



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“EFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE
CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*”**

Realizado por:

Jossue Andrés Carrera Torres

Director del proyecto:

PhD. Lino Arisqueta Herranz

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Quito 21 de Mayo 2021

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, JOSSUE ANDRÉS CARRERA TORRES, con cédula de identidad 1719048355, 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.



Jossue Andrés Carrera Torres

C.I. 1719048355

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS
BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS
BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*”**

Realizado por:

JOSSUE ANDRÉS CARRERA TORRES

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERO 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

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS
BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

DIRECTOR

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los profesores informantes:

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ

ALBERTO AGUIRRE

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



PhD. José Rubén Ramírez

REVISOR



PhD. Alberto Aguirre

REVISOR

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

Quito, 21 de Mayo 2021

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por permitirme culminar mi formación académica y poder aportar mejoras en distintas áreas de la biotecnología.

A mis padres, por ser pilares fundamentales y brindarme apoyo y amor incondicional todos los días.

A mi tutor Lino, por la confianza y dedicación dentro de esta investigación.

A mis profesores de la UISEK y amigos, que han compartido conocimiento y experiencias a lo largo de mi paso por la institución.

Gracias Totales

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS
BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación

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

Proyecto:

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

Perteneciente a la Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS
BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

21/05/21

Para someter a:

To be submitted:

**EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS
BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae***

Andrés Carrera Torres¹, Lino Arisqueta^{1*}

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito,
Ecuador. 21/05/2021

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: PhD. Lino Arisqueta Herranz,

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Quito, Ecuador.

Teléfono: +593-983104230; email: lino.arisqueta@uisek.edu.ec

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS
BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

Resumen

El constante descontrol en términos de comercialización y administración de fármacos ha incrementado la resistencia frente a antibióticos por muchos patógenos bacterianos, convirtiéndose en un problema de Salud Pública mundial. La necesidad de solucionar estas complicaciones que dificultan los tratamientos clínicos convencionales, ha forzado la creación de nuevos mecanismos para analizar la sensibilidad bacteriana haciendo uso de alternativas naturales como la *Banisteriopsis caapi* que presenta efectos antimicrobianos (antibacterianos, antiparasitarios) y anticancerígenos de interés clínico. Este estudio se enfocó en el análisis antibacteriano.

Tomando en cuenta estas preocupaciones, el objetivo principal de este estudio fue demostrar el efecto antibacteriano de cuatro extractos de *Banisteriopsis caapi* (de distinta variedad) sobre cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC25923 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC1705.

Se cuantificó la cantidad de β - carbolinas (harmina) por HPLC fase reversa en cada extracto (E3, E7, E8 y E9) y se realizaron microdiluciones en caldo para determinar porcentajes de inhibición y sus respectivos IC₅₀. Se pudo comprobar que para *S.aureus* todos los extractos alcanzaron niveles de inhibición similares; mientras que para *K.pneumoniae* el extracto más potente (E9) fue el menos eficaz. Se podría afirmar que, los extractos de la variedad antigua presentan mayor actividad antibiótica (ya que en general son más potentes y eficaces). Sin embargo, existe la necesidad de realizar estudios adicionales para conocer la toxicidad de los extractos así como la identificación de los mecanismos moleculares subyacentes responsables de dichas actividades biológicas.

Palabras clave: *Banisteriopsis caapi*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, HPLC, harmina, extractos, potencia

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

Abstract

The constant lack of control in terms of commercialization and administration of drugs has increased resistance to antibiotics by many bacterial pathogens, becoming a global public health problem. The urgency to solve these complications that difficult some clinical treatments has forced the creation of new mechanisms to analyze bacterial sensitivity using natural alternatives such as *Banisteriopsis caapi*, which has antimicrobial (antibacterial, antiparasitic) and some cancer effects of clinical interest. This study focused on antibacterial analysis.

Taking these concerns into account, the aim of this study was to demonstrate the antibacterial effect of four extracts of *Banisteriopsis caapi* (of different varieties) on two bacterial strains: *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC1705.

The amount of β -carbolines (harmine) was quantified by reverse phase HPLC for each extract (E3, E7, E8 and E9) and broth microdilutions were carried out to determine inhibition percentages and their respective IC₅₀. It was found that for *S.aureus* all the extracts reached similar levels of inhibition; while for *K. pneumoniae* the most potent extract (E9) was the least effective. It could be said that, the extracts of the old variety have greater antibiotic activity (in general they are more powerful and effective). However, there is a need for additional studies to know the toxicity of the extracts as well as the identification of the underlying molecular mechanisms responsible for these biological activities.

Key words: *Banisteriopsis caapi*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, HPLC, harmine, extracts, potency

1. INTRODUCCIÓN

La incorrecta comercialización y administración de fármacos, se ha convertido en un problema de salud pública en muchos países, ya que como lo menciona la Organización Mundial de la Salud (OMS), solamente el 50% de las prescripciones médicas llegan a ser utilizadas de la manera correcta en términos de compra y la forma en la que los pacientes toman dichos medicamentos (OMS. 2002). La selección de un antibiótico para cierta enfermedad, debe basarse en un criterio médico/clínico con conocimientos microbiológicos y farmacológicos precisos, evitando de esta manera el desperdicio de recursos y precautelando, sobre todo, la salud del paciente. El uso racional de los antibióticos además toma en cuenta factores como: la dosis necesaria para cada paciente dependiendo del estado de la infección, tiempo adecuado de tratamiento y un costo de comercialización accesible para la población (Sánchez C, et al., 2018).

Así por ejemplo en Ecuador, el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), junto al Ministerio de Salud Pública (MSP), llevan líneas de investigación relacionadas a enfermedades infecciosas desatendidas, tanto bacterianas como víricas, o aquellas provocadas por parásitos como principales ejes de investigación debido a su alta incidencia y prevalencia en la población (MSP. 2016).

A pesar del descubrimiento de antibióticos como la penicilina y su gran aporte para combatir infecciones; muchas de estas enfermedades bacterianas se han convertido en una de las principales causas de muerte a nivel mundial, debido a que las bacterias han adquirido resistencia frente a antibióticos dificultando el tratamiento de dichas infecciones (Altamirano J. 2018).

A pesar de que la penicilina era efectiva contra *Staphylococcus aureus* alrededor de la década de los cuarenta, hoy menos del 10% de las cepas son sensibles a este antibiótico. Así

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

también, cuando se descubrió y comenzó a utilizarse la cefotaxima (cefalosporina de tercera generación) a partir de 1980, las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* eran sensibles. En la actualidad el 16% de las cepas son resistentes.

De igual manera, a finales del siglo XX, cuando se comercializaban fluoroquinolonas, prácticamente todas las cepas de *E.coli* eran sensibles, y hoy en día el 34% son cepas resistentes (Alós J. 2015). Pese a que la aparición de los primeros reportes de resistencias puede ser discutidos, en la Tabla 1, se indican esquemáticamente, los años de descubrimiento de los antibióticos más importantes y los años en que se reportó por primera vez resistencia clínica contra los mismos.

Tabla 1. Años de descubrimiento de antibióticos y sus posteriores resistencias bacterianas

Antibiótico	Descubrimiento	Uso Clínico	Resistencia Clínica
Penicilina	1928	1943	1954
Estreptomicina	1944	1947	1956
Tetraciclina	1946	1942	1956
Eritromicina	1952	1955	1956
Vancomicina	1956	1972	1994
Gentamicina	1963	1967	1968
Fluoroquinolonas	1978	1982	1985

Datos tomados de Ronald et al (1966), Kammer (1982), Davies (1997), O'Brien (1997), Soussy (1998), Weidemann & Heisig (1999).

Este tipo de resistencias, han provocado la búsqueda constante de nuevos antibióticos con mayores espectros de acción y a un costo de fabricación mucho mayor (Guzmán C, Rodríguez V. 2018).

Dentro de los factores que contribuyen a la presión selectiva bacteriana, se pueden destacar: la venta de antibióticos sin receta médica, automedicación, el uso excesivo de antibióticos sobre cultivos y animales de corral y la liberación de antibióticos no metabolizados o sus derivados al ecosistema (Aslam et al., 2018). Además, estos agentes antimicrobianos

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

influyen directamente en los mecanismos de variación genética (mutación, recombinación) promoviendo el intercambio de genes, induciendo e incrementando la transferencia de genes de resistencia (Alós J. 2015). Así, por ejemplo en respuesta al estrés que las fluoroquinolonas o los aminoglucósidos ejercen sobre los *Pneumococos*, estos aumentan su capacidad natural de transformación, que incluye la captación de dichos genes (Prudhomme M, et al., 2006).

Uno de los principales problemas de bacterias resistentes dentro del ámbito hospitalario, es el aumento de infecciones nosocomiales (I.N.) que no se pueden tratar con antibióticos convencionales, se vuelven difíciles de tratar y llegan a representar una importante causa de morbilidad y mortalidad en pacientes. Las I.N. se presentan generalmente después de las 72 horas de ingreso del paciente al hospital y además de las características antes mencionadas también prolongan el tiempo de estancia y recuperación, elevan los costos de atención y afectan la calidad de vida de la persona internada (Alpuche C, Daza C. 2002) .

La OMS estima que el 8% de pacientes hospitalizados adquieren algún tipo de I.N., siendo las más frecuentes las infecciones por heridas, infecciones urinarias y de las vías respiratorias inferiores; aquellas que se dan en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) con una prevalencia de hasta el 50% y neumonías con un porcentaje de mortalidad del 60% (Mazón J, et al. 2019). El 70% de estas I.N. son causadas por bacterias Gram negativas.

Dentro de las bacterias Gram (-), *Klebsiella pneumoniae*, bacteria anaerobia facultativa, presenta un importante interés médico. Es uno de los patógenos oportunistas que llega a ocasionar cerca de un tercio de las I.N. hospitalarias. Se la relaciona con infecciones extra intestinales incluidas infecciones de las vías urinarias, cistitis, neumonía, infecciones en heridas en estado post operatorio y en casos más avanzados provoca septicemia (Navon V, et al., 2017).

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

Generalmente se utilizan antibióticos β -lactámicos para combatir infecciones por *K. pneumoniae*. Sin embargo, se han descrito casos de resistencias asociados a genes cromosómicos y/o plasmídicos, que han reducido la efectividad de los antibióticos (CDC. 2013). La resistencia a los β -lactámicos se atribuye a la hidrólisis del anillo β -lactámico por las enzimas β -lactamasas presentes en el cromosoma bacteriano (Martin. R, Bachman. M. 2018). Así también, algunos plásmidos regulan β -lactamasas tipo AmpC que confieren resistencia a antibióticos derivados de la penicilina (Martin. R, Bachman. M. 2018).

Por otro lado, existen casos de I.N. causadas por bacterias Gram (+), donde se destacan bacterias de los géneros *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

Desde inicios de los años 80, *Staphylococcus aureus* ha representado un grave problema en términos de terapias antimicrobianas. Un ejemplo de este fenómeno es su resistencia frente a oxacilina y meticilina. Estas cepas bacterianas han logrado adaptarse exitosamente a procesos de presión selectiva frente a antibióticos, “renovando” su genoma a través de mutaciones o la adquisición de genes exógenos (Hiramatsu K, et al., 2001). En una explicación que brinda Grundmann H, et al., en el 2006, indican que *S. aureus* contiene el gen de resistencia *mecA*, que codifica una PBP (“*penicilin – binding – protein*” diana de los β – lactámicos) modificada con menor afinidad por los β – lactámicos (Grundmann H, et al., 2006).

Las PBPs son enzimas transpeptidasas que catalizan el paso final de la síntesis de la barrera de peptidoglicano. Los β – lactámicos son análogos estructurales de la D-alanil- D-alanina terminal de los “bloques de construcción” proteicos de la pared celular, reconocidos por los PBPs uniéndose a su sitio activo de manera irreversible e inhibiendo así la síntesis de la pared celular. Este mecanismo de resistencia por una PBP modificada se produce también en *S. aureus* (Grundmann H, et al., 2006).

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

Generalmente las patologías asociadas a *S. aureus* son: infecciones cutáneas, neumonías, artritis sépticas, osteomielitis y sepsis (Togneri A, et al., 2017).

La necesidad de solucionar estas complicaciones que cada día van dificultando los tratamientos clínicos convencionales, ha forzado la creación de nuevos métodos para analizar la sensibilidad bacteriana y encontrar alternativas naturales, a menudo de origen vegetal, que aporten características antimicrobianas de interés. Así, por ejemplo, en la región ecuatoriana existe una enorme diversidad de flora y una arraigada tradición shamánica de los pueblos originarios, en el empleo de remedios naturales para diversas indicaciones. Entre las bebidas preparadas por los shamanes locales, tenemos la ayahuasca, que en el país se prepara a partir de *Psycotrya viridis* y *Banisteriopsis caapi*.

Psycotrya viridis contiene elevadas dosis de dimetiltriptamina (DMT), que es un potente psicotrópico y responsable de sus efectos enteógenos (de alteración de la conciencia). Al administrarse oralmente, este compuesto, similar a la serotonina, es rápidamente degradado por la monoaminoxidasa (MAO) en el intestino e hígado. La función, de la *B. caapi* en esta bebida, es proporcionar inhibidores de MAO como las β – carbolinas que prolongan la vida media del DMT potenciando así sus efectos (Pomilio A, et al., 1999).

El interés de este trabajo, sin embargo, se centra en otras propiedades interesantes de las β –carbolinas y otros alcaloides presentes en *B.caapi*. Dentro de los efectos más importantes, encontramos la actividad antimicrobiana (estudios demuestran la eficiencia de alcaloides como el indol y la bencilisoquinolina frente a *E.coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*) así como también una actividad antiparasitaria (como el efecto de inhibición sináptica de pirazina sobre *Ascaris* y los efectos de inhibición de crecimiento de *Trypanosoma cruzi* causado por harmina, atropina y quinina) (Rodriguez et al., 1982).

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

Por todo lo anterior, en este trabajo se plantea analizar diferentes extractos de *B.caapi* ricos en β – carbolinas, para evaluar el efecto antimicrobiano sobre ciertas cepas bacterianas de interes clínico (*K. pneumoniae* y *S.aureus*) con la finalidad de ofrecer una alternativa biotecnológica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Todos los reactivos, disolventes, materiales (fungibles y no fungibles) y equipos a excepción del equipo HPLC fueron proporcionados por la UISEK (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Reactivos

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

Tabla 3. 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
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

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

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 seco 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 β - CARBOLINAS DE *B. caapi*

La extracción de β - carbolinas se realizó siguiendo el procedimiento descrito por (Perez, M. 2020) que a continuación describimos.

2.2.1.1. Preparación del material vegetal

Se emplearon únicamente los tallos de *B. caapi* por almacenar la mayor cantidad de β - carbolinas (Santos et al., 2020). Éstos se molieron hasta alcanzar una granulometría fina (≈ 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 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.

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

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 24h 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 β – 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. 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 Na₂SO₄.

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 6 de resultados.

2.2.2. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS POR HPLC

El análisis de β – 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 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 equilibrado de la columna fue de 15 min 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.

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

2.2.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS DE *B. caapi*

2.2.3.1 Cultivo de microorganismos

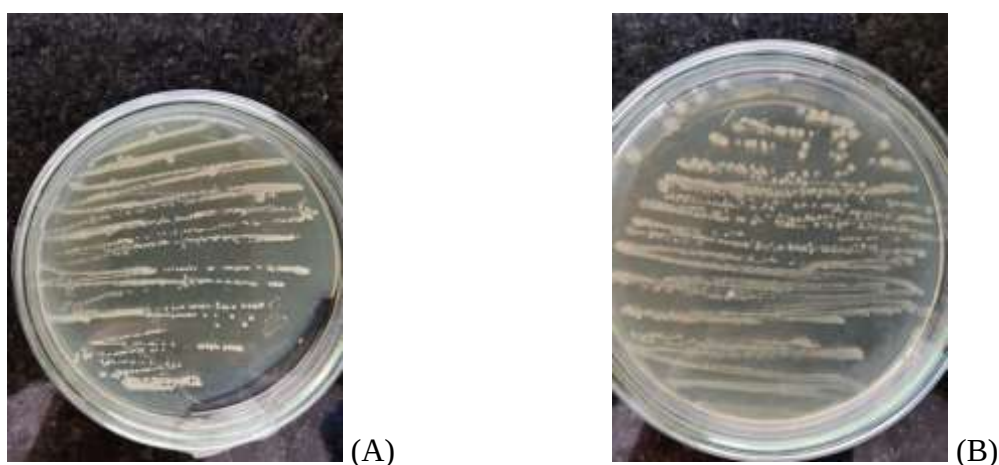
Tabla 4. Medios de cultivo

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 $7,3 \pm 0,1$

Las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC1705) 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 4) , bajo condiciones controladas de temperatura (38°C) por 24h.

Como se observa en la Figura 1, *S. aureus* ATCC25923 formó colonias blancas pequeñas, lisas, brillantes y convexas; mientras que *K. pneumoniae* ATCC1705 formó colonias blancas, irregulares y mucoides de gran tamaño.

Figura 1. Colonias aisladas de *S.aureus* (A) y *K.pneumoniae* (B) en agar nutritivo



EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella 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 5 muestra la composición de los estándares de McFarland empleados y el valor aproximado de UFC/ml al que cada uno corresponde.

Tabla 5. Valores de turbidez McFarland frente a su densidad celular equivalente

Standard McFarland (U.A)	$BaCl_2$ (mL)	H_2SO_4 (mL)	Conteo Densidad Celular Aproximada ($\times 10^8$ UFC/mL)
0,5	0,05	9,95	$1,5 \times 10^8$
1,0	0,1	9,9	$3,0 \times 10^8$
2,0	0,2	9,8	$6,0 \times 10^8$
3,0	0,3	9,7	$9,0 \times 10^8$
4,0	0,4	9,6	$12,0 \times 10^8$

Para la obtención de bacterias en condiciones óptimas para realizar el ensayo de microdilución en caldo, *S.aureus* y *K. pneumoniae* se sembraron en agar nutritivo y se incubaron por 24h. 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 10 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 de caldo Mueller – Hinton obteniendo así nuestro inóculo final.

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella 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 μ L, se incluyeron 284 μ L de inóculo final, 6 μ L de extracto metanólico o metanol solo (control negativo, C-) y 10 μ L de H₂O o una disolución del antibiótico levofloxacina (control positivo, C+). De esta manera, los pocillos correspondientes al control positivo tuvieron una concentración de 3 mg/ml de levofloxacina, 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 μ 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 7 de resultados.

Tras 24 h 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 expresaron 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 evaluados, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un post test de Dunnett, 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

EFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

numéricamente en las figuras 3-8, y la significancia estadística de los post test mediante asteriscos (*p= <0,05 ; ** p= <0,01 ; *** p= <0,001 ; **** p= <0,00001).

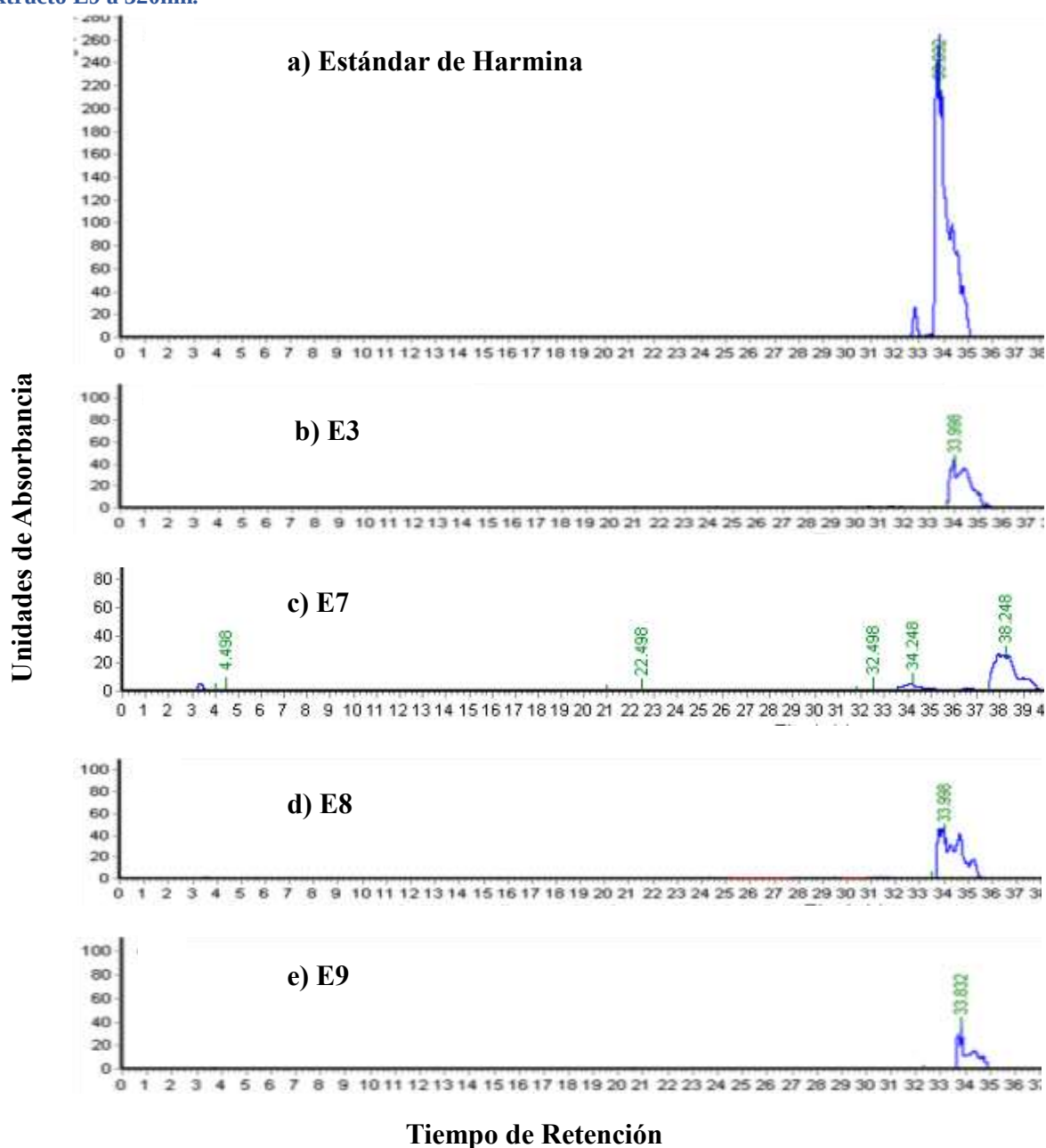
Para el análisis estadístico y la representación gráfica se empleó el programa informático GraphPad Prism 9.1, de la casa comercial GraphPad Software (EEUU).

3. RESULTADOS

3.1 Los extractos de *Banisteriopsis caapi* presentan concentraciones significativas de harmina

Los extractos vegetales fueron analizados por HPLC de fase reversa. Las condiciones de cromatografía se describen en el apartado 2.2.2 de Métodos.

Figura 2. Identificación de harmina por HPLC de fase reversa. Detector al máximo de harmina: 320nm. a) estándar de harmina; b) Extracto E3 a 320nm, c) Extracto E7 a 320nm; d) Extracto E8 a 320nm y e) Extracto E9 a 320nm.



EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

En la figura 2 se muestran cromatogramas representativos de los extractos de *B. caapi* (Fig. 2, b – e) y del estándar comercial puro de harmina (Fig. 2, a), una de las β – carbolinas más importantes en esta planta, con el detector ajustado al máximo de absorbancia de la misma, es decir 320 nm. Para todos los extractos menos para el E7 (c), se identifica con claridad un pico que coincide en tiempo de retención (≈ 33.8 min) con el del estándar de harmina, por lo que podemos concluir que se trata de este alcaloide.

Para la cuantificación absoluta de harmina en los extractos, los valores de área bajo la curva obtenidos mediante HPLC de fase reversa para cada uno de ellos, se intrapolaron a una curva patrón de harmina comercial aplicando los factores de dilución correspondientes.

Como puede observarse en la tabla 6, el extracto E3 es el que presenta mayor concentración de β – carbolinas (47 mM) seguido de E9 (13 mM) y E8 (3.8 mM). Tal y como se mencionó anteriormente y se mostró en el cromatograma, el extracto E7 no presentó concentraciones apreciables de harmina.

Tabla 6. Cuantificación absoluta de harmina en extractos de *B.caapi*

Extracto	Variante	Concentración Harmina (mM)	gr de partida (maceración)	Concentración normalizada (mM/gr)
E3	Antigua	47	340	0,138
E7	Nueva	0	250	-
E8	Nueva	13	200	0,065
E9	Antigua	3,7	50	0,074

3.2 Los extractos de *Banisteriopsis caapi* tienen actividad antibiótica

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de *B. caapi* por lo que, tras su análisis y cuantificación, se procedió a evaluar su efecto contra dos cepas de bacterias (*Staphylococcus aureus* ATCC25923 y *Klebsiella pneumoniae*

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

ATCC1705). Para ello se empleó la metodología de microdilucion en caldo descrita en el apartado X de Métodos (Stephen J, *etal.* 2005).

Debido a que los extractos se evaluaron antes de poder cuantificar de manera absoluta su concentración de β – carbolinas (de alguna de las más importantes al menos), de todos ellos se realizaron las mismas diluciones: 2x, 1x, 1/2x, 1/5x y 1/10x. En un volumen final de 200 μ l se aplicaron 4 μ l de la dilución correspondiente o 4 μ l de metanol como control. Esto se tradujo en una serie de concentraciones distinta para cada uno de los extractos que se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones finales para cada extracto dependiendo el factor de dilución

Extracto	Factores de Dilución				
	2x	x	1/2x	1/5x	1/10x
	[μM]	[μM]	[μM]	[μM]	[μM]
E3	1900	950	475	190	95
E8	540	270	135	54	27
E9	149	74	37	15	7

Una vez transcurrido el periodo de incubación de las bacterias con los extractos (24 horas a 38°C), se empleó la OD 600 nm como indicador del crecimiento bacteriano. Tal y como puede observarse en la figura 3, todos los extractos menos E7 tuvieron un efecto extremadamente significativo (ANOVA $p < 0.0001$) sobre el crecimiento de *S. aureus*. Lo mismo puede observarse, aunque con menor intensidad, para *K. pneumoniae* (Fig. 4). En este último caso, el efecto de E9 no llega a la significancia estadística (ANOVA $p = 0.0583$) aunque está cerca. De hecho, sí es estadísticamente significativo el efecto de la mayor concentración para este extracto (149 μ M).

EFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

Figura 3. Densidad óptica medida a 600nm para placa con inóculo *S.aureus*. C+: Control Positivo (Metanol + Levofloxacina); C-: (Metanol al 2%). Dunnett's post test: Control negativo Vs Tratamiento (*p= <0,05 ** p= <0,01 * p= <0,001 **** p= <0,00001)**

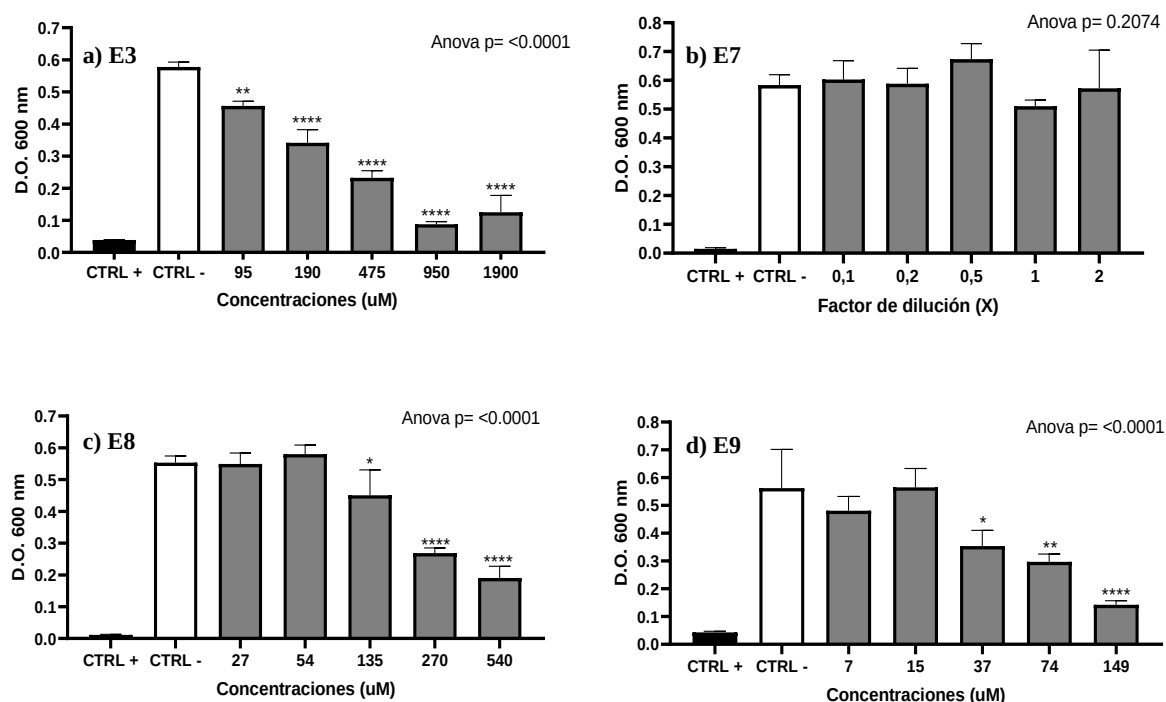
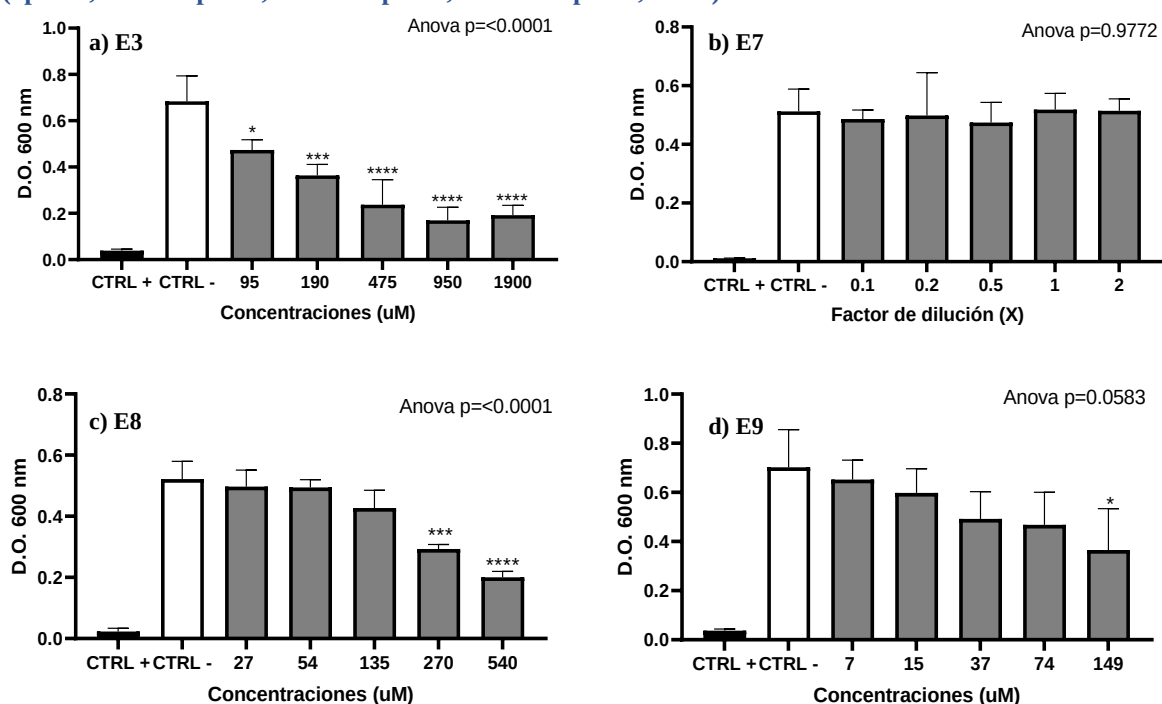


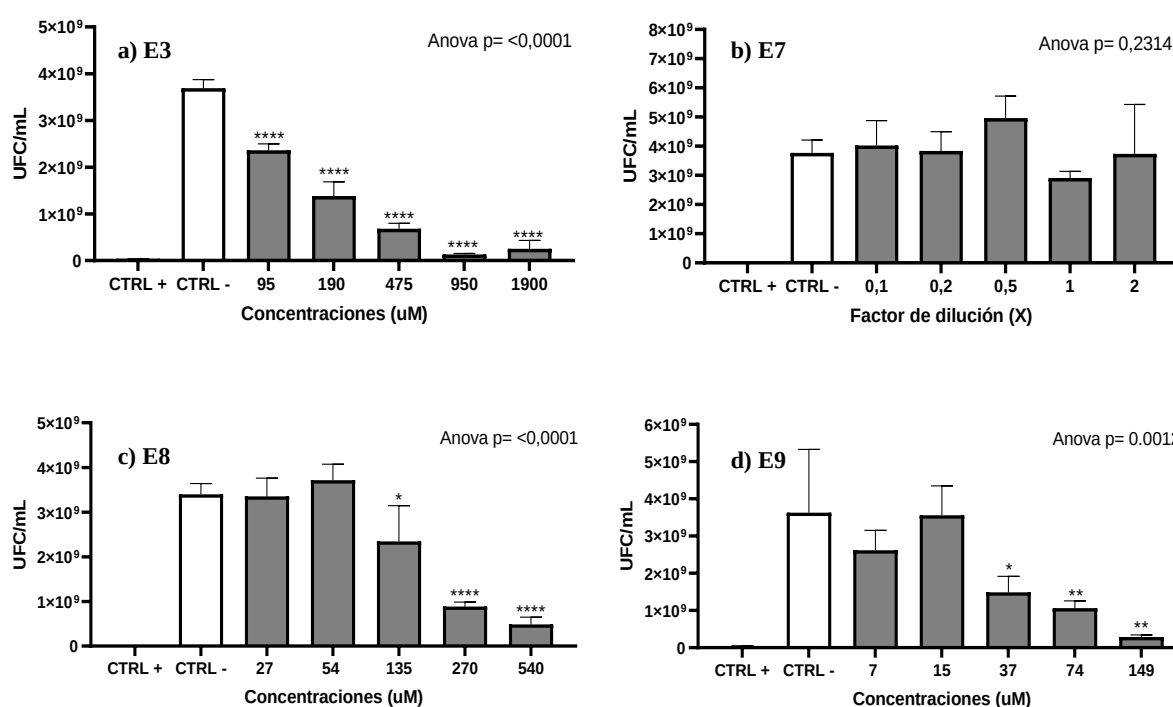
Figura 4. Densidad óptica medida a 600nm para placa con inóculo *K.pneumoniae*. C+: Control Positivo (Metanol + Levofloxacina); C-: (Metanol al 2%). Dunnett's post test: Control negativo Vs Tratamiento (*p= <0,05 ** p= <0,01 * p= <0,001 **** p= <0,00001)**



EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

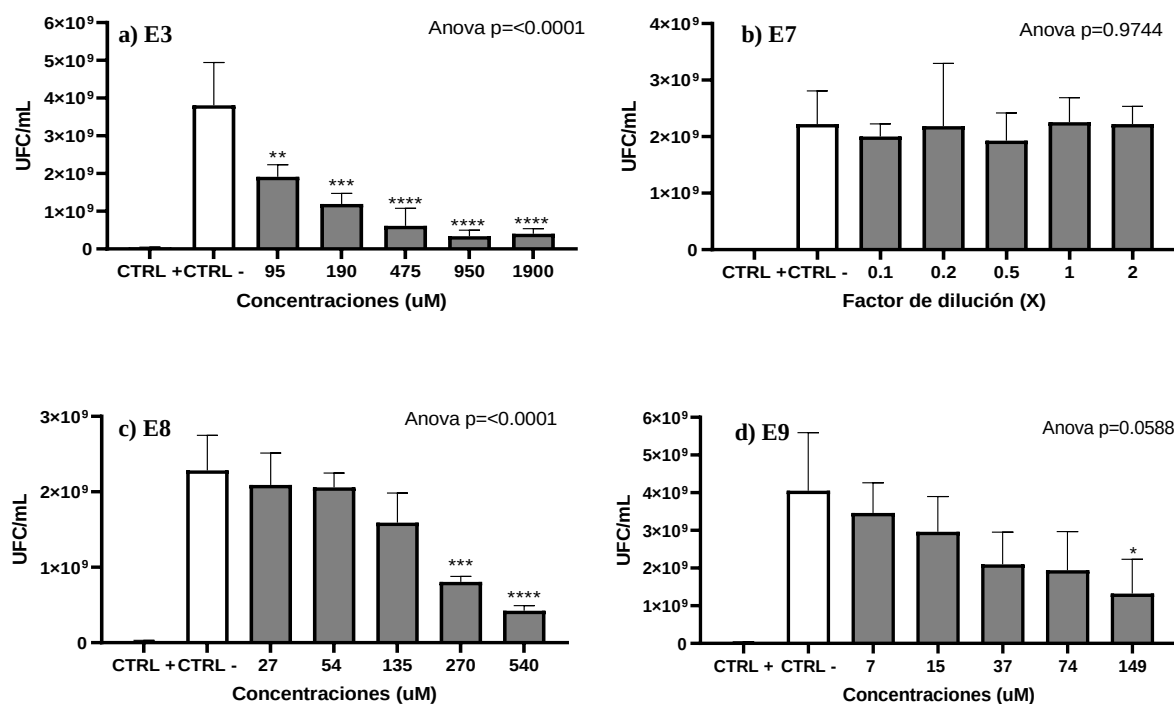
Para el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento que nos permitiera estimar la IC₅₀, se trasladaron los valores de OD 600 nm a número de unidades formadoras de colonias (UFC). Para ello, se realizaron diluciones seriadas de cultivos de concentración de células conocida (por comparación con estándares McFarland) y se midió su OD 600 nm, construyendo así una recta patrón para cada uno de las bacterias ensayadas. Tal y como puede observarse, ni la forma de las curvas ni los valores de significancia estadística varían mucho representando los efectos de este modo (Fig. 5 y 6).

Figura 5. Unidades formadoras de colonia (UFC) para S.aureus. C+: Control Positivo (Metanol + Levofloxacina); C-: (Metanol al 2%). Dunnett's post test: Control negativo Vs Tratamiento (*p= <0,05 ** p= <0,01 * p= <0,001 **** p= <0,00001)**



EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

Figura 6. Unidades formadoras de colonia (UFC) para *K.pneumoniae*. C+: Control Positivo (Metanol + Levofloxacin); C-: (Metanol al 2%). Dunnets post test: Control negativo Vs Tratamiento (* $p= <0,05$ ** $p= <0,01$ * $p= <0,001$ **** $p= <0,00001$)**

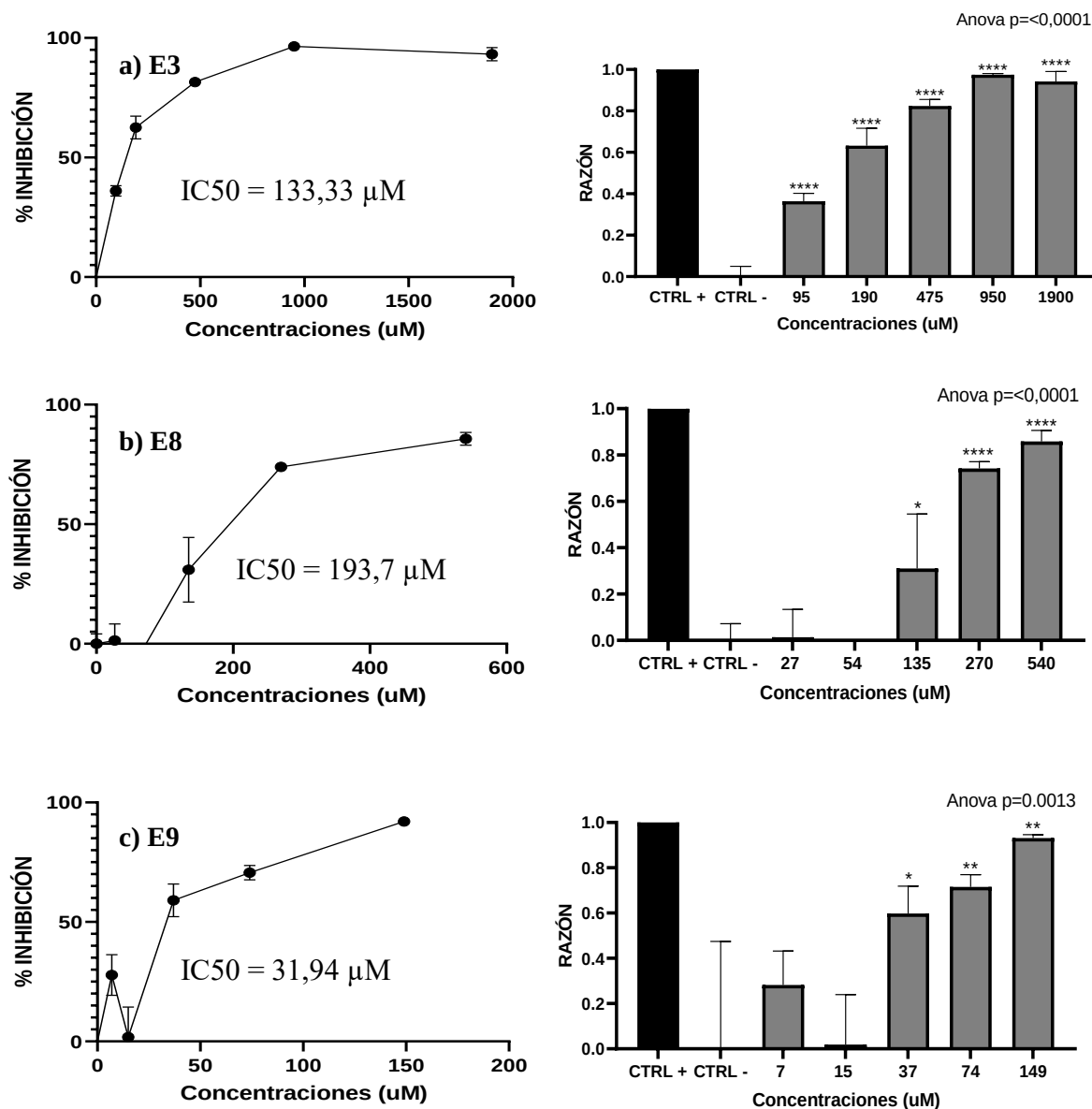


Para conocer el efecto de los extractos, se analizaron dos indicadores: razones (Efecto Tratamiento / Efecto de C+) y el valor IC₅₀. Tal y como puede observarse en las figuras 7 y 8, el extracto más potente tanto contra *S. aureus* como contra *K. pneumoniae*, es decir, el de menor IC₅₀ (31.94 y 45.83 μ M respectivamente), fue el extracto E9, perteneciente a la variedad antigua. Así mismo, el extracto de mayor eficacia, es decir, el que alcanzaba un mayor grado de inhibición (o una razón más cercana a 1), fue el E3 de la variante antigua. Sin embargo, E8 de la variante nueva tuvo más eficacia que el E9 de la variante antigua.

En definitiva, podemos decir que la variante vieja resultó más potente que la nueva, aunque no podemos afirmar concluyentemente que sea más o menos eficaz.

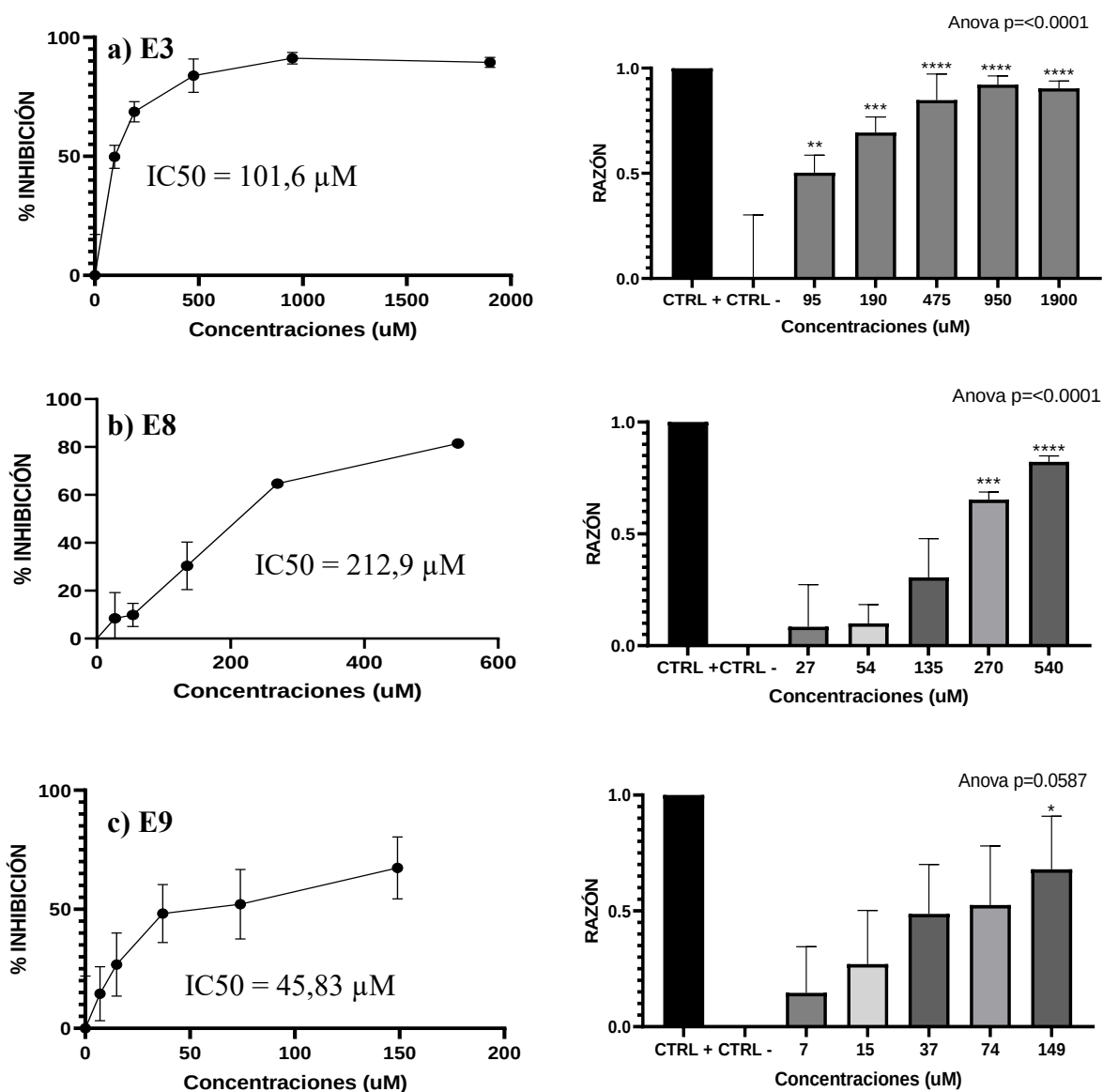
EFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

Figura 7. Porcentajes de Inhibición y Razones para S.aureus. Se muestra además el IC50 absoluto. C+: Control Positivo (Metanol + Levofloxacina); C-: (Metanol al 2%). Dunnett's post test: Control negativo Vs Tratamiento (*p= <0,05 ** p= <0,01 * p= <0,001 **** p= <0,00001)**



EFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

Figura 8. Porcentajes de Inhibición y Razones para *K.pneumoniae*. Se muestra además el IC50 absoluto. C+: Control Positivo (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)**



4. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue demostrar la eficacia de los extractos de *B. caapi* contra el crecimiento bacteriano. En ese sentido, se demostró claramente el notable efecto antibiótico que poseen extractos de esta planta provenientes de dos variedades (Fig. 3-8)

Mediante HPLC, se pudo cuantificar la concentración de harmina, lo que nos permitió estimar la potencia de cada uno de ellos a través de la IC_{50} (Wang et al., 2010). Los resultados se muestran en la tabla 6 y, tal y como puede observarse, las concentraciones se correlacionan con la materia prima de partida, siendo las eficiencias de extracción (mM harmina / g *B. caapi*) muy similares para E8 y E9 y solo del doble para E3. Se podría complementar la cuantificación de harmina a través de espectrometría de masas como lo señalan (Shaheen H, Issa M, 2020), quienes obtuvieron resultados similares de actividad antibacteriana, en este caso, sobre bacterias fitopatógenas. Estos datos corroborarían el amplio espectro de acción de las β – carbolinas.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que, en los extractos, están presentes otros muchos compuestos, entre ellos otras β – carbolinas, que no pudimos cuantificar, por lo que no se pueden descartar efectos debidos a distintas proporciones de β – carbolinas, o a la presencia - ausencia de algún compuesto en particular. Así por ejemplo, (Kaur et al., 2019) evalúan múltiples β – carbolinas con efectos inhibitorios representativos sobre bacterias *S.aureus*, *P. aeruginosa*, *K.pneumoniae*. Por ese motivo, los valores de IC_{50} deben tomarse con precaución puesto que no estamos analizando el efecto de un único compuesto puro.

Cabe recalcar que, en el único extracto donde no detectamos harmina (E7), una de las β – carbolinas principales en *B. caapi*, tampoco pudimos observar efectos antibacterianos, por lo que podemos afirmar con cierta seguridad, de que los efectos observados en esta investigación

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

se deben, al menos en parte, a este alcaloide. A ese respecto, por ejemplo, (Al-Bayati, Al-Mola. 2008) reportaron en un estudio, para *K. pneumoniae*, una MIC (concentración mínima inhibitoria) de 1.25 mg/mL (5889 μ M) únicamente para harmina. Nuestros extractos muestran una IC_{50} mucho menor, entre 46 y 213 μ M, siendo IC_{50} siempre mayor que MIC, lo que apunta a efectos combinados de varios principios activos. A pesar de eso, sí pudimos establecer, que el extracto más potente fue el E9 de la variedad antigua, puesto que, de manera consistente en ambos microorganismos evaluados, mostró las menores IC_{50} (Fig. 7 y 8).

Para el cálculo de la eficacia, es decir, el extracto que lograba un mayor porcentaje de inhibición, se calcularon las razones (Efecto del tratamiento / Efecto del C+) para cada una de las concentraciones y extractos en cada una de las bacterias.

De esta manera, pudimos comprobar que, para *S. aureus*, todos los extractos alcanzaban niveles de inhibición y razones similares. Obviamente, en los extractos más potentes como E9 se consiguió a menor concentración. Para *K. pneumoniae*, sin embargo, sí hubo diferencias en la eficacia de los extractos. Curiosamente, para este microorganismo, el extracto más potente, fue el menos eficaz. Efectivamente, el extracto E9, no llegó a alcanzar una inhibición del 70%. En definitiva, podemos afirmar que la variedad antigua, tuvo mayor efecto antibiótico puesto que en general es más potente y eficaz.

Entre los mecanismos mediante los que las β – carbolinas podrían provocar los efectos observados, (Ahmad et al., 2020) mencionan el bloqueo de las ADN topoisomerasas, lo que interferiría con la síntesis de ADN y por tanto con la replicación bacteriana. Por otro lado, también se ha descrito que las β – carbolinas se unen al ADN causando daños estructurales (Nafisi et al.,2010).

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

Por todo lo expuesto, se recomendaría a futuro analizar la capacidad mutagénica de los extractos de *B.caapi* (Test de Ames), así como sus otras propiedades de interés clínico (actividades antiparasitarias y anticancerígenas) que han sido descritas en algunos estudios similares (Ahmad et al., 2020).

5. CONCLUSIONES

- El extracto de *B.caapi* presenta una notable actividad antibacteriana.
- La variante antigua de *B. caapi* es más potente y eficaz en términos de actividad antibacteriana en comparación a las variantes nuevas.
- Ambos microorganismos, *S. aureus* y *K. pneumoniae*, tienen una sensibilidad similar a los extractos de *B. caapi*

6. RECOMENDACIONES

- Realizar futuros ensayos como el Test de Ames, RT-PCR para complementar información a nivel molecular y poder así descubrir los mecanismos subyacentes.
- Hacer uso de herramientas bioinformáticas para predecir dianas de acción de las β -carbolinas (limitado por bases de datos).
- Para evitar complicaciones en la columna C18 del HPLC fase reversa, correr los estándares y extractos junto a protocolos de limpieza continuos.
- Emplear otras técnicas analíticas como cromatografía de gases y espectrometría de masas, para poder identificar más compuestos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, I., Fakhri, S., Khan, H., Jeandet, P., Aschner, M., & Yu, Z. L. (2020). Targeting cell cycle by β -carboline alkaloids in vitro: Novel therapeutic prospects for the treatment of cancer. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 330). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109229>
- Al-Bayati, F. A., & Al-Mola, H. F. (2008). Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tribulus terrestris* L. growing in Iraq. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 9(2), 154–159. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0720251>
- Alós, J. I. (2015). Antibiotic resistance: A global crisis. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 33, Issue 10, pp. 692–699). Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Alpuche Celia, D. C. (2002). *Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos*.
- Altamirano, J. (2018). *Identificación del tipo de Resistencia a antibióticos en seis especies bacterianas presentes en leche cruda de cabra expandidas en el sur de Quito*. <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/9866/1/UDLA-EC-TMVZ-2018-41.pdf>
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Atif Nisar, M., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Usman Qamar, M., Khalid, M., Salamat, F., & Baloch, Z. (2018). *Infection and Drug Resistance Dovepress Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis*. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- CDC. (2013). *Biggest Threats and Data | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC*. https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fdrugresistance%2F

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

biggest_threats.html

- Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J., & Tiemersma, E. (2006). Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. In *Lancet* (Vol. 368, Issue 9538, pp. 874–885). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68853-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68853-3)
- Guzmán Camilo, Rodríguez Virginia, C. R. A. (2018). *Análisis de usos y resistencia a antibióticos en una UCI de Montería, Colombia*. <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v24n2/0122-0667-rmri-24-02-75.pdf>
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., & Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In *Trends in Microbiology* (Vol. 9, Issue 10, pp. 486–493). [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02175-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02175-8)
- Kaur, M., Jangra, M., Singh, H., Tambat, R., Singh, N., Jachak, S. M., Mishra, S., Sharma, C., Nandanwar, H., & Pinnaka, A. K. (2019). *Pseudomonas koreensis* recovered from raw yak milk synthesizes a β -carboline derivative with antimicrobial properties. *Frontiers in Microbiology*, 10(JULY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01728>
- Martin, R. Bachman, M. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 8, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
- Mazón Sánchez, S., Anabel, J., Román, S. V., & Stanislao, J. (2019). *Factores de Riesgo que influyen en el desarrollo de las Enfermedades Nosocomiales*.
- MSP. (2016). *Líneas de investigación del INSPI*. http://www.investigacionsalud.gob.ec/wp-content/uploads/2016/10/linas_de_investigacion_inspi.pdf
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. In *FEMS Microbiology Reviews*

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

(Vol. 41, Issue 3, pp. 252–275). Oxford University Press.

<https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>

OMS. (2002). *Promoting rational use of medicines*. <https://www.who.int/activities/promoting-rational-use-of-medicines>

Perez, M; Arisqueta, L. (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*.

[https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/3747/1/Maria José Pérez Marvit.pdf](https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/3747/1/Maria%20Jos%C3%A9%20P%C3%A9rez%20Marvit.pdf)

Pomilio, A. B., Vitale, A. A., Ciprian-Ollivier, J., Cetkovich-Bakmas, M., Gómez, R., & Vázquez, G. (1999). Ayahoasca: An experimental psychosis that mirrors the transmethylation hypothesis of schizophrenia. *Journal of Ethnopharmacology*, 65(1), 29–51. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00163-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00163-9)

Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., & Claverys, J. P. (2006). Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen streptococcus pneumoniae. *Science*, 313(5783), 89–92. <https://doi.org/10.1126/science.1127912>

Rodriguez, E., Cavin, J. C., & West, J. E. (1982). The possible role of amazonian psychoactive plants in the chemotherapy of parasitic worms - a hypothesis. *Journal of Ethnopharmacology*, 6(3), 303–309. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(82\)90053-8](https://doi.org/10.1016/0378-8741(82)90053-8)

Sánchez Choez, X., Armijos Acurio, M. L., & Jimbo Sotomayor, R. E. (2018). “Appropriateness and adequacy of antibiotic prescription for upper respiratory tract infections in ambulatory health care centers in Ecuador.” *BMC Pharmacology and Toxicology*, 19(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s40360-018-0237-y>

Santos, B. W. L., de Oliveira, R. C., Sonsin-Oliveira, J., Fagg, C. W., Barbosa, J. B. F., &

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

- Caldas, E. D. (2020). Biodiversity of β -carboline profile of banisteriopsis caapi and ayahuasca, a plant and a brew with neuropharmacological potential. *Plants*, 9(7), 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants9070870>
- Shaheen, H. A., & Issa, M. Y. (2020). In vitro and in vivo activity of Peganum harmala L. alkaloids against phytopathogenic bacteria. *Scientia Horticulturae*, 264. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108940>
- Stephen, & Al.], J. C. . . . [et. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*.
- Togneri, A. M., Podestá, L. B., Pérez, M. P., & Santiso, G. M. (2017). Study of Staphylococcus aureus infections in a general acute care hospital (2002-2013). *Revista Argentina de Microbiologia*, 49(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.006>
- 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. (2010a). 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>
- Wang, Y.-H., Samoylenko, V., Tekwani, B. L., Khan, I. A., Miller, L. S., Chaurasiya, N. D., Rahman, M., Tripathi, L. M., Khan, S. I., Joshi, V. C., Wigger, F. T., & Muhammad, I. (2010b). Composition, Standardization and Chemical Profiling of Banisteriopsis caapi, a Plant for the Treatment of Neurodegenerative Disorders Relevant to Parkinson's Disease †. *J Ethnopharmacol*, 128(3), 662–671. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.02.013>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Colonias aisladas de S.aureus (A) y K.pneumoniae (B) en agar nutritivo</i>	21
<i>Figura 2. Identificación de harmina por HPLC de fase reversa. Detector al máximo de harmina: 320nm. a) estándar de harmina; b) Extracto E3 a 320nm, c) Extracto E7 a 320nm; d) Extracto E8 a 320nm y e) Extracto E9 a 320nm.....</i>	25
<i>Figura 3. Densidad óptica medida a 600nm para placa con inóculo S.aureus. C+: Control Positivo (Metanol + Levofloxacin); C-: (Metanol al 2%). Dunnett's post test: Control negativo Vs Tratamiento (*p= <0,05 ** p= <0,01 *** p= <0,001 **** p= <0,00001)</i>	28
<i>Figura 4. Densidad óptica medida a 600nm para placa con inóculo K.pneumoniae. C+: Control Positivo (Metanol + Levofloxacin); C-: (Metanol al 2%). Dunnett's post test: Control negativo Vs Tratamiento (*p= <0,05 ** p= <0,01 *** p= <0,001 **** p= <0,00001)</i>	28
<i>Figura 5. Unidades formadoras de colonia (UFC) para S.aureus. C+: Control Positivo (Metanol + Levofloxacin); C-: (Metanol al 2%). Dunnett's post test: Control negativo Vs Tratamiento (*p= <0,05 ** p= <0,01 *** p= <0,001 **** p= <0,00001)</i>	29
<i>Figura 6. Unidades formadoras de colonia (UFC) para K.pneumoniae. C+: Control Positivo (Metanol + Levofloxacin); C-: (Metanol al 2%). Dunnett's post test: Control negativo Vs Tratamiento (*p= <0,05 ** p= <0,01 *** p= <0,001 **** p= <0,00001)</i>	30
<i>Figura 7. Porcentajes de Inhibición y Razones para S.aureus. Se muestra además el IC50 absoluto. C+: Control Positivo (Metanol + Levofloxacin); C-: (Metanol al 2%).</i>	

EFEECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

*Dunnets post test: Control negativo Vs Tratamiento (*p= <0,05 ** p= <0,01 *** p= <0,001 **** p= <0,00001) 31*

*Figura 8. Porcentajes de Inhibición y Razones para K.pneumoniae. Se muestra además el IC50 absoluto. C+: Control Positivo (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) 32*

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Años de descubrimiento de antibióticos y sus posteriores resistencias bacterianas</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 2. Reactivos.....</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 3. Equipos.....</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 4. Medios de cultivo</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 5. Valores de turbidez McFarland frente a su densidad celular equivalente. 22</i>	
<i>Tabla 6. Cuantificación absoluta de harmina en extractos de B.caapi.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 7. Concentraciones finales para cada extracto dependiendo el factor de dilución</i>	<i>27</i>

EFFECTO DE LAS β - CARBOLINAS DE *Banisteriopsis caapi* SOBRE CEPAS BACTERIANAS *Staphylococcus aureus* Y *Klebsiella pneumoniae*

ANEXOS

Figura 8. Curva de calibración (Densidad óptica vs. UFC) para *S. aureus*

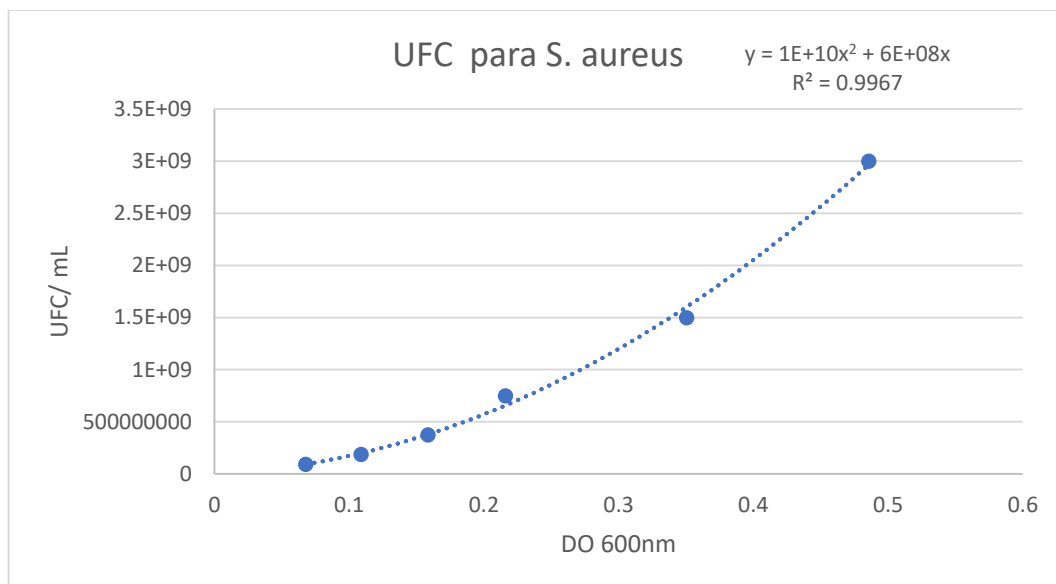


Figura 9. Curva de calibración (Densidad óptica vs. UFC) para *K. pneumoniae*

