



**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS**

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“EFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS  
CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae*”**

Realizado por:

**Paige Nicole Saavedra Guerra**

Director del proyecto:

PhD. Lino Arisqueta Herranz

Como requisito para la obtención del título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

Quito, 11 de mayo de 2021

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

**DECLARACIÓN JURAMENTADA**

Yo, PAIGE NICOLE SAAVEDRA GUERRA, con cédula de identidad 1004085021, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o 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.



Paige Nicole Saavedra Guerra

C.I. 1004085021

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

**DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**“EFECTO DE LAS B-CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae*”**

**PAIGE NICOLE SAAVEDRA GUERRA**

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



PhD. Lino Arisqueta Herranz

DIRECTOR

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

**LOS PROFESORES INFORMANTES**

Los profesores informantes:

**RUBÉN RAMÍREZ**

**ALBERTO AGUIRRE**

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



PhD. Rubén Ramírez

REVISOR



PhD. Alberto Aguirre

REVISOR

Quito, 11 de mayo de 2021

# **EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, porque por su sacrificio, amor y dedicación conmigo puedo alcanzar este sueño.

A mis hermanos y sobrina por darme ánimos y ser mis compañeros de aprendizaje de vida.

A ustedes abuelitos Marthita y Efrén por su amor incondicional y puro.

A mi amor, Álvaro, por enseñarme a amar y demostrarme el lado bonito de la vida, es valioso tener un compañero con quien compartir lo bueno y lo malo.

A ti Kathe, porque contigo la universidad fue una etapa que nunca olvidaré, gracias amiga.

A mis profesores, especialmente a Lino, por la paciencia, por enseñarme a ser ingeniera en Biotecnología y a disfrutar lo que hago.

Sin ustedes y sus enseñanzas no hubiese logrado ser ingeniera en Biotecnología y no hubiese podido ser el humano en el que me he convertido. Todas mis virtudes son gracias a todas estas personas que siempre llevo en mi corazón. Gracias.

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación

**Evaluación de los efectos**

**biológicos de las  $\beta$  – carbolinas de *Banisteriopsis caapi* en modelos celulares**

Y con el financiamiento de

**Universidad Internacional SEK**

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

11/05/2021

Para someter a:

To be submitted:

**Efecto de las  $\beta$  – carbolinas de *B. caapi* sobre las cepas bacterianas *E. faecalis* y *K. pneumoniae***

Paige Saavedra<sup>1</sup>, Lino Arisqueta Herranz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Quito, Ecuador. 11/05/2021

\*AUTOR DE CORRESPONDECIA: Lino Arisqueta Herranz, PhD. Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas Quito, Ecuador.

Teléfono: +593-983104230; email: [lino.arisqueta@uisek.edu.ec](mailto:lino.arisqueta@uisek.edu.ec)

Título corto o Running title: Efecto de las  $\beta$  – carbolinas de *B. caapi* sobre cepas bacterianas

# EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae*

## Resumen

Las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis* son patógenos responsables de varias enfermedades mortales para el ser humano como la neumonía y endocarditis, y animales importantes en la industria alimenticia como las aves de corral. El tratamiento de primera línea para combatir estas enfermedades han sido los antibióticos como la ampicilina y levofloxacina, sin embargo, debido al uso excesivo y mal manejo de estos medicamentos las bacterias han generado resistencia a estos antibacterianos. Por lo que el desafío al que se enfrenta la ciencia en la actualidad es encontrar nuevas alternativas basadas en principios activos naturales de plantas. Una de las plantas que ha llamado la atención por su contenido de alcaloides  $\beta$  – carbolínicos como la harmina es *Banisteriopsis caapi*, una de las dos plantas con las que se prepara la bebida indígena tradicional y famosa ayahuasca.

Por lo que, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antibacteriano de extractos de  $\beta$  – carbolinas obtenidos de la planta *B. caapi* en *K. pneumoniae* y *E. faecalis* a través de la técnica de microdilución en caldo. Primero se caracterizó cualitativa y cuantitativamente los extractos mediante HPLC de fase reversa y después de realizo microdilución en caldo para estimar las  $IC_{50}$  y los porcentajes de inhibición de cada uno de los extractos. Efectivamente se observó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las dos bacterias, sin embargo, el extracto más potente para *K. pneumoniae* fue el E9 (15,353  $\mu$ M) y E8 para *E. faecalis* (26,50  $\mu$ M) y el más eficaz para las dos bacterias fue E3. La variante antigua (E3 y E9) presentó un mayor efecto antibacteriano que la nueva. Sin embargo, hacen falta más estudios relativos a los mecanismos que analicen la mutagénesis y el daño estructural en el ADN de las bacterias tratadas con extractos de *B. caapi*.

**Palabras clave:**  $\beta$  –carbolinas, *Banisteriopsis caapi*, patógenos, extractos, harmina

# EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae*

## Abstract

The bacteria *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis* are pathogens responsible for several deadly human diseases such as pneumonia and endocarditis, and important animals in the food industry such as poultry. The first-line treatment to combat these diseases has been antibiotics such as ampicillin and levofloxacin, however, due to the excessive use and mismanagement of these drugs, bacteria have generated resistance to these antibacterials. Therefore, the challenge facing science today is to find new alternatives based on natural active principles of plants. One of the plants that has attracted attention for its content of  $\beta$ -carboline alkaloids such as harmine is *Banisteriopsis caapi*, one of the two plants with which the traditional and famous indigenous drink ayahuasca is prepared.

Therefore, the objective of this work was to evaluate the antibacterial effect of extracts of  $\beta$ -carbolines obtained from the *B. caapi* plant in *K. pneumoniae* and *E. faecalis* through the broth microdilution technique. First, the extracts were characterized qualitatively and quantitatively by means of reversed phase HPLC and afterwards, microdilution was carried out in broth to estimate the IC<sub>50</sub> and the inhibition percentages of each of the extracts. Indeed, an inhibitory effect was observed on the growth of the two bacteria, however, the most potent extract for *K. pneumoniae* was E9 (15.353  $\mu$ M) and E8 for *E. faecalis* (26.50  $\mu$ M) and the most effective for the two bacteria was E3. The old variant (E3 and E9) presented a greater antibacterial effect than the new one. However, more studies are needed regarding the mechanisms that analyze mutagenesis and structural damage in the DNA of bacteria treated with extracts of *B. caapi*.

**Keywords:** beta-carbolines, *Banisteriopsis caapi*, pathogens, extracts, harmine

# EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae*

## 1. INTRODUCCIÓN

La introducción de los antibióticos en la práctica clínica en el siglo XX disminuyó significativamente la tasa de mortalidad de la población en todo el mundo y las pérdidas económicas producidas por muertes de animales de interés en la industria alimenticia. De hecho, tres premios Nobel de Medicina y Fisiología, de los años 1939, 1945 y 1952, lo son por descubrimientos de antibacterianos (Alós, 2015). Los antibióticos han salvado millones de vidas y han revolucionado la medicina contribuyendo significativamente al progreso en campos como los trasplantes de órganos, la cirugía de material protésico y los catéteres vasculares, donde las infecciones son especialmente prevalentes e importantes (Pagalilauan & Limaye, 2013). Sin embargo, una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos, la resistencia bacteriana a los antibióticos, definida como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de un antibiótico que inhibe o mata a otras de la misma especie (Alós, 2015). Es preciso señalar que al poco tiempo de introducirse la penicilina en la práctica clínica la gran mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* eran sensibles a este antibacteriano, sin embargo, actualmente lo son menos del 5-10% (European Center for Disease Prevention and Control, n.d.). Las infecciones causadas por bacterias resistentes se asocian a una mayor morbilidad, mortalidad y coste de tratamiento que las causadas por bacterias sensibles de la misma especie (Falagas et al., 2014).

Los antibióticos son el principal tratamiento para patologías infecciosas. Estas infecciones provocadas por microorganismos resistentes a los antibióticos (ORAs) pueden ser consideradas como una infección emergente, ya que su tratamiento es cada vez más limitado y tienen el potencial de afectar a todas las personas en el mundo, tanto en países ricos como aquellos que están en vías de desarrollo (Rocha et al., 2015). Según cálculos del Centro para la Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), los ORAs causan 2

## **EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

millones de infecciones y 23 000 muertes solo en los Estados Unidos cada año, con un impacto económico de \$35 millones adicionales de gastos en salud (Lahsouné et al., 2007).

La creciente resistencia de los microorganismos a estos agentes ha ocasionado un problema de amplias dimensiones y representa en la actualidad un reto terapéutico. Es por esto que la estrategia ha sido continuar la búsqueda de nuevos antibióticos naturales (Rocha et al., 2015).

### ***1.1 Banisteriopsis caapi***

El extracto vegetal de una planta contiene numerosos metabolitos secundarios con diferentes variaciones estructurales que representan un depósito de moléculas farmacológicas a ser descubiertas (Hostettmann et al., 2018). Muchos de los fármacos sintetizados a partir de las plantas siguen teniendo una destacada posición pese al increíble desarrollo de la síntesis, la química combinatoria y los procesos biotecnológicos de fermentación microbiana (Yang et al., 2012).

Una de las plantas que ha llamado la atención de varios científicos por su contenido de alcaloides que pueden ser usados con fines terapéuticos es *Banisteriopsis Caapi*. *Banisteriopsis* es un género de plantas tropicales sudamericanas con 92 especies distribuidas principalmente en Brasil, Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú. *B. caapi* es un ingrediente de la popular bebida sagrada y psicoactiva Ayahuasca que se usa ampliamente para la profecía, adivinación y como sacramento en la parte norte de América del Sur. Investigaciones químicas anteriores han informado de la presencia de alcaloides carbolínicos (CA): harmina, harmalina y tetrahydroharmina (THH) como los principales inhibidores de la MAO, una enzima que cataliza la oxidación de monoaminas y la degradación de neurotransmisores como la serotonina, noradrenalina y dopamina (Samoylenko et al., 2010).

## **EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

Los alcaloides de origen vegetal son de especial interés por su actividad antimicrobiana y su uso en la medicina moderna (Wink y Schmeller, 1998). Según Najma et al (2008) los alcaloides  $\beta$  - carbolínicos presentan actividad antimicrobiana frente a determinadas cepas de bacterias resistentes a antibióticos e importantes protozoos de aves de corral.

Lo antes mencionado, ahonda la necesidad de buscar y evaluar nuevos principios activos de origen natural, aprovechando la enorme diversidad del Ecuador, y con el objetivo de diseñar nuevas alternativas terapéuticas que ataquen a las bacterias resistentes responsables de varias pérdidas económicas en la industria animal y alimenticia, y de miles de vidas de seres humanos en todo el mundo.

### ***1.2 Enterococcus faecalis***

La bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis* es un habitante natural del tracto gastrointestinal de los mamíferos y se encuentra comúnmente en el suelo, las aguas residuales, el agua y los alimentos, frecuentemente a través de la contaminación fecal. *E. faecalis* puede resistir el estrés oxidativo, la desecación y los extremos de temperatura y pH, y tiene una alta resistencia endógena a la salinidad, los ácidos biliares, los detergentes y los antimicrobianos (Klare et al., 2001). Pueden adaptarse a vivir en los ambientes más hostiles, incluso en presencia de niveles letales de sales biliares y detergentes, tales como el dodecil sulfato de sodio (SDS) (Flahaut et al., 1996).

*E. faecalis* es un patógeno oportunista y es una de las principales causas de infecciones del tracto urinario, bacteriemia y endocarditis infecciosa (Tailor et al., 1993). La resistencia intrínseca de *E. faecalis* a muchos antibióticos y su adquisición de resistencia a otros agentes antimicrobianos, en particular a la vancomicina, que se utiliza para tratar infecciones graves por patógenos Grampositivos resistentes a fármacos, ha llevado a la aparición de *E. faecalis* como

## **EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

patógeno nosocomial que es refractario a la mayoría de las opciones terapéuticas (Paulsen et al., 2003).

El Sistema Nacional de Vigilancia de las Infecciones Nosocomiales de Estados Unidos (NNIS) ha considerado al género *Enterococcus* como la tercera causa más frecuente de infecciones nosocomiales, siendo estas bacterias las responsables de más del 10 % de todas las infecciones adquiridas en los hospitales (Pérez et al., 2010).

La tolerancia a detergentes de *E. faecalis* podría haber hecho que este microorganismo sobreviva a procedimientos de desinfección y limpieza que matan otras bacterias, haciéndolo más persistente en los hospitales y aumentando las enfermedades nosocomiales asociadas al mismo. Numerosos estudios epidemiológicos han mostrado que estos microorganismos pueden transmitirse de una persona a otra en el hospital por instrumentos clínicos o a través de las manos de los trabajadores de la salud (Flahaut et al., 1996).

### ***1.3 Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* es un bacilo Gramnegativo fermentador de lactosa, miembro de la familia Enterobacteriaceae. Es un patógeno oportunista que se encuentra ampliamente en la boca, la piel y los intestinos, así como en entornos hospitalarios y dispositivos médicos, afectando principalmente a quienes tienen el sistema inmunológico comprometido o que están debilitados por otras infecciones. La colonización del tracto gastrointestinal por *K. pneumoniae* generalmente ocurre antes del desarrollo de infecciones nosocomiales, y la colonización por esta bacteria puede encontrarse además en el tracto urinario, el tracto respiratorio y la sangre (Echeverri & Catano, 2010). *K. pneumoniae* es el segundo microorganismo aislado en pacientes hospitalizados (Leal et al., 2006). Adicional al incremento en su prevalencia, se reporta un aumento de la resistencia de este microorganismo a los antibióticos alrededor del mundo. Esta resistencia está dada principalmente por la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

# EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae*

(BLEE) que inactivan a los antimicrobianos  $\beta$ -láctamicos, los más prescritos en todo el mundo y que son el tratamiento de primera línea para las infecciones causadas por esta bacteria. (Rahal et al., 1998)

Por lo tanto, el presente estudio tiene como fin evaluar el efecto de 4 diferentes extractos de *B. caapi* sobre el crecimiento bacteriano de las cepas *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*, así como caracterizar cualitativa y cuantitativamente los extractos con relación a los alcaloides  $\beta$  – carbolínicos, para resaltar la importancia del estudio de las  $\beta$  – carbolinas como precursor de estudios innovadores y tratamientos alternativos frente a la creciente resistencia bacteriana a los antibióticos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales, reactivos y equipos

Todos los reactivos, disolventes, materiales (fungibles y no fungibles) y equipos a excepción del HPLC fueron proporcionados por la UISEK (**Tablas 1 y 2**).

Tabla 1. Reactivos

Nombre	Fórmula	Casa Comercial
Metanol	CH <sub>4</sub> O	Fermont
Cloroformo	CHCl <sub>3</sub>	J.T. Baker
Ácido clorhídrico 2%	HCl	Merck
Hidróxido de Potasio 100%	KOH	Merck
Ácido Sulfúrico 1%	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	PHARMCO
Cloruro de Bario 1%	BaCl <sub>2</sub>	Casa de los Químicos
Hidróxido de Sodio	NaOH	Fisher Scientific

Tabla 2. Equipos

Nombre	Modelo	Marca
Licuada Industrial	Teko 40L	Teko
Refrigeradora	2015DLXB	Durex
Balanza Analítica	BAS31PLUS	Boeco
Plancha de calentamiento y agitación	HP88854105	Thermo Scientific
pH-metro	ORION STAR A111	Thermo Scientific
Rotavapor	RE301	Yamato
Bomba de vacío	R-300	BOECO
Centrífuga	XC-2450	Premiere
Autoclave	25X-1	All American
Incubadora	B12	Heraeus Instruments

## **EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

Cámara Flujo Laminar	Miniflow120	Instrulab Q
Espectrofotómetro	DR 5000	HACH
Ultracongelador vertical	WUF-80	WISD
Lector de ELISA	Multiskan Sky	Thermo Scientific
HPLC	Series 200	PerkinElmer

---

Tanto el HPLC como las hojas y tallos de *Banisteriopsis caapi* fueron proporcionados por BIOX, institución participante del presente proyecto de investigación. El material vegetal se recibió previamente secado y molido (molienda previa, granulometría gruesa) bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y oscuridad. Acorde al tiempo de llegada del material vegetal a la Universidad se denominaron dos variantes: nueva y antigua. Siendo la variante antigua (E3 y E9) la primera que fue receptada y cuando se terminó esta, se recibió la variante nueva (E7 y E8). Aunque no fueron evaluadas por un botánico, las plantas fueron proporcionadas por un chamán que las emplea en sus ceremonias de ayahuasca. Se recogieron de lugares distintos en fechas distintas, aunque el procesamiento de las mismas fue idéntico.

### **2.2 Métodos**

#### **2.2.1. Extracción de $\beta$ – carbolinas de *B. caapi***

La extracción de  $\beta$  – carbolinas se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Pérez Marvit et al. (Trabajo de Titulación, 2020) que a continuación se describe.

##### **2.2.1.1. Preparación del material vegetal**

Se emplearon únicamente los tallos de *B. caapi* por almacenar la mayor cantidad de  $\beta$  – carbolinas(Wang et al., 2010). Éstos se molieron hasta alcanzar una granulometría fina ( $\approx 3$  mm) y se almacenaron en ambiente oscuro y seco hasta su utilización.

##### **2.2.1.2. Maceración**

El material vegetal, de granulometría adecuada, fue macerado en metanol en una relación 1:5 (p/V), durante 72 horas a 4 °C en un botellón ámbar para asegurar condiciones de

## **EFEECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

oscuridad y, posteriormente, se filtró empleando papel filtro. El extracto filtrado se concentró en el rotavapor a 50 rpm y 70 °C para conseguir un tercio del volumen inicial.

### **2.2.1.3. Acidificación**

El extracto filtrado y concentrado se llevó a pH ácido utilizando HCl al 2% en una proporción 1:3 (v/v) (extracto: HCl). El extracto se colocó en una probeta de 1L donde, lentamente, el HCl se vertió por las paredes. El extracto acidificado se dejó precipitar por 24 horas a 4 °C y, transcurrido este tiempo, se centrifugó en tubos Falcon de 50 mL a 3500 rpm por 5 minutos para facilitar la posterior filtración. Tras el filtrado se procedió a la basificación.

### **2.2.1.4. Basificación**

El extracto acidificado y filtrado se trató con una solución saturada de KOH hasta lograr un pH=10. Al igual que en el paso anterior, el extracto basificado se dejó precipitar por 24 horas a 4 °C, se centrifugó y se filtró.

### **2.2.1.5. Extracción líquido – líquido**

El extracto así obtenido se mezcló con cloroformo en una relación 2:1 (v/v) (extracto:cloroformo), se colocó en un embudo de decantación de 1L, se agitó vigorosamente por 1 minuto para facilitar el contacto del extracto con el disolvente y se dejó decantar por 10 minutos. Una vez pasado este tiempo, se observó la separación de dos fases: una superior acuosa – metanólica y otra inferior clorofórmica que contenía las  $\beta$  – carbolinas. Se retiró esta fase inferior y se midió su volumen.

### **2.2.1.6. Lavado del extracto**

Con el objetivo de eliminar cualquier impureza o contaminante 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.

## **EFEECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

Pasado este tiempo se recogió la fase orgánica volátil ya limpia. Posteriormente y para un mayor lavado, se filtró en un embudo con papel filtro que contenía un gramo de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

### **2.2.1.7. Concentración y resuspensión**

La fase clorofórmica lavada se evaporó en el rotavapor a 50 rpm y 70 °C hasta el secado completo. El extracto seco depositado en el balón del rotavapor fue resuspendido en 15 mL de metanol y almacenado a – 80 °C hasta su utilización.

De esta manera se obtuvieron los extractos E3, E7, E8 y E9 que se indican en la **tabla 5** de resultados.

### **2.2.2 Análisis de los extractos por HPLC**

El análisis de  $\beta$  – carbolinas por HPLC de fase reversa se realizó según describen Wang et al. (2010). Para ello, se empleó una columna C18 (Hypersil GOLD™, ThermoScientific) de 150 mm x 4,6 mm, con tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ . 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 minutos de lavado con 100% acetonitrilo. El periodo de equilibrado de la columna fue de 15 minutos y el detector de absorbancia se fijó en 320 nm, el máximo de absorbancia de la harmina.

De esta manera se identificaron los picos cuyo tiempo de retención coincidieron con el del estándar comercial puro de harmina, y se empleó una recta patrón de este estándar comercial para la cuantificación absoluta de este alcaloide en los 4 extractos obtenidos.

### **2.2.3. Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos de *B. caapi***

#### **2.2.3.1 Cultivo de microorganismos**

## EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae*

Tabla 3. Medios de cultivo

Medio de Cultivo	Composición por litro
Bacto Agar	Bacto agar 100%; pH final N/A
Caldo Nutritivo	Digerido peptónico 5g; cloruro de sodio 5g; extracto de carne 1,5g; extracto de levadura 1,5g; pH Final $7,4 \pm 0,2$
Caldo Mueller Hinton	Extracto de carne bovina 3g; hidrolizado ácido de caseína 17,5g; almidón 1,5g; pH final $7,3 \pm 0,1$
Agar 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 $7,0 \pm 0,2$ .
Infusión de cerebro corazón	Cerebro de ternero infusión 7,7 g; corazón de buey infusión 9,8 g; peptona de proteosa 10 g; dextrosa 2g; cloruro de sodio 5g; fosfato disódico 2,5 g; pH $7,4 \pm 0,2$ .

Las cepas bacterianas *Klebsiella pneumoniae* (ATCC2146) y *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) del Ecuador.

Para el mantenimiento de las bacterias, éstas fueron sembradas en agar nutritivo (Tabla 3), bajo condiciones controladas de temperatura ( $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 24 horas. Como se observa en la Figura 1, *K. pneumoniae* ATCC2146 (A) formó colonias amarillas medianas, lisas, brillantes y redondas; mientras que *E. faecalis* ATCC29212 (B) formó colonias blancas pequeñas, redondas y mucoides.

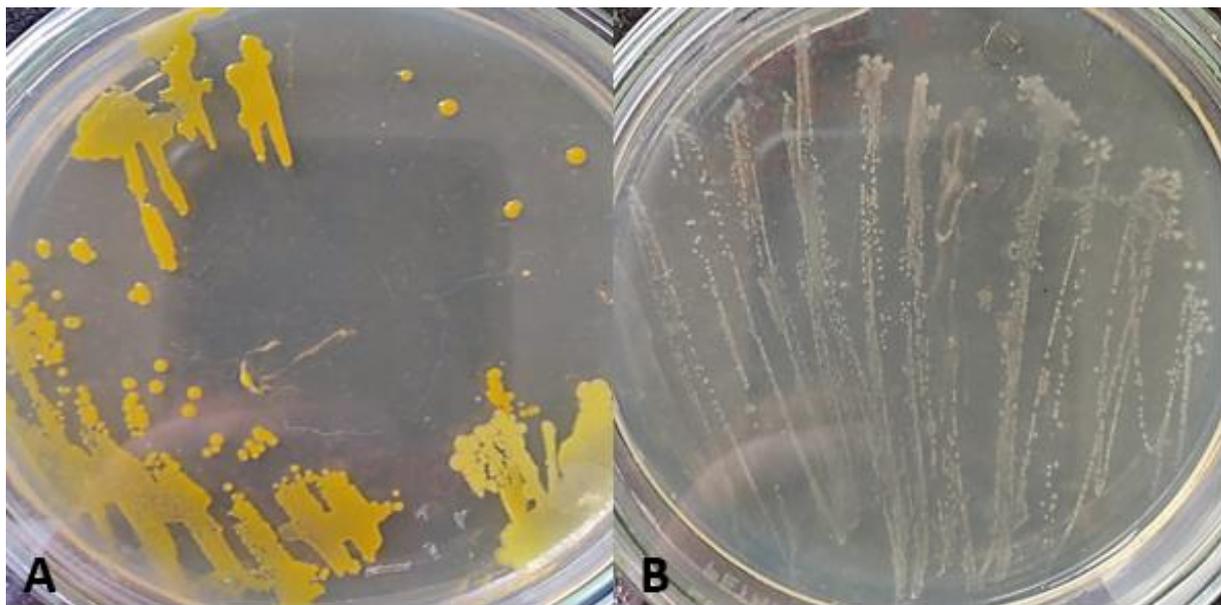


Figura 1. Colonias de Colonias de *K. pneumoniae* (A) y colonias aisladas de *E. faecalis* (B) en medio

## EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae*

### 2.2.3.2. Ensayo de microdilución en caldo

La evaluación del efecto antibacteriano del extracto de *B. caapi*, se realizó mediante ensayo de microdilución en caldo según la metodología descrita por Stephen et al. (2005).

La concentración de células de nuestros cultivos líquidos a partir de los que se prepararon los inóculos se estimó por comparación de su turbidez con la de estándares McFarland preparados según Andrews et al. (2001). **La tabla 4** muestra la composición de los estándares de McFarland empleados y el valor aproximado de UFC/ml al que cada uno corresponde.

Tabla 4. Valores de turbidez McFarland frente a su densidad celular equivalente

Standard McFarland (U.A)	BaCl <sub>2</sub> (mL)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mL)	Conteo Densidad Celular Aproximada (x10 <sup>8</sup> UFC/mL)
0,5	0,05	9,95	1,5 x10 <sup>8</sup>
1,0	0,1	9,9	3,0 x10 <sup>8</sup>
2,0	0,2	9,8	6,0 x10 <sup>8</sup>
3,0	0,3	9,7	9,0 x10 <sup>8</sup>
4,0	0,4	9,6	12,0 x10 <sup>8</sup>

Para la obtención de bacterias en condiciones óptimas para realizar el ensayo de microdilución en caldo, *E. faecalis* se sembró en infusión de cerebro corazón y *K. pneumoniae* en agar sangre y se incubaron por 24 horas. Transcurrido el tiempo, se escogieron de 3 a 5 colonias de cada placa y, mediante un asa de siembra, se transfirieron a un tubo de vidrio que contenía 5 mL de caldo Mueller – Hinton. La turbidez de este tubo se ajustó visualmente a la del estándar McFarland de 0,5 U.A y de este cultivo se tomaron 0,2 mL y se agregaron a otro tubo con 3,8 mL de caldo Mueller – Hinton. Finalmente, de este tubo se tomaron 0,25 mL y se diluyeron con 6,85 mL obteniendo así nuestro inóculo final.

## **EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

El ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los microorganismos y puntos de concentración, incluyendo sus controles positivos y negativos. En un volumen final de 300  $\mu$ L, se incluyeron 284  $\mu$ L de inóculo final, 6  $\mu$ L de extracto metanólico o metanol solo (control negativo, C-) y 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O o una disolución del antibiótico ampicilina para *E. faecalis* y levofloxacina para *K. pneumoniae* (control positivo, C+). De esta manera, los pocillos correspondientes al control positivo tuvieron una concentración de 3  $\mu$ g/ml de levofloxacina y ampicilina, y todos los pocillos tuvieron el 6 % de metanol o el 6 % de extracto metanólico. Debido a que no pudo hacerse la cuantificación absoluta de harmina antes de los ensayos de microdilución en caldo, de todos los extractos se prepararon las mismas diluciones (2x, 1x, 1/2, 1/5 y 1/10) de las que en cada pocillo correspondiente se aplicaron 6  $\mu$ L, tal y como se describe un poco más arriba. Cuando ya pudo cuantificarse la harmina, esas diluciones se tradujeron en las concentraciones finales que se indican en la **tabla 6** de resultados.

Tras 24 horas de incubación a 38 °C, se leyó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro de placas.

### **2.3 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en los experimentos se expresan como media aritmética  $\pm$  error estándar (SE). Para analizar la significancia estadística de las diferencias observadas entre las medias de las distintas concentraciones de extractos evaluadas, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un post test de Dunnet, en el que cada punto de concentración de extracto se comparó con el control negativo. En estos test estadísticos, se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando la probabilidad de la hipótesis nula (P) fue 0,05 o menor. Los valores de p para las ANOVAs se reflejan numéricamente en las figuras, y la significancia estadística de los post test mediante asteriscos

## EFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae*

(\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Para el análisis estadístico y la representación gráfica se empleó el programa informático GraphPad Prism 9.1, de la casa comercial GraphPad Software (EEUU).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Caracterización de los extractos de *B. caapi* por HPLC

Una vez obtenidos los diferentes extractos de las dos variantes de *B. caapi*, nueva y antigua, se procedió a analizarlos cualitativa y cuantitativamente mediante HPLC de fase reversa. En la **figura 2** se muestran cromatogramas representativos de cada uno de ellos a 320 nm (Wang et al., 2010), el máximo de absorción de la harmina. Tal y como puede observarse, los tiempos de retención de los picos de los extractos E3, E8 y E9 coinciden con los del estándar puro comercial de harmina ( $\approx 33.8$  min), lo que indica la presencia de este alcaloide en los extractos mencionados, mientras que el tiempo de retención del pico del extracto E7 no coincide con el de la harmina, indicando que este extracto no la contiene (**Figura 2c**). No pudo cuantificarse la harmalina debido a que el estándar ofrecía varios picos posiblemente debido a degradación o contaminación. El estándar de tetrahydroharmina, la tercera  $\beta$  – carbolina no pudo obtenerse en Ecuador.

## EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae*

Empleando rectas patrón realizadas con el estándar de harmina, se procedió a la cuantificación absoluta de este alcaloide. Las concentraciones se presentan en la **tabla 5**. Tal y como se observa, el extracto E3, fue el de mayor concentración de harmina, seguido de E8 y E9. El E7, no presentó concentraciones apreciables de harmina. En cuanto a la eficiencia de extracción (mM harmina / g *B. caapi*), podemos ver que fue muy similar entre E8 y E9, y solo del doble en el caso de E3.

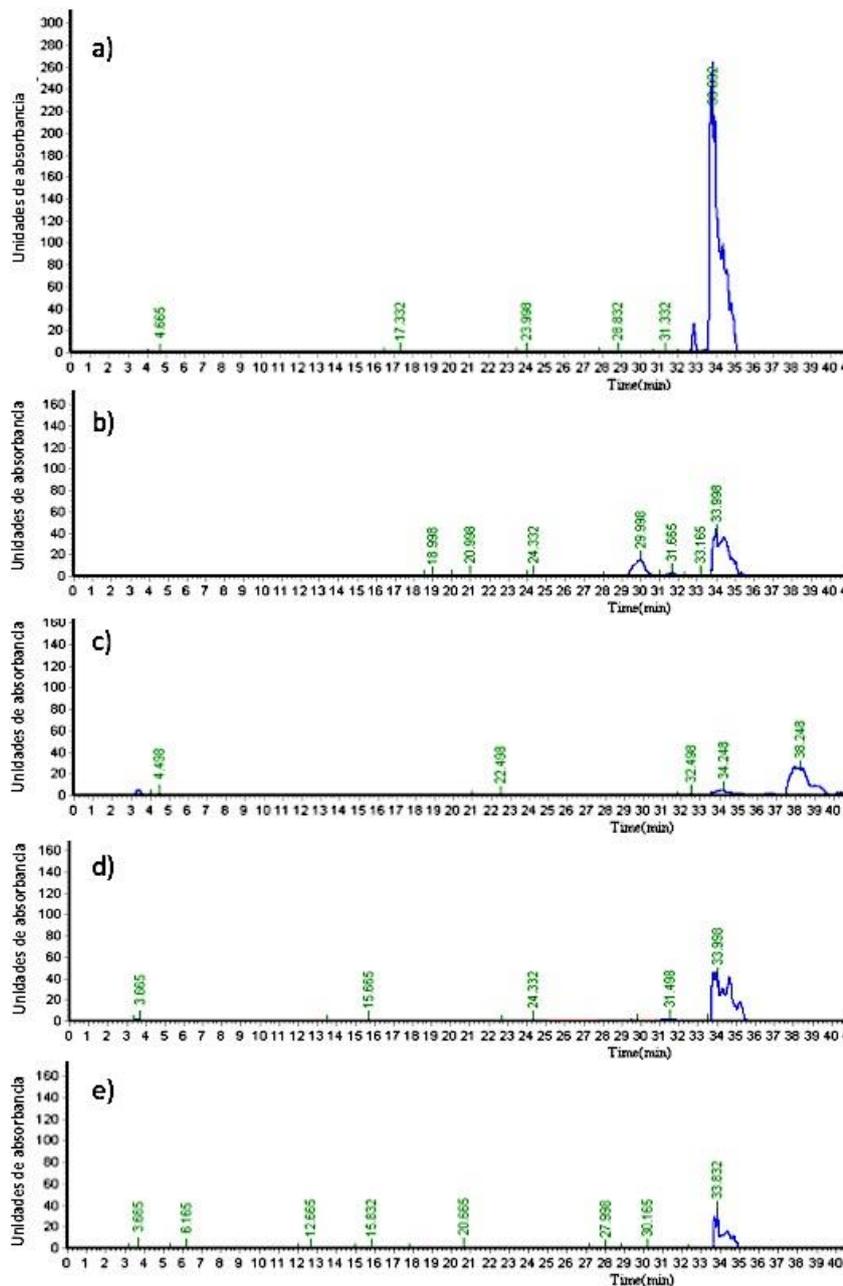


Figura 2. Cromatogramas obtenidos por HPLC con detector fijado a 320 nm. a) Estándar de harmina, b) E3, c) E7, d) E8 y e) E9

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

Tabla 5. Cuantificación absoluta de harmina para cada uno de los extractos de *B. caapi*

Extracto	Variante	Concentración harmina (mM)	g de partida (maceración)	Concentración normalizada (mM/g)
E3	Antigua	47.5	340	0,138
E7	Nueva	-	250	-
E8	Nueva	13.5	200	0,065
E9	Antigua	3.7	50	0,074

**3.2 Efecto de los extractos de *B. caapi* sobre el crecimiento bacteriano**

Una vez analizados los extractos E3, E7, E8 y E9 mediante HPLC, quisimos conocer su efecto sobre el crecimiento bacteriano. Para ello se evaluaron, tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos 2.2.3, las cepas bacterianas *K. pneumoniae* (ATCC 2146) y *E. faecalis* (ATCC 29212) mediante el método de microdilución en caldo. Como la cuantificación de harmina se realizó posteriormente al ensayo de microdilución, de todos los extractos se realizaron las mismas diluciones que correspondían a las concentraciones mostradas en la **tabla 6**. Tras el periodo de incubación se midió la OD a 600 nm (**Figuras 3 y 4**), y los valores obtenidos se transformaron a unidades formadoras de colonias (UFC /mL) mediante rectas patrón (Anexos A y B) para cada uno de los microorganismos (**Figuras 5 y 6**), con el objetivo de realizar un mejor cálculo del porcentaje de inhibición.

Tabla 6. Diluciones y concentraciones de cada extracto para el método de dilución en caldo

EXTRACTO						
E3	Dilución	2X	1X	0.5X	0.2X	0.1X
	Concentración ( $\mu$ m)	1900	950	475	190	95
E8	Dilución	2X	1X	0.5X	0.2X	0.1X
	Concentración ( $\mu$ m)	540	270	135	54	27
E9	Dilución	2X	1X	0.5X	0.2X	0.1X
	Concentración ( $\mu$ m)	149	74	37	15	7

## EFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae*

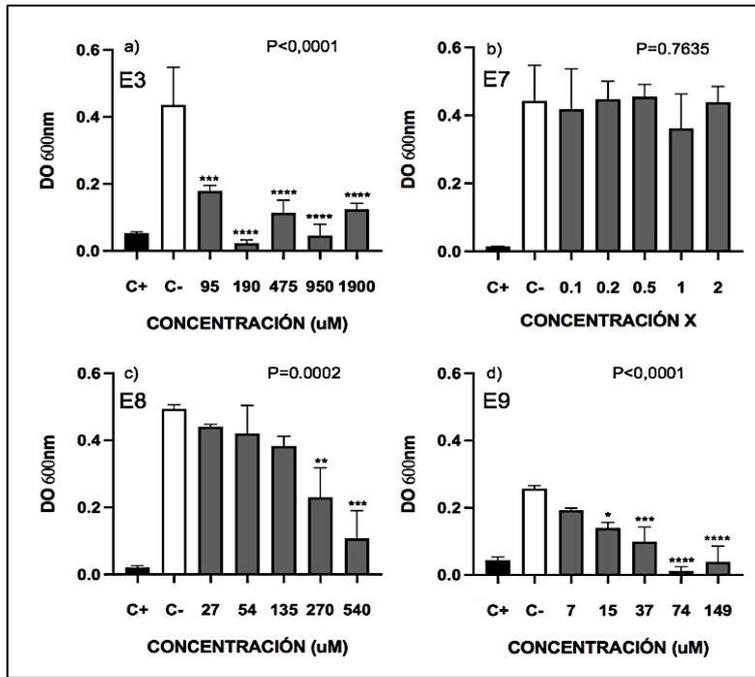


Figura 3. Efecto de los extractos E3, E7, E8 y E9 de *B. caapi* sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Klebsiella pneumoniae*. Concentración del extracto vs DO 600 nm.

C+: metanol+levofloxacina; C-: metanol al 2%

Dunnets post test: control negativo vs tratamiento  
\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,00001$

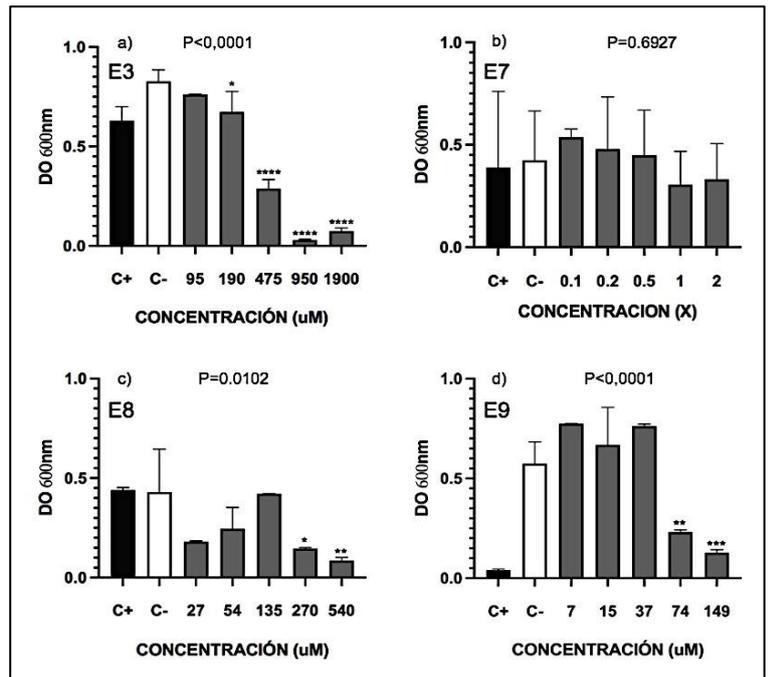


Figura 4. Efecto de los extractos E3, E7, E8 y E9 de *B. caapi* sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Enterococcus faecalis*. Concentración del extracto vs DO 600 nm.

C+: metanol+ampicilina; C-: metanol al 2%

Dunnets post test: control negativo vs tratamiento  
\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,00001$

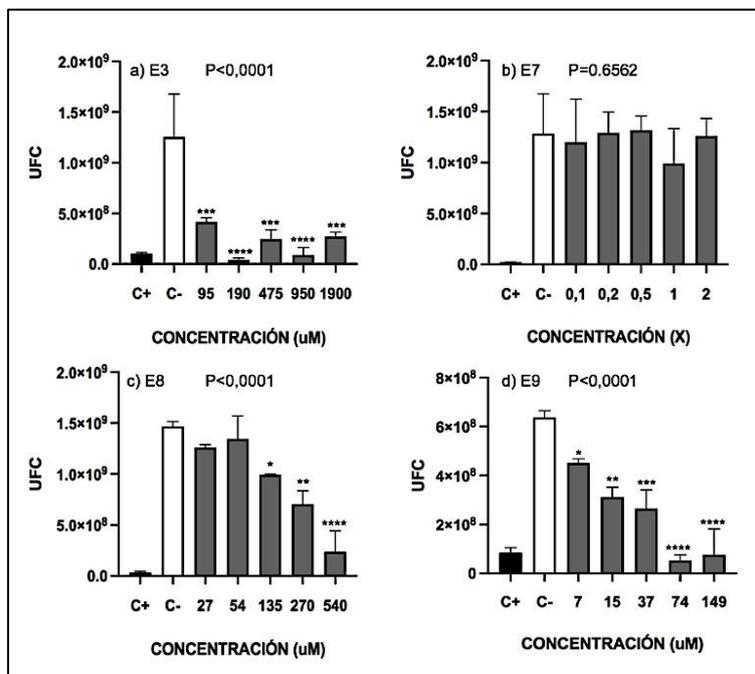


Figura 5. Efecto de los extractos E3, E7, E8 y E9 de *B. caapi* sobre el crecimiento bacteriano de la cepa *Klebsiella pneumoniae*. Concentración del extracto vs UFC

C+: metanol+levofloxacina; C-: metanol al 2%

Dunnets post test: control negativo vs tratamiento  
\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,00001$

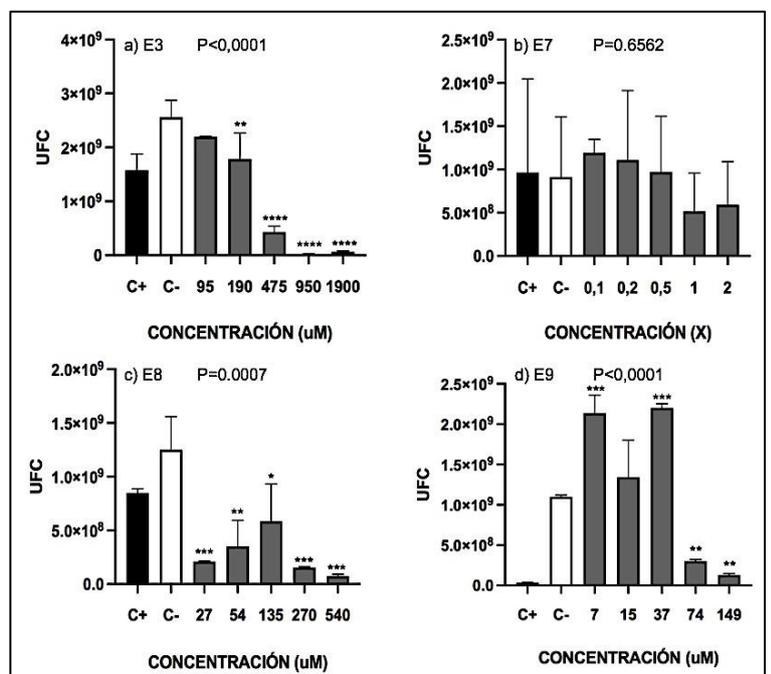


Figura 6. Efecto de los extractos E3, E7, E8 y E9 de *B. caapi* sobre el crecimiento bacteriano de la cepa *Enterococcus faecalis*. Concentración del extracto vs UFC

C+: metanol+ampicilina; C-: metanol al 2%

Dunnets post test: control negativo vs tratamiento  
\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,00001$

## EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae*

Como puede observarse en las **figuras 3, 4, 5 y 6** todos los extractos evaluados, a excepción del E7 tuvieron un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento bacteriano (ANOVA  $p < 0,05$ ), tanto para *K. pneumoniae* como para *E. faecalis*, estos resultados tienen consonancia con los obtenidos en el análisis por HPLC, ya que E7 no contiene harmina (**Fig2c** y **Tabla 5**) y probablemente tampoco el resto de  $\beta$  – carbolinas. El cambio de DO 600 nm a UFC, no provoca cambios significativos en la forma de los gráficos, ni afecta a la significancia estadística (**Fig. 3, 4, 5 y 6**).

Para un análisis más profundo de los datos, se calculó el porcentaje de inhibición a partir de los datos de UFC / ml y se estimaron las  $IC_{50}$  absolutas de manera gráfica. En las **figuras 7 y 8**, se muestran los resultados obtenidos para las dos bacterias.

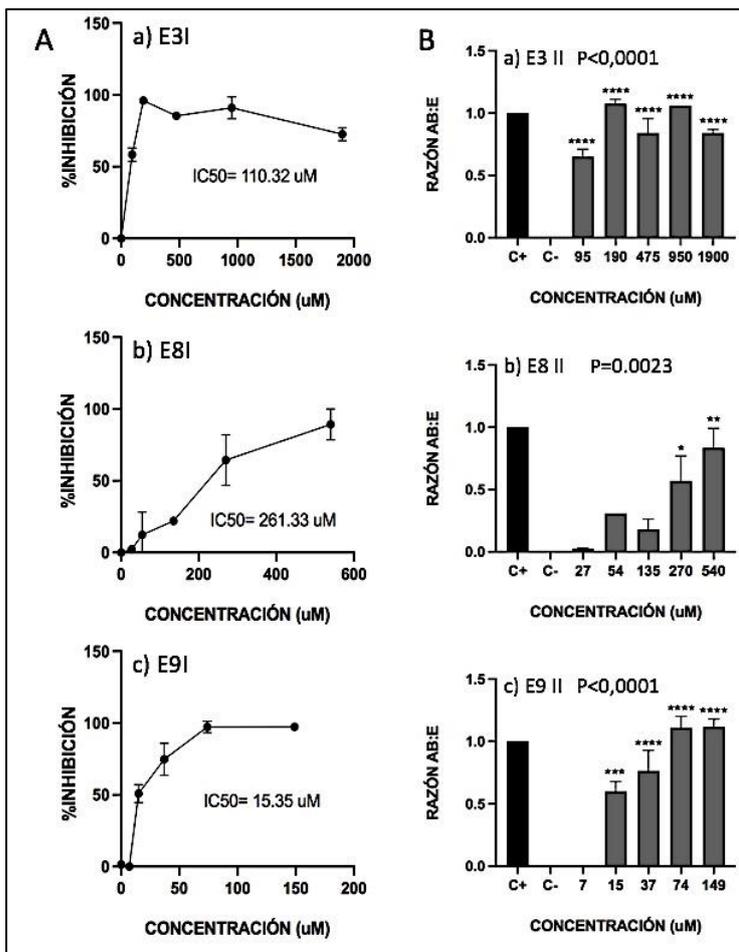


Figura 7. Efecto de los extractos E3, E8 y E9 de *B. caapi* sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Klebsiella pneumoniae*. A: concentración del extracto vs %inhibición; B: concentración del extracto vs razón (efecto tratamiento / efecto C+).

C+: metanol+levofloxacina; C-: metanol al 2%

Dunnets post test: control negativo vs tratamiento  
\*  $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,00001$

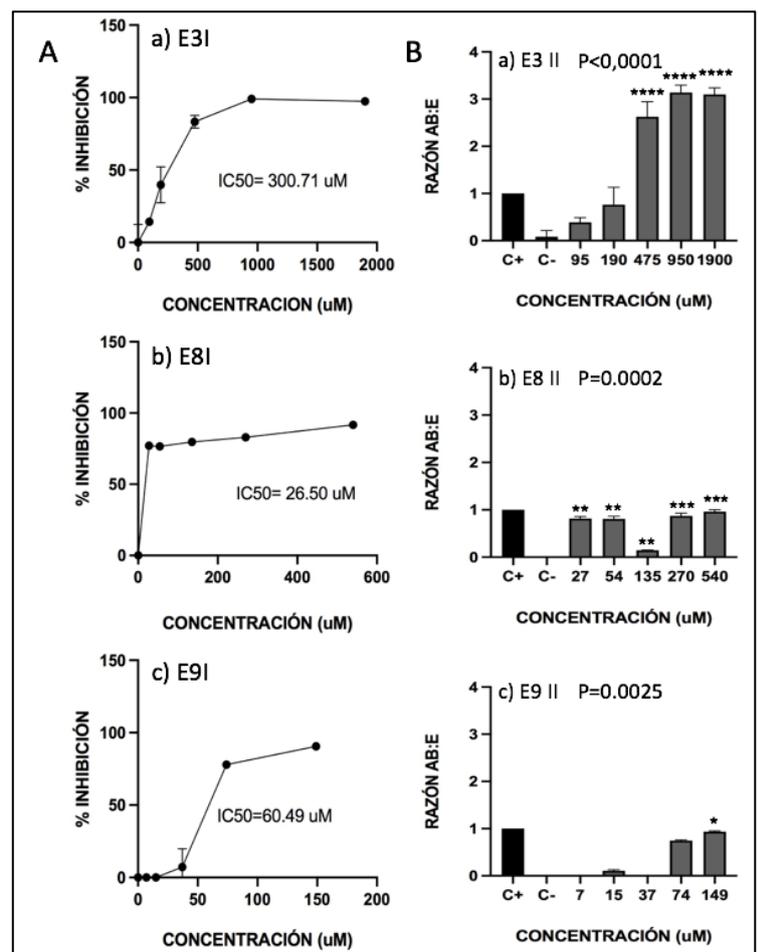


Figura 8. Efecto de los extractos E3, E8 y E9 de *B. caapi* sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Enterococcus faecalis*. A: concentración del extracto vs %inhibición; B: concentración del extracto vs razón (efecto tratamiento / efecto C+).

C+: metanol+ampicilina; C-: metanol al 2%

Dunnets post test: control negativo vs tratamiento  
\*  $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,00001$

## **EFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

Como puede observarse, el extracto más potente, es decir, el de menor IC<sub>50</sub>, fue el E9 para *K. pneumoniae* (15,353  $\mu$ M) y E8 para *E. faecalis* (26,50  $\mu$ M). Para ambos microorganismos, el extracto de menor potencia fue el E3 (110,32 y 300,71  $\mu$ M respectivamente). Además de la potencia de los extractos, se analizó la eficacia de los mismos calculando las razones de inhibición para cada uno de los puntos de concentración (% inhibición del Extracto / % inhibición del C+). El extracto de mayor eficacia fue el E3, cuyas razones están por encima de 1 para *K. pneumoniae* y por encima de 3 para *E. faecalis* en los puntos de mayor concentración. Por el contrario, los extractos más potentes, E8 y E9, fueron los de menor eficacia. Ya hemos dicho anteriormente que el E7 no tuvo efecto significativo por lo que se excluyó de estos cálculos.

Los extractos E3 y E9 son de la variante antigua de *B. caapi*, mientras que E8 es de la variante nueva, según los resultados obtenidos y el análisis antes planteado la variante con mayor efecto sobre el crecimiento bacteriano para los dos microorganismos es la antigua (extractos E3 y E9) (**Fig 7B y Fig 8B**).

Los resultados obtenidos tanto por HPLC como por microdilución en caldo tienen coherencia entre sí, puesto que el extracto E7 donde no pudo cuantificarse la harmina, fue el único extracto sin efecto inhibitorio sobre las bacterias analizadas.

### **4. DISCUSIÓN**

El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de los extractos de *B. caapi* sobre el crecimiento de las dos cepas bacterianas, *K. pneumoniae* y *E. faecalis* y, efectivamente, se demostró el efecto antibacteriano de 3 de los 4 extractos evaluados. Estos extractos pueden contener muchos compuestos, como otras  $\beta$  – carbolinas, que no pudieron ser cuantificadas,

## **EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

pero que pueden tener un efecto sobre el crecimiento bacteriano, o actuar de manera sinérgica entre ellas, logrando así el efecto observado. Es por esto que los valores de las  $IC_{50}$  deben analizarse con precaución, ya que no corresponden a un compuesto puro, sino a una mezcla más compleja. Por tanto, se estaría subestimando la concentración de  $\beta$  – carbolinas. De hecho, los valores de  $IC_{50}$  del presente trabajo para harmina, son bastante inferiores a los obtenidos por Al – Bayati et al. (2008) para el alcaloide puro, lo que también apunta a la combinación de varios alcaloides actuando en conjunto. Sin embargo, gracias al análisis mediante HPLC de fase reversa se puede afirmar que uno de los componentes es la harmina y comparar la potencia de los distintos extractos a través de la comparación de sus  $IC_{50}$  (**Figuras 7 y 8**). El hecho de que el único extracto sin concentraciones detectables de harmina sea el E7, también el único que no mostró efecto antibiótico, nos permite afirmar con cierta seguridad que el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano se debe, al menos parcialmente, a la harmina.

Los resultados obtenidos en el presente estudio junto con los de (Najma et al., 2008) y (Larson et al., 1988) demuestran la actividad antimicrobiana de los alcaloides  $\beta$  – carbolínicos como la harmina. Según Wink (1998 y 2015) este efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano se da porque los alcaloides tienen la capacidad de intercalar el ADN. Además, (Funayama et al., 1996) afirman que la harmina inhiben la actividad de relajación del ADN topoisomerasa I y II, y (Boeria et al., 2002) mencionan en su estudio que la harmina tiene efectos tóxicos y mutagénicos en células procariontas. Por eso, hacen falta más estudios relativos a los mecanismos que analicen la mutagénesis y el daño estructural en el ADN de las bacterias tratadas con extractos de *B. caapi* (por ejemplo, mediante test Ames combinado con secuenciación de ADN).

# **EFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

## **4. CONCLUSIONES**

Los extractos E3, E8 y E9 de *B. caapi* contienen harmina y este alcaloide  $\beta$  – carbolínico tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*.

También podemos concluir que la variante antigua de *B. caapi* es más potente para inhibir el crecimiento bacteriano que la nueva, el extracto E3 fue más eficaz para ambas bacterias y el extracto más potente para *K. pneumoniae* fue el E9 y E8 para *E. faecalis*.

Los resultados obtenidos tanto por HPLC como por microdilución en caldo son favorables para desarrollar futuras investigaciones biotecnológicas con más microorganismos de interés en la salud pública y medicina veterinaria.

## **5. RECOMENDACIONES**

Los resultados obtenidos se deberían complementar con análisis moleculares como ensayos de genotoxicidad como Test de Ames y tal vez secuenciación, para complementar datos relativos al mecanismo de acción de la harmina y las  $\beta$  – carbolinas a nivel celular. También se debería usar la bioinformática para predecir cuales serían las dianas de acción de las  $\beta$  – carbolinas en la célula.

En el presente estudio tuvimos complicaciones con la columna C18 del HPLC por lo que es importante diluir mucho los extractos y, siempre entre cada corrida, tanto de estándares como de extractos, realizar un protocolo de limpieza de la columna.

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

**6. BIBLIOGRAFÍA**

- Al-Bayati FA, Al-Mola HF. Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tribulus terrestris* L. growing in Iraq. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2008 Feb;9(2):154-9. doi: 10.1631/jzus.B0720251. PMID: 18257138; PMCID: PMC2225498.
- Alós, J. I. (2015). Antibiotic resistance: A global crisis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 5–16.
- Boeria, J., Viana, A., Picada, J., & Henriques, J. (2002). Genotoxic and recombinogenic activities of the two p-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis*, 500, 39–48.
- Coban, A. Y., Birinci, A., Ekinci, B., & Durupinar, B. (2004). Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by the broth microdilution method with 7H9 broth. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(1), 111–113. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000100020>
- Echeverri, L. M., & Catano, J. C. (2010). *Klebsiella pneumoniae* as nosocomial pathogens: epidemiology and resistance. *Atreia*, 23(3), 240–249.
- Edelsberg, J., Weycker, D., Barron, R., Li, X., Wu, H., Oster, G., Badre, S., Langeberg, W. J., & Weber, D. J. (2014). Prevalence of antibiotic resistance in US hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(3), 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.011>
- European Center for Disease Prevention and Control. (n.d.). Retrieved February 24, 2021, from <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

Falagas, M. E., Giannoula, T., Drosos, K., & Konstantinos, V. (2014). Deaths Attributable to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Emerging Infectious Diseases*, 20(7), 1170–1175. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4073868/pdf/12-1004.pdf>

Fariñas, M. C., & Torres, C. (2007). Enterococo ¿un patógeno emergente en nuestros hospitales? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(8), 500–502. <https://doi.org/10.1157/13109985>

Flahaut, S., Frere, J., Boutibonnes, P., & Auffray, Y. (1996). Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), 2416–2420. <https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2416-2420.1996>

Funayama, Y., Nishio, K., Wakabayashi, K., Nagao, M., Shimoi, K., Tatsuo, O., Hasegawa, S., & Saijo, N. (1996). Effects of p-- and y-carboline derivatives on DNA topoisomerase activities. *Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis*, 349(95), 183–191.

Hostettmann, K., Gupta, M. P., Marston, A., & Ferreira-Quiroz, E. (2018). Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos. In *Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo* (Vol. 51, Issue 1).

Jiménez, J., Riverón-Negrete, L., Abdullaev, F., Espinosa-Aguirre, J., & Rodríguez-Arnaiz, R. (2008). Cytotoxicity of the  $\beta$ -carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays in vitro. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 60(4–5), 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2007.12.003>

Klare, I., Werner, G., & Witte, W. (2001). Enterococci. *Contrib Microbiol*, 8, 108–122.

Lahsoune, M., Boutayeb, H., Zerouali, K., Belabbes, H., & El Mdaghri, N. (2007). Prévalence

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

et état de sensibilité aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii* dans un CHU

marocain. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 37(12), 828–831.

<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2007.05.006>

Larson, R. A., Marley, K. A., Tuveson, R. W., & Berenbaum, M. R. (1988). B-Carboline Alkaloids: Mechanisms of Phototoxicity To Bacteria and Insects. *Photochemistry and Photobiology*, 48(5), 665–674. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1988.tb02879.x>

Leal, A. L., Schmalbach, J. E., Álvarez, C., Buitrago, G., & Méndez, M. (2006). Endemic channels and bacterial resistance markers in third-level hospitals in Bogotá, Colombia. *Revista de Salud Publica*, 8(SUPPL. 1), 59–70. <https://doi.org/10.1590/s0124-00642006000400006>

Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., AlMazroa, M. A., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., ... Murray, C. J. L. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2095–2128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)

Macrae, E. (1999). The ritual and religious use of ayahuasca in contemporary Brazil. *Giesp*, 2–5.

Najma, A., Karin, Z.-E., Hasnain, S., & Michael, H. (2008). Effect of Peganum harmala or its  $\beta$ -Carboline Alkaloids on Certain Antibiotic Resistant Strains of Bacteria and Protozoa from Poultry. *Phytotherapy Research*, 22(4), 544–549. <https://doi.org/10.1002/ptr>

Pagalilauan, G. L., & Limaye, A. P. (2013). Infections in Transplant Patients. *Medical Clinics of North America*, 97(4), 581–600. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2013.03.002>

**EFEECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

- Paulsen, I. T., Banerjee, L., Hyers, G. S. A., Nelson, K. E., Seshadri, R., Read, T. D., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Gill, S. R., Heidelberg, J. F., Tettelin, H., Dodson, R. J., Umayam, L., Brinkac, L., Beanan, M., Daugherty, S., DeBoy, R. T., Durkin, S., Kolonay, J., ... Fraser, C. M. (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, 299(5615), 2071–2074.  
<https://doi.org/10.1126/science.1080613>
- Pérez, M. D., Martínez, C. R., & Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147–161.
- Rahal, J. J., Urban, C., Horn, D., Freeman, K., Segal-Maurer, S., Maurer, J., Mariano, N., Marks, S., Burns, J. M., Dominick, D., & Lim, M. (1998). Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *Journal of the American Medical Association*, 280(14), 1233–1237.  
<https://doi.org/10.1001/jama.280.14.1233>
- Roberts, J. R., & Chousalkar, K. K. (2017). Infectious Bronchitis. In *Egg Innovations and Strategies for Improvements*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00052-4>
- Rocha, C., Reynolds, N. D., & Simons, M. P. (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: Una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud emerging antibiotic resistance: a global threat and critical healthcare problem. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(1), 139–145.
- Samoylenko, V., Rahman, M. M., Tekwani, B. L., Tripathi, L. M., Wang, Y. H., Khan, S. I., Khan, I. A., Miller, L. S., Joshi, V. C., & Muhammad, I. (2010). *Banisteriopsis caapi*, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. *Journal of*

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

*Ethnopharmacology*, 127(2), 357–367. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.030>

Taylor, S., Elaine, B., & Michael, R. (1993). ENTEROCOCCUS, AN EMERGING

PATHOGEN. *The Annals OfPharmacotherapy*, 27(3), 369–373.

<https://doi.org/10.1177/1461444810365020>

Wang, Y. H., Samoylenko, V., Tekwani, B. L., Khan, I. A., Miller, L. S., Chaurasiya, N. D., Rahman, M. M., Tripathi, L. M., Khan, S. I., Joshi, V. C., Wigger, F. T., & 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>

Wink, M. (1998). Modes of Action of Alkaloids. In M. Roberts & M. Wink (Eds.), *Alkaloids*

*Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications* (pp. 301–326).

[https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2905-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2905-4_12)

Wink, M., Schmeller, T. & Latz-Brüning, B. Modes of Action of Allelochemical Alkaloids:

Interaction with Neuroreceptors, DNA, and Other Molecular Targets. *J Chem Ecol* 24,

1881–1937 (1998). <https://doi.org/10.1023/A:1022315802264>

Wink, M. (2015). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites.

*Medicines*, 2(3), 251–286. <https://doi.org/10.3390/medicines2030251>

Yang, Y., Xi Qiang, L., Chun Ping, T., & Sheng, Y. (2012). Natural products chemistry

research 2010's progress in China. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 10(1), 1–12.

[https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(12\)60001-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(12)60001-6)

# EFFECTO DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae*

## Índice de figuras

- Figura 1. Colonias de *K. pneumoniae* (A) y colonias aisladas de *E. faecalis* (B) en medio nutritivo..... 18
- Figura 2. Cromatogramas obtenidos por HPLC a 320 nm. a) Estándar de harmina, b) E3, c) E7, d) E8 y e) E9 .....**Error! Bookmark not defined.**1
- Figura 3. Efecto de los extractos E3, E7, E8 y E9 de *B. caapi* sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Klebsiella pneumoniae*. Concentración del extracto vs DO 600 nm..... **Error! Bookmark not defined.**3
- Figura 4. Efecto de los extractos E3, E7, E8 y E9 de *B. caapi* sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Enterococcus faecalis*. Concentración del extracto vs DO 600 nm ..... **Error! Bookmark not defined.**3
- Figura 5. Efecto de los extractos E3, E7, E8 y E9 de *B. caapi* sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Klebsiella pneumoniae*. Concentración del extracto vs UFC. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 6. Efecto de los extractos E3, E7, E8 y E9 de *B. caapi* sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Enterococcus faecalis*. Concentración del extracto vs UFC.. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 7. Efecto de los extractos E3, E7, E8 y E9 de *B. caapi* sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Klebsiella pneumoniae*. A: concentración del extracto vs %inhibición; B: concentración del extracto vs razón. ....**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 8. Efecto de los extractos E3, E7, E8 y E9 de *B. caapi* sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Enterococcus faecalis*. A: concentración del extracto vs %inhibición; B: concentración del extracto vs razón. ....**Error! Bookmark not defined.**

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

**Índice de tablas**

<i>Tabla 1. Reactivos .....</i>	14
<i>Tabla 2. Equipos .....</i>	14
<i>Tabla 3. Medios de cultivo.....</i>	18
<i>Tabla 4. Valores de turbidez McFarland frente a su densidad celular equivalente.....</i>	19
<i>Tabla 5. Concentración de harmina en mg/mL para cada uno de los extractos con su variante de planta B. caapi.....</i>	232
<i>Tabla 6. Diluciones y concentraciones de cada extracto para el método de dilución en caldo .....</i>	23

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

**Índice de anexos**

*Figura 9. Curva patrón, ecuación y valor R para la bacteria K. pneumoniae ATCC 2146*  
.....**Error! Bookmark not defined.**7

*Figura 10. Curva patrón, ecuación y valor R para la bacteria E. faecalis ATCC 29212* **Error!**  
**Bookmark not defined.**37

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

**Anexo 1**

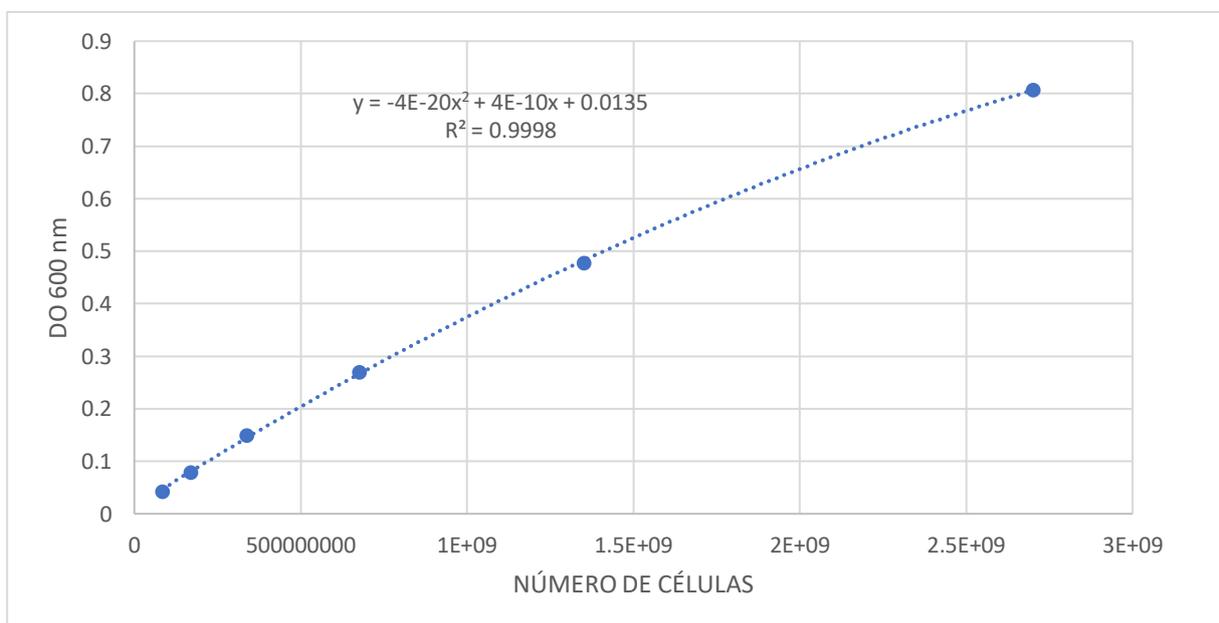


Figura 9. Curva patrón, ecuación y valor R para la bacteria *K. pneumoniae* ATCC 2146

**EFFECTO DE LAS  $\beta$ -CARBOLINAS DE *Banisteriopsis Caapi* SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *E. faecalis* Y *K. pneumoniae***

**Anexo 2**

Figura 10. Curva patrón, ecuación y valor R para la bacteria *E. faecalis* ATCC 29212

