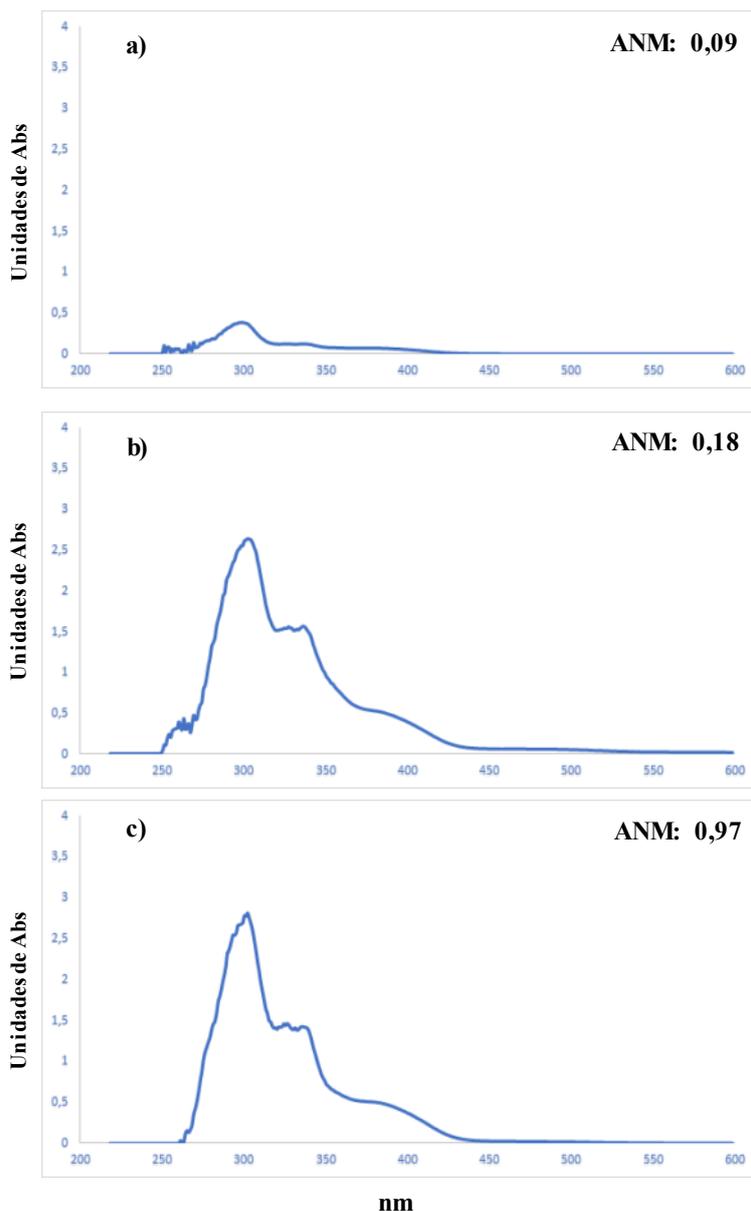


Figura 3. Comparación de los métodos de extracción sólido - líquido en la extracción de carbolinas de *B. caapi*. a), decocción E2; b), maceración E4 y c), Soxhlet E3, todas ellas diluciones 1/500. ANM: área bajo la curva normalizada por unidad de masa de partida.

5.3. El solvente de extracción líquido – líquido y rendimiento

Tanto el cloroformo como el acetato de etilo, ofrecieron rendimientos similares a la hora de extraer los alcaloides de *B. caapi*. Tal y como se indicó en el apartado de materiales y

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

métodos, la extracción con distintos solventes se realizó a partir de volúmenes iguales del mismo extracto acuoso – metanólico, por lo que puede descartarse variabilidad debida a cualquiera de los otros pasos en el procedimiento de extracción.

En la **figura 4**, se muestra que el rendimiento normalizado por unidad de masa fue muy similar para acetato de etilo y cloroformo. El acetato de etilo es un solvente mucho más volátil y menos denso que el cloroformo, así, al quedar por encima del extracto acuoso – metanólico en el embudo de decantación, y decantarlo, arrastraba muchas más impurezas. Por este motivo, se escogió el cloroformo para las extracciones subsiguientes.

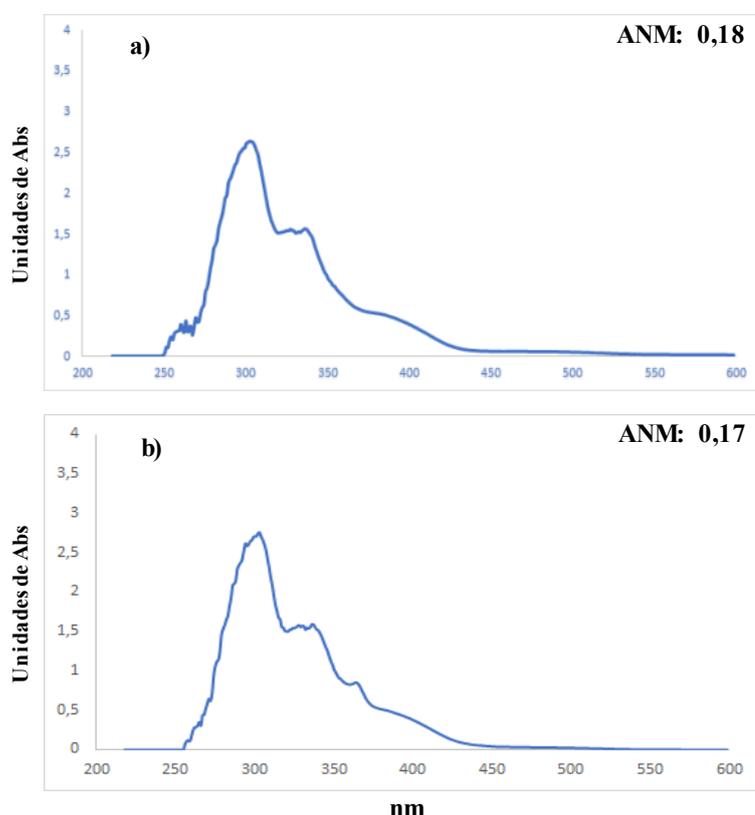


Figura 4. Efecto del solvente sobre la extracción de carbolinas de *B. caapi*. a), cloroformo E4 y b), acetato de etilo E5, ambas diluciones 1/500. ANM: área bajo la curva normalizada por unidad de masa de partida.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

5.4. Caracterización de los extractos por HPLC

En la **figura 5a** se muestra el cromatograma obtenido por HPLC a 367 nm. El tiempo de retención del pico detectado coincide tanto con el del estándar comercial de harmina (**b**) como con el obtenido por otros autores (Wang et al., 2010). Podemos concluir que es el pico correspondiente a esta β - carbolina. Al analizar el extracto por HPLC a 293 nm (**c**), que es el máximo de absorbancia para tetrahydroharmina (THH), apareció un pico bien definido que coincidía con el tiempo de retención (≈ 26 min) para THH esperado para este alcaloide. (Wang et al., 2010).

En la cromatografía del extracto de las hojas de *B. caapi* (**Fig. 6**) se observaron picos fantasmas y retrasos en los tiempos de retención respecto de los primeros cromatogramas y del artículo de referencia (Wang et al., 2010). Por esta razón, los análisis realizados con posterioridad y que corresponden al estándar de harmalina y a los extractos obtenidos de otra variedad de *B. caapi* (imágenes adicionales, **Anexo A**), no ofrecen todas las garantías necesarias, por lo cual no son incluidos esos análisis.

En cuanto a las hojas (**Fig. 6**), el espectro de absorbancia (**a**) mostró muy poco rendimiento en la zona correspondiente a las β - carbolinas (7 veces menos que la maceración en metanol de tallos, E4), y el cromatograma no muestra correspondencia con el obtenido en el extracto E4, no pudiéndose identificar ningún pico correspondiente a β - carbolinas. Además del bajo rendimiento y la ausencia de picos identificables, existe la sospecha de que los pigmentos fotosintéticos de este extracto fueron los responsables de la saturación e inutilización de la columna de HPLC. Por eso, se decidió descartar las hojas para futuros estudios.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

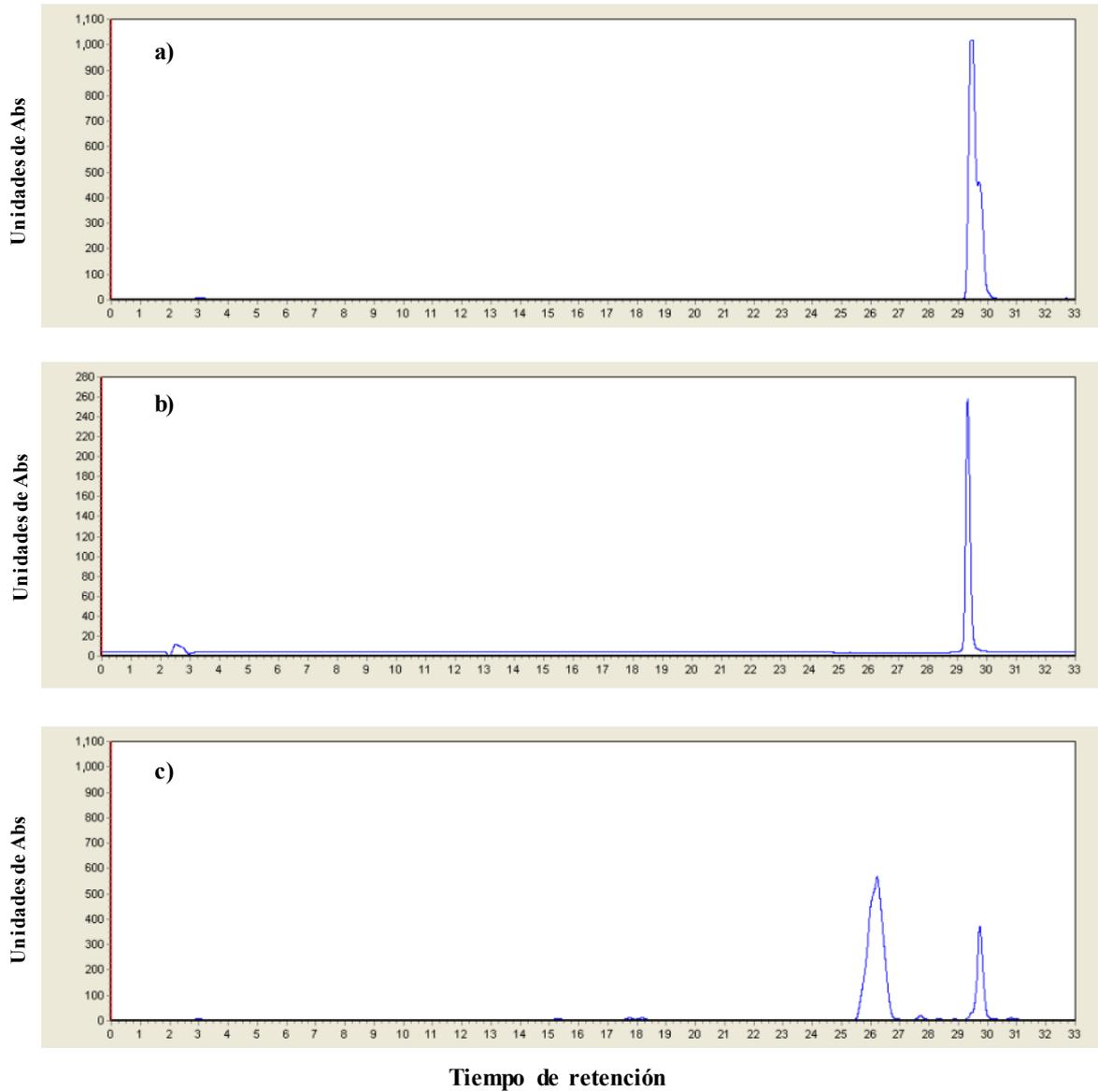


Figura 5. Identificación de harmina por HPLC. a), extracto E4 a 367 nm; b), estándar de harmina a 367 nm y c), extracto E4 a 293 nm.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

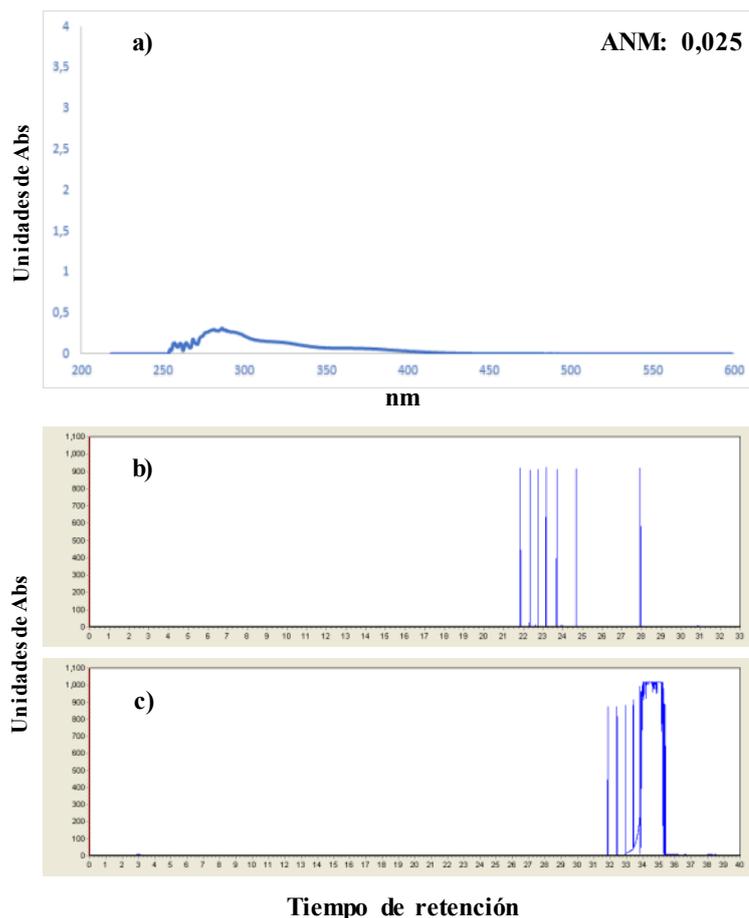


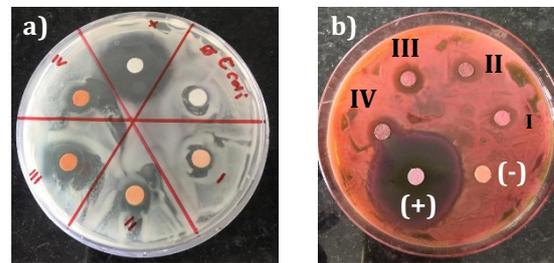
Figura 6. Caracterización del extracto de carbolinas de hojas (E6) de *B. caapi*. a), espectro de absorbancia 200 – 600 nm dilución 1/100; b) extracto E6 a 293 nm y c), extracto E6 a 367 nm.

5.6. Actividad antibacteriana del extracto de tallos de *B. caapi*

En la **figura 7** se muestran los antibiogramas realizados para medir el efecto del extracto de *B. caapi* sobre el crecimiento de las bacterias *E. coli* y *P. aeruginosa*. Se escogió el extracto E4 al ser el extracto correctamente caracterizado por HPLC y el que cumplía con las condiciones metodológicas de extracción seleccionadas: tallos como fuente, granulometría fina, maceración en metanol como método de extracción sólido – líquido y cloroformo como solvente de extracción líquido – líquido. Tal y como se aprecia en las imágenes (a) y (b) y en

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

la tabla (c), hubo una inhibición del crecimiento dependiente de la dosis, que fue bastante mayor para *E. coli* que para *P. aeruginosa*.



c)

Disco	<i>E. coli</i> D (mm)	<i>P. aeruginosa</i> D (mm)
C +	30,4	51,1
C -	7,7	9,8
I	9,8	12,2
II	13,0	13,7
III	18,5	16,9
IV	14,6	16,3

Figura 7. Efecto del extracto E4 sobre el crecimiento de *E. coli* y *P. aeruginosa*. a), antibiograma *E. coli*; b), antibiograma *P. aeruginosa*; c) cuantificación del diámetro de los halos de inhibición.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

4. DISCUSIÓN

Se logró la optimización del método de extracción de β – carbolinas de *B. caapi* desde el rendimiento por unidad de masa vegetal, y por operatividad.

No obstante que, el método de extracción sólido – líquido más efectivo fue el Soxhlet, se escogió la maceración en metanol por las siguientes razones: 1.- ofreció unos rendimientos bastante elevados, al comparar con la bibliografía de referencia (Wang et al., 2010); 2.- fue el método más sencillo (solo requiere introducir el metanol con la materia vegetal en un botellón en la refrigeradora) y al no requerir supervisión, permite trabajar en otras actividades de simultáneamente. Adicionalmente, permite realizar varias extracciones simultáneas.; 3.- a diferencia del Soxhlet, opera a bajas temperaturas, lo que permite conservar mejor los componentes del extracto. Así, una de las razones para descartar el Soxhlet, fue que no conocíamos el efecto que las temperaturas elevadas, durante largos periodos de tiempo, podían tener sobre nuestros compuestos de interés. La decocción, además de por su bajo rendimiento, se descartó por cuestiones de operatividad y por la necesidad de emplear elevadas temperaturas.

Entre los solventes disponibles para la extracción, acetato de etilo y cloroformo, escogimos el segundo al ofrecer prácticamente el mismo rendimiento, pero sin ninguno de sus inconvenientes. El cloroformo, a diferencia del acetato de etilo, no está controlado por el Ministerio de Interior, por lo que su gestión es mucho más sencilla. Adicionalmente, al ser menos denso que el extracto acuoso – metanólico, se sitúa en la fase superior durante la extracción líquido – líquido. Esto implica que debe descartarse la fase inferior y luego decantar

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

la fase superior a través de la misma boquilla del embudo de decantación, y esto provoca el arrastre de componentes de la fase acuosa – metanólica y, por tanto, mayor contaminación.

Mediante HPLC de fase reversa y empleando el estándar comercial de harmina se pudo identificar el pico correspondiente a este alcaloide al menos en el extracto E4 (**Fig. 4**). Aunque no se pudo realizar la recta patrón que nos sirviera para la cuantificación absoluta de la harmina, la concentración del estándar comercial que empleamos correspondió al punto de mayor concentración de la recta empleada por los autores de nuestro artículo de referencia (Wang et al., 2010). El área bajo la curva de nuestro extracto E4 (dilución 1/10) para el pico de harmina, fue bastante superior al del pico del estándar, por lo que podemos concluir que las concentraciones de harmina en nuestro extracto son bastante elevadas (**Fig. 5**).

Tal y como se ha comentado anteriormente, no se pudieron terminar todas las caracterizaciones debido a que se estropeó la columna, probablemente debido a la presencia de pigmentos fotosintéticos en el extracto de hojas de *B. caapi*. Aunque no se dispuso del estándar de THH comercial, sí pudimos identificarlo de manera indirecta. Al cambiar la longitud de onda del detector del HPLC de 367 nm (máximo de absorbancia de harmina) (**Fig. 5a**) por 293 nm (máximo de absorbancia de THH), apareció un pico completamente nuevo (**Fig.5c**), de intensidad similar al de harmina, y que coincidió con el tiempo de retención esperado para THH (Wang et al., 2010). Como ya se ha señalado, el cromatograma de E4 está muy limpio, sin contaminantes, por lo que creemos que se puede emplear para la evaluación de sus efectos biológicos sobre bacterias, parásitos y líneas cancerígenas.

Para un análisis funcional del extracto, se pensó en analizar la capacidad IMAO de nuestro extracto, puesto que ésta es la primera función y efecto descrito de las β – carbolinas (D J McKenna, Towers, & Abbott, 1984). Sin embargo, los kits comerciales se basan en la

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

detección de productos fluorescentes o radiactivos y nuestras instalaciones no cuentan con fluorímetro ni contador de centelleo, por lo que tuvimos que descartarlo. A pesar de ello, sí quisimos analizar alguna actividad biológica de nuestro extracto y decidimos evaluar la actividad antibacteriana. Para ello se seleccionó el extracto E4 por los motivos que anteriormente se han descrito, y se emplearon *E. coli* y *P. aeruginosa* por su importancia como patógenos nosocomiales (Parker, 1978). Tal y como se mostró en el apartado de resultados, el extracto E4 tuvo un efecto inhibitorio que alcanzó aproximadamente el 50% del logrado por el control positivo cloranfenicol. Para *P. aeruginosa*, la inhibición fue de en torno al 30% de la obtenida por el cloranfenicol. En ambos casos (**Fig. 7-c**) la inhibición fue dosis dependiente. Hace falta lograr céspedes de bacterias más homogéneos, que confirmen lo observado en este trabajo, y probar el efecto sobre más especies de bacterias, en concreto alguna bacteria Gram (+) de interés sanitario.

Los resultados nos permiten afirmar que nuestro extracto de *B. caapi* mantiene sus propiedades antibacterianas y, por tanto, no existe motivo para pensar que hubiera perdido el resto de propiedades biológicas de interés para este proyecto. Por supuesto, hacen falta estudios que acrediten el efecto antiparasitario y anticancerígeno del extracto, que se abordarán en las siguientes etapas del proyecto.

En una siguiente fase se analizarán extractos de otra variedad de *B. caapi*, ya que mezclas con distintas proporciones o incluso distintas β – carbolinas, podrían tener efectos biológicos distintos que ayudaran a distinguir las propiedades individuales de cada alcaloide.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

5. CONCLUSIONES

- El método de elección para futuras extracciones incluye: granulometría fina, maceración en metanol como método de extracción sólido – líquido y cloroformo como solvente de extracción líquido – líquido.
- El extracto de ayahuasca así obtenido, presentó una pureza adecuada y una concentración elevada de las β – carbolinas de interés para este proyecto, manteniendo actividad biológica contra bacterias.

6. RECOMENDACIONES

- Para evitar estropear la columna C18 de fase reversa deben tenerse en cuenta las siguientes recomendaciones:
 - Diluir más todos los extractos antes de correrlos en el HPLC para evitar la saturación de la columna
 - Evitar extractos vegetales con elevadas concentraciones de pigmentos fotosintéticos
 - Implementar protocolos de limpieza exhaustivos tras cada corrida
- Correr siempre los estándares en primer lugar, incluyendo las rectas patrón, de tal manera que, aunque se estropee la columna, se pueda realizar la cuantificación absoluta de los picos de interés.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493–496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493
- Cao, R., Peng, W., Wang, Z., & Xu, A. (2007). B-Carboline Alkaloids: Biochemical and Pharmacological Functions. *Current Medicinal Chemistry*, 14(4), 479–500. <https://doi.org/10.2174/092986707779940998>
- Clarke, P. H., & Cowan, S. T. (1952). Biochemical methods for bacteriology. *Journal of General Microbiology*, 6(1–2), 187–197. <https://doi.org/10.1099/00221287-6-1-2-187>
- Costa-Neto, E. M. (2005). Animal-based medicines: Biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 77(1), 33–43. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652005000100004>
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303–336. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>
- Guimarães, R., & Santos, D. (2010). the Pharmacology of Ayahuasca : a Review. *Brasília Med*, 47(2), 188–195.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1–93. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
- Hervé, B., Corvalán, V., Hormazábal, S., Salas, A., Cabezas, C., Badilla, N., ... Fuente, D. (2015). Utilización de espectrometría de masas para la identificación precoz de hemocultivos positivos. *Validación de un algoritmo local*. 32(4), 399–402.
- Malagón, O., Ramírez, J., Andradea, J. M., Morochoa, V., Armijosa, C., & Gilardoni, G. (2016). Phytochemistry and Ethnopharmacology of the Ecuadorian Flora. A Review. *Natural Product Communications*, 11(3), 297–314. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27169178>
- McKenna, D J, Towers, G. H., & Abbott, F. (1984). Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: tryptamine and beta-carboline constituents of ayahuasca. *Journal of Ethnopharmacology*, 10(2), 195–223. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6587171>
- McKenna, Dennis J. (2004). Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: Rationale and regulatory challenges. *Pharmacology and Therapeutics*, 102(2), 111–129. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.03.002>
- McKenna, Dennis J., Towers, G. H. N., & Abbott, F. (1984). Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: Tryptamine and β -carboline constituents of Ayahuasca. *Journal of Ethnopharmacology*, 10(2), 195–223. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(84\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(84)90003-5)
- Morales-García, J. A., de la Fuente Revenga, M., Alonso-Gil, S., Rodríguez-Franco, M. I., Feilding, A., Perez-Castillo, A., & Riba, J. (2017). The alkaloids of *Banisteriopsis caapi*, the plant source of the Amazonian hallucinogen Ayahuasca, stimulate adult neurogenesis in vitro. *Scientific Reports*, 7(1), 5309. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05407-9>
- MSP Ecuador. (2013). *Prioridades de investigación en salud, 2013-2017*. Retrieved from

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

http://www.investigacionsalud.gob.ec/wp-content/uploads/2016/10/PRIORIDADES_INVESTIGACION_SALUD2013-2017-1.pdf

MSP Ecuador. (2016). *Lineas de Investigación INSP*. Retrieved from http://www.investigacionsalud.gob.ec/wp-content/uploads/2016/10/linas_de_investigacion_inspi.pdf

Newman, D., & Cragg, G. (2012). Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, 75, 311–335. <https://doi.org/10.1021/np200906s>

O'Neill, J. (2016). *Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Pan, S.-Y., Zhou, S.-F., Gao, S.-H., Yu, Z.-L., Zhang, S.-F., Tang, M.-K., ... Ko, K.-M. (2013). New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2013, 627375. <https://doi.org/10.1155/2013/627375>

Parker, M. T. (1978). *Hospital-acquired infections: Guidelines to laboratory methods*. (4). <https://doi.org/10.1136/jcp.32.8.858-c>

Serrano-Dueñas, M. (2001). EFFECTS OF BANISTERIOPSIS CAAPI EXTRACT ON PARKINSON'S DISEASE. In *Neurology Service of Carlos Andrade THE SCIENTIFIC REVIEW OF ALTERNATIVE MEDICINE* (Vol. 5).

Shirakawa, J., & Kulkarni, R. N. (2016). Novel factors modulating human β -cell proliferation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 18, 71–77. <https://doi.org/10.1111/dom.12731>

Wang, Y.-H., Samoylenko, V., Tekwani, B. L., Khan, I. A., Miller, L. S., Chaurasiya, N. D., ... Muhammad, I. (2010). Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(3), 662–671. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2010.02.013>

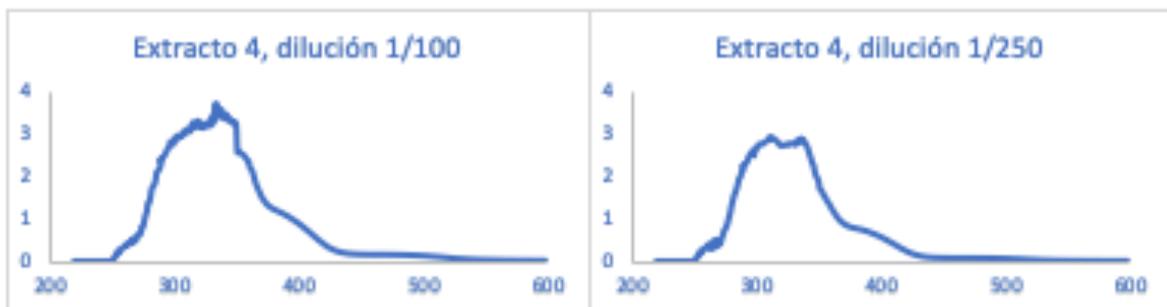
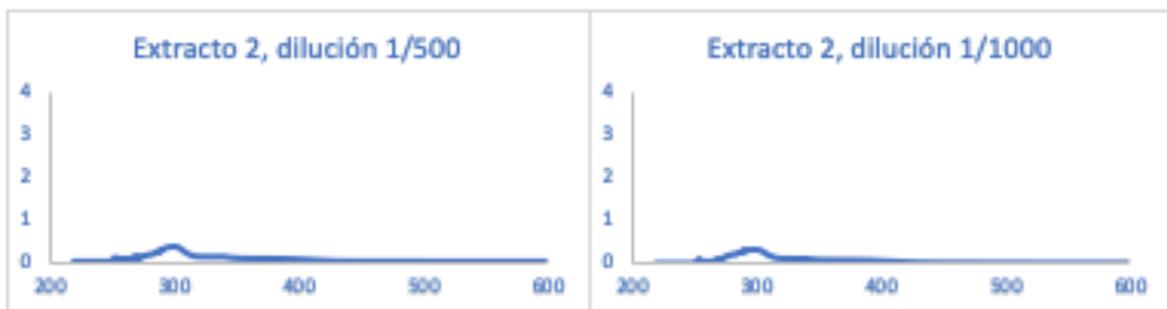
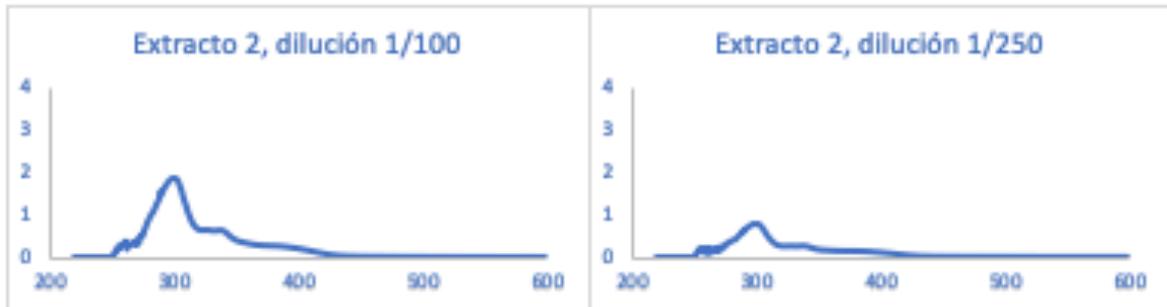
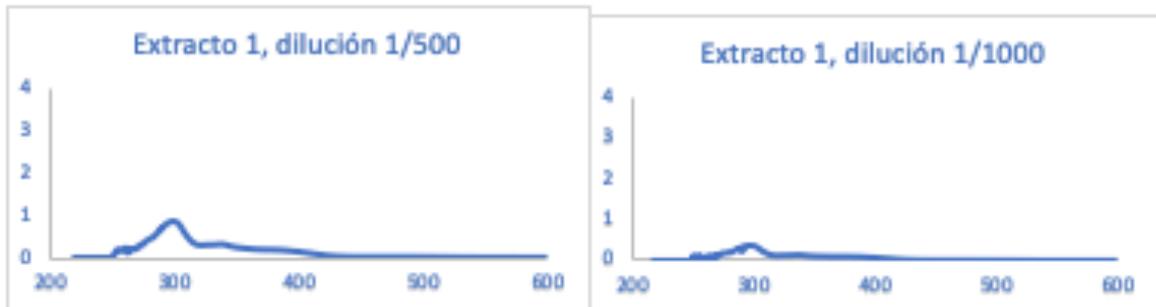
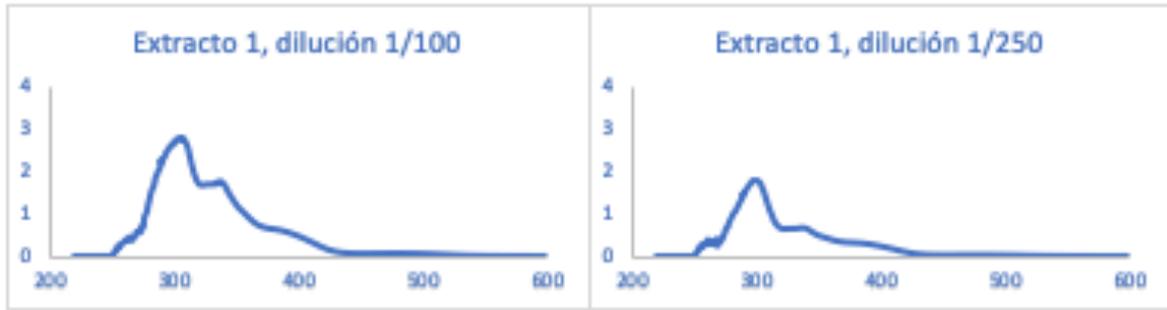
Youdim, M. B. H. (2018). Monoamine oxidase inhibitors, and iron chelators in depressive illness and neurodegenerative diseases. *Journal of Neural Transmission*, 125(11), 1719–1733. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1942-9>

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

ANEXOS

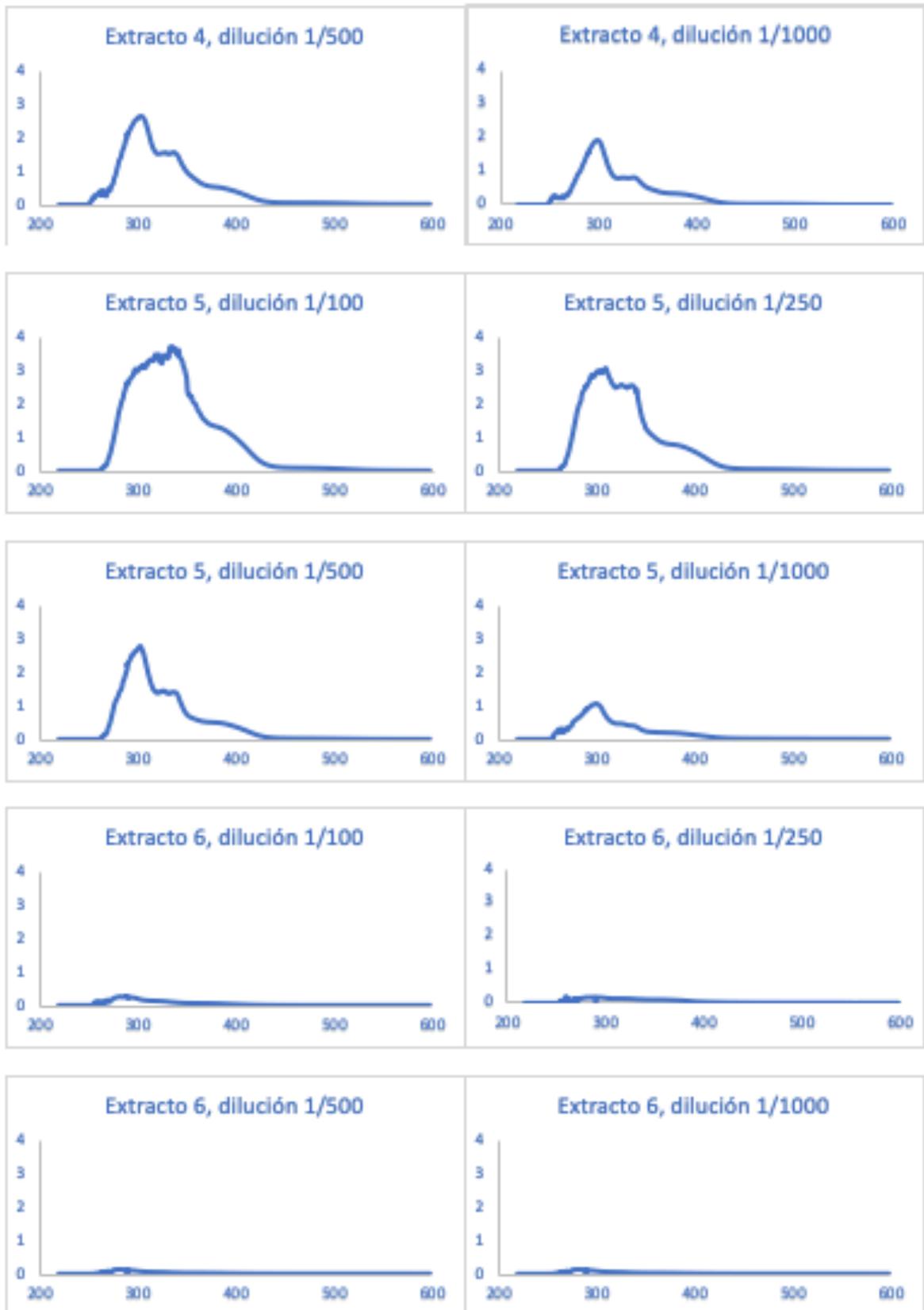
OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

ANEXO A



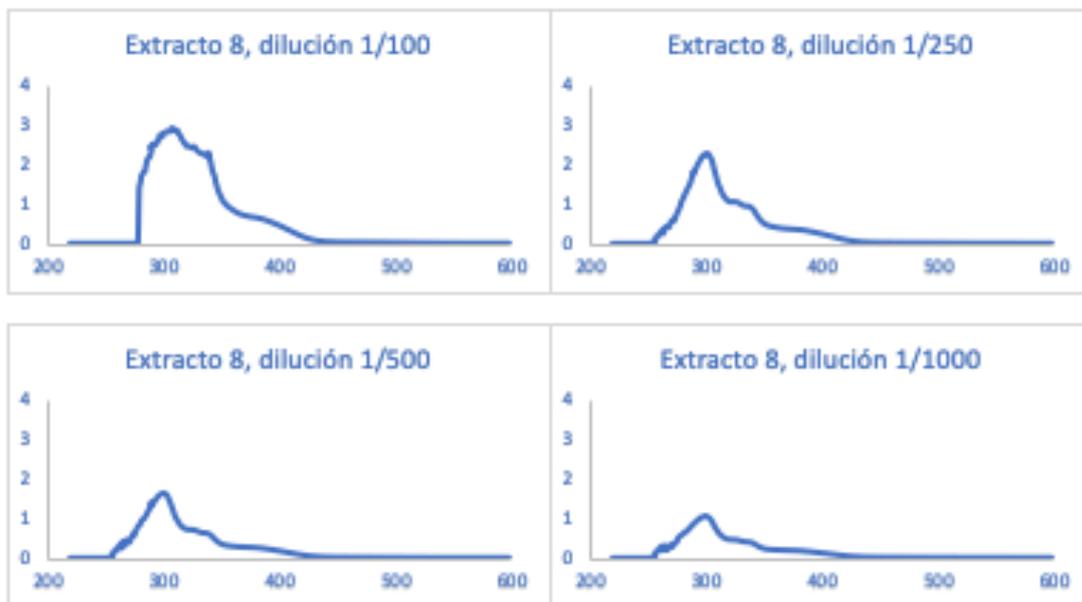
OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

ANEXO A



OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

ANEXO A



OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE B-CARBOLINAS A PARTIR DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU POSTERIOR APLICACIÓN EN MODELOS CELULARES CON FINES TERAPÉUTICOS.

ANEXO B



Córdova 603 y Mendiburu
Edificio K1 1er piso of. 1
Telf.: 042309179 - 042300967
- 042313696 - 042561019
microbiologia_hp@yahoo.es
Guayaquil - Ecuador

Fecha de ingreso de Muestra: 20-nov-19
Fecha de reporte: 21-nov-19

Paciente:

SOLICITADO POR: LINO ARISQUETA
TIPO DE MUESTRA : CEPAS
CODIGO: 191120

IDENTIFICACION DE BACTERIAS POR MALDI TOF

CEPA ENVIADA	IDENTIFICACION	SCORE
PA IV	<i>PSEUDOMONAS aeruginosa</i>	2.440
PA III	<i>PSEUDOMONAS aeruginosa</i>	2.165
EMB	<i>ESCHERICHIA coli</i>	2.333
NARIZ CORONA	<i>MYCOBACTERIUM esteraromaticum</i> <i>BACILLUS cereus</i>	2.330 1.999
ESPINILLAS ANAEROBIO AA02	<i>BACILLUS subtilis</i>	2.001
ESPINILLAS AA02 III	<i>ESCHERICHIA coli</i> <i>BACILLUS licheniformis</i>	2.288 2.363

SCORE de fiabilidad de identificación del microorganismo: Las puntuaciones de 2.300 a 3.000 significan una alta probabilidad de identificación a nivel de especie. De 2.000 a 2.299, identificación segura a nivel de género y probable a nivel de especie. De 1.700 a 1.999, identificación probable de género. De menos de 1.699, identificación no fiable.

Dr. Henry Ferrer Vera
Microbiólogo
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
MICROBIOLÓGICAS
Dr. Henry Ferrer
REG. SANT. 4861
MICROBIÓLOGO

Experiencia que genera confianza.