

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolicinas  
EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS  
GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**



**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolicinas  
EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS  
GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS.”**

Realizado por:

**SANTIAGO ANDRÉ CADENA ULLAURI**

Director del Proyecto:

**Dr. Lino Arisqueta Herranz, Ph.D.**

Como requisito para la obtención del título de:

**MÁSTER EN BIOMEDICINA**

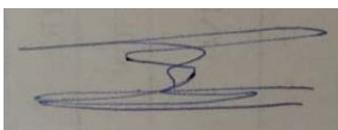
Quito, 22 de Junio de 2021

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolicinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

**DECLARACIÓN JURAMENTADA**

Yo, SANTIAGO ANDRÉ CADENA ULLAURI, con cédula de identidad 1724221781, 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.



Santiago André Cadena Ullauri

C.I. 1724221781

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolicas  
EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS  
GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS  
DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**“EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolicas  
EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS  
GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS.”**

Realizado por:

**SANTIAGO ANDRÉ CADENA ULLAURI**

como Requisito para la Obtención del Título de:

**MÁSTER EN BIOMEDICINA**

ha sido dirigido por el profesor

**LINO ARISQUETA HERRANZ**

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



PhD. Lino Arisqueta Herranz

DIRECTOR

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolinas  
EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS  
GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS  
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

Quito, 22 de Junio de 2021

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbólinas  
EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS  
GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

**AGRADECIMIENTO**

A mis padres, porque todo lo que soy es por, para y gracias a ustedes. Ustedes son mi fortaleza, mi ejemplo y mi impulso para seguir adelante.

A mi hermana, por su apoyo incondicional y alegría que ilumina mis días.

A mi tutor Lino, por toda la paciencia, esfuerzo, tiempo y dedicación.

A todas las personas que de una u otra forma me han apoyado en este camino.

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolicas  
EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS  
GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

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

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

Proyecto:

**“Evaluación de los efectos biológicos de las  $\beta$ -carbolicas de *Banisteriopsis caapi* en modelos  
celulares”**

Perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Salud.

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolicas  
EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS  
GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

22/06/2021

Para ser enviado:

To be submitted:

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolicas  
EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS  
GRAM-POSITIVAS Y GRAM-NEGATIVAS**

Santiago André Cadena Ullauri<sup>1</sup>, Lino Arisqueta<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud, Quito,  
Ecuador.

\*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: Ph.D. Lino Arisqueta Herranz

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ciencias de la Salud

Teléfono: 0983104230; email: [lino.arisqueta@uisek.edu.ec](mailto:lino.arisqueta@uisek.edu.ec)

# EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolidas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

## Resumen

A nivel global, existe una creciente preocupación en el incremento de resistencia a antibióticos por parte de bacterias, a tal punto que ya han aparecido y diseminado cepas de bacterias resistentes a varios tipos de antibióticos, dejando incluso a algunos de estos obsoletos. Por esta razón, organizaciones como la OMS promueven la continua búsqueda de nuevos principios activos que nos permitan combatir a estos microorganismos. En ese sentido, Ecuador es un país megadiverso muy rico en flora y fauna, por esto se debería impulsar la búsqueda de estos nuevos principios activos, debido al impacto que podrían tener en el Sistema de Salud Pública, y por la utilidad económica que el país podría recibir. Es por ese motivo que en el presente trabajo se analizó la capacidad antibacteriana de extractos de *Banisteriopsis caapi*, planta típica de la región amazónica del Ecuador, que contienen  $\beta$  – carbolidas como su principio activo. Éstas han demostrado tener efecto antibacteriano, antitumoral y antiparasitario y podrían ser una buena alternativa en la lucha contra la resistencia a antibióticos.

Los extractos se analizaron mediante HPLC, cuantificando la harmina en todos ellos y se comprobó la eficacia antimicrobiana contra varias cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas como (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*) que a menudo suponen un problema por las infecciones nosocomiales de microorganismos resistentes. Los extractos 3, 8 y 9 presentaron harmina en su composición. Mientras que, el extracto 7 no presentó harmina. Se empleó el método de microdilución en caldo que permitió, a partir de los % de inhibición establecer los IC<sub>50</sub> para comparar potencias y eficacias de los distintos extractos y de estos con los antibióticos empleados como control positivo. Se identificó que la bacteria Gram-Positiva *Enterococcus faecalis* fue la más sensible frente a los extractos. Además, se encontró que el extracto 3 fue el más eficaz, alcanzando razones mayores a 1 en comparación con los controles positivos. Asimismo, el extracto 9 mostró ser el más potente al

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolicinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

presentar los valores de IC<sub>50</sub> más bajos. Nuestros resultados concluyen que los extractos de *B. caapi* son eficaces inhibiendo el crecimiento de las bacterias analizadas con potencia y eficacia comparables a los de antibióticos comerciales. **Palabras clave:** *Banisteriopsis caapi*, microdilución en caldo, HPLC, bacterias, actividad antibacteriana.

## **EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolidas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

### **Abstract:**

Globally, there is growing concern about the increase in antibiotic resistance by bacteria; consequently, several strains of bacteria resistant to various types of antibiotics have appeared and spread to such an extent that some of these are now obsolete. For this reason, organizations, such as the WHO, promote the continuous search for new active principles that allow us to combat these microorganisms. In that sense, Ecuador is a privileged country in terms of flora and fauna, so the search for these new active principles should be promoted. These active principles could positively impact the Public Health System, and the country could receive an economic benefit. For this reason, the present work analyzes the antibacterial capacity of extracts of *Banisteriopsis caapi*, a typical plant of the Amazon region of Ecuador, which contains  $\beta$ -carbolides as its active principle. These have been shown to have antibacterial, antitumor, and antiparasitic effects and could be a good alternative in fighting antibiotic resistance.

The extracts were analyzed by HPLC, quantifying harmine in all of them. The antimicrobial efficacy was verified against several Gram-positive and Gram-negative bacteria such as (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*) which are often a problem due to nosocomial infections of resistant microorganisms. Extracts 3, 8, and 9 showed harmine in their composition. On the other hand, extract 7 did not show any harmine. The broth microdilution method was used, which allowed, from the % of inhibition, to establish the IC<sub>50</sub> to compare potencies and efficiencies of the different extracts and these with the antibiotics used as positive control. The Gram-positive bacteria *Enterococcus faecalis* was identified as the most sensitive.

Furthermore, extract 3 was identified as the most effective, with results comparable to positive controls. In addition, extract 9 showed the highest potency with the lowest IC<sub>50</sub> values. Our

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolidas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

results conclude that *B. caapi* extracts are effective in inhibiting the growth of the bacteria analyzed with potency and efficacy comparable to those of commercial antibiotics.

**Key Words:** *Banisteriopsis caapi*, broth microdilution, HPLC, bacteria, antibacterial activity.

# EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

## 1. INTRODUCCIÓN

La ayahuasca es una bebida psicoactiva que se usa como elemento central en rituales religiosos, mágicos y curativos en la Amazonía, en los países de Ecuador, Perú, Colombia y Brasil. El nombre ayahuasca proviene del lenguaje Quechua, donde *aya* significa ancestros o alma y *wasca* vino o soga, por lo tanto la traducción se refiere a “vino del alma” e inclusive hay quienes la conocen como “soga de la muerte” (Frecka et al., 2016). Esta bebida está compuesta por dos plantas la *Banisteriopsis caapi*, la cual contiene alcaloides  $\beta$ -carbolínicos, como harmina, harmalina y tetrahydroharmina; y *Psychotria viridis*, que provee el compuesto psicoactivo *N,N-dimetiltriptamina* (DMT) (Frecka et al., 2016; Hamill et al., 2018). La importancia de esta bebida ha crecido en los últimos años, pues más gente ajena a la Amazonía se une a estos rituales en busca de crecimiento personal, sanación emocional y contacto con deidades y espíritus sagrados. En consecuencia, la investigación científica en relación a las plantas mezcladas en esta bebida se ha incrementado, lo que ha llevado al descubrimiento de beneficios fisiológicos, bioquímicos y neurofarmacológicos del consumo de estas plantas (Frecka et al., 2016; Hamill et al., 2018).

Se han identificado las  $\beta$ -carbolinas como los principales compuestos proporcionados por *B. caapi* a la infusión de ayahuasca, siendo estas consideradas como las responsables de potenciar y posibilitar los efectos visionarios producidos por DMT que las personas experimentan al tomar esta bebida (Callaway et al., 1999; Santos et al., 2020). Las  $\beta$ -carbolinas son un grupo de alcaloides que poseen una estructura de anillo tricíclico (9H – pirido[3,4-b]indol) (Cao et al., 2007). Se clasifican a estas moléculas de acuerdo a la saturación del anillo de seis miembros que contiene nitrógeno. Los miembros saturados se denominan  $\beta$ -carbolinas, mientras que los parcial o completamente saturados, dihidro $\beta$ -carbolinas o tetrahidro $\beta$ -

## **EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

carbolinas, respectivamente (Cao et al., 2007). Las  $\beta$ -carbolinas que se encuentran en la *B. caapi* son principalmente la harmina, harmalina y tetrahydroharmina. La harmina y harmalina funcionan como inhibidores específicos y reversibles de la monoaminooxidasa tipo A (MAO-A), el enzima que degrada DMT cuando se ingiere oralmente, y la tetrahydroharmina contribuye a la inhibición de la recaptación de la serotonina. Todo esto, unido al DMT, provoca el potente efecto psicoactivo de la ayahuasca (Callaway et al., 1999).

Los efectos de las  $\beta$ -carbolinas también se han investigado a nivel celular. Se ha evidenciado que las  $\beta$ -carbolinas tienen la capacidad de intercalarse en el ADN, lo que conlleva a que existan alteraciones en la fidelidad de la replicación y procesos de reparación del ADN (Callaway et al., 1999; Cao et al., 2007). Por ejemplo, Ayoob, I. et al., 2017 demostró que la harmina, extraída de raíces de *Peganum harmala*, exhibía actividad citotóxica con un IC<sub>50</sub> de 32, 33, 45, 61 y 106  $\mu$ M contra células HBL-100, HCT-116, HT-29, HELA y A549, respectivamente (Ayoob et al., 2017). Asimismo, Jiménez, J. et al., 2008 encontró que la harmina extraída de la *B. caapi* en altas concentraciones indujo a las células a entrar en un proceso apoptótico (Jiménez et al., 2008).

Existe evidencia acerca de la función antibiotica de  $\beta$ -carbolinas extraídas de *Peganum harmala* contra cepas patogénicas de *E.coli* (Alamin et al., 2015). De igual forma, se encontró que presenta un efecto inhibitorio contra cepas de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas (A. Ahmad et al., 1992; Nenaah, 2010). La información acerca de la función antibacteriana de las  $\beta$ -carbolinas extraídas de *B. Caapi* es limitada. Sin embargo, resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio, han evidenciado que provoca la inhibición en el crecimiento de bacterias Gram (-), como *E.coli* y *P.aeruginosa* por el método de difusión en agar (Perez - Marvit MJ. 2020).

## **EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbólinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

A nivel global, existe una creciente preocupación sobre el incremento de resistencia a antibióticos por parte de bacterias. El principal factor de riesgo es el uso indiscriminado que actualmente se le da a este tipo de tratamiento. Como consecuencia, aparecieron y se diseminaron cepas de bacterias resistentes a varios tipos de antibióticos, a tal punto, que algunos de estos ya son obsoletos (Nenaah, 2010; Van Den Bogaard & Stobberingh, 2000). Se estima que 700 000 personas fallecen cada año debido a bacterias resistentes. Además, el impacto económico es significativo. Se estima que cada año en Estados Unidos se gastan más de 20 mil millones de dólares en tratamientos contra bacterias resistentes (O'Neill, 2016). Es por esto que, la Organización Mundial de la Salud (OMS) aconseja que se recurra a medicinas naturales, a base de plantas y sus extractos, como tratamiento contra enfermedades microbianas (Nenaah, 2010).

Para la presente investigación, se escogieron bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las bacterias Gram-positivas poseen una pared celular gruesa compuesta de peptidoglucano, ácidos teicoicos, proteínas, lipoteicoicos y polisacáridos complejos. Esta envuelta es un elemento clave para la estructura, supervivencia y replicación de las bacterias. Se las clasifica como Gram-positivas debido a que en el método de tinción estas bacterias retienen el tinte azul en su pared celular, el cual es visible bajo un microscopio (Sizar & Unakal, 2020; Murray et al., 2016). Una de las características más alarmantes de esta clase de bacterias es su crecimiento altamente variable y sus patrones de resistencia (Sizar & Unakal, 2020). Las bacterias Gram-positivas pueden causar enfermedades inflamatorias, incluyendo neumonía, meningitis, endocarditis, artritis e infecciones a la piel, tracto urinario y gastrointestinales (Kulkarni et al., 2019). Su tratamiento está basado principalmente en el uso de antibióticos entre los cuales figuran betalactámicos, vancomicina, macrólidos, fluoroquinolonas, y

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbólinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

doxiciclina. Sin embargo, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus faecalis* emergen entre los microorganismos principales responsables del problema de resistencia a los antibióticos que lleva a un aumento en la mortalidad y morbilidad de los pacientes (Kulkarni et al., 2019; Sizar & Unakal, 2020). Por otro lado, las bacterias Gram-negativas tienen una pared celular de mayor complejidad en comparación con las Gram-positivas. Ésta contiene una membrana externa que ofrece protección frente al ambiente del huésped, y una capa delgada de peptidoglucano que provee de forma y estructura a la bacteria. En medio de estas dos capas se encuentra un espacio periplásmico donde están enzimas implicadas en procesos de síntesis, degradación (entre ellas las que degradan antibióticos) y transporte (Miller & Salama, 2018). En la pared celular también se encuentran proteínas, lípidos, lipoproteínas y fosfolípidos (Murray et al., 2016). Estos microorganismos tienen la capacidad para causar importantes enfermedades en humanos y animales, afectando a los sistemas digestivo, nervioso, respiratorio, urinario y flujo sanguíneo, causando desde gastroenteritis hasta una meningitis severa. El tratamiento contra las bacterias Gram-negativas implica el uso de antibióticos combinados, pues así disminuye la posibilidad de que se desarrolle una resistencia a los mismos, ya que al igual que en las bacterias Gram-positivas, esta es una de las mayores amenazas para la salud. De hecho, se considera el problema de salud pública más significativo en el mundo, llevando a pacientes infectados a tener una mayor tasa morbilidad y mortalidad (J.Oliveira, 2020; Pontefract et al., 2020). Algunas de estas bacterias son *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Broberg et al., 2013; Guo et al., 2020; Hudson et al., 2014; Ikeda et al., 2018; Raro et al., 2020).

En la **Tabla 1**, se muestran las bacterias empleadas en el presente estudio y sus características.

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolicas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

**Tabla 1. Bacterias empleadas y principales características.**

Bacteria	Código ATCC	Principales Características	Capacidad para generar resistencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 27853 <sup>TM</sup>	Genoma: 6,887,913-bp. Gen de resistencia <i>pltZ-pltIJKNOP</i> .	Sí.
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922 <sup>TM</sup>	Genoma: 5,130,767-bp. No genes de resistencia.	No.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 29212 <sup>TM</sup>	Genoma: 3,027,060-bp. Gen de resistencia <i>tetM</i>	Sí.
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923 <sup>TM</sup>	Genoma: 2,778,854-bp. No genes de resistencia.	No.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (A)	ATCC® 2146 <sup>TM</sup>	Superbacteria Genoma: 5,781,501-bp. gen de resistencia <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> .	Sí.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (B)	ATCC® 1705 <sup>TM</sup>	Superbacteria. Genoma: 5,662,914-bp. Gen de resistencia <i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	Sí.

Ante la creciente resistencia a antibióticos por parte de las bacterias, es importante la investigación de nuevos principios activos que sean capaces de eliminar las infecciones bacterianas (O’Neill, 2016). Ecuador es un país privilegiado en cuanto a flora y fauna se refiere, y es por esto que se debería impulsar la búsqueda de nuevos principios activos, no solamente por el impacto que podría tener en el Sistema de Salud Pública, al ser una alternativa menos tóxica y de bajo costo, sino también por la utilidad económica que el país podría recibir (SNDPP, 2021). Es por esto que el objetivo general de esta tesis es evaluar la capacidad antibiótica de las  $\beta$ -carbolicas extraídas de *B. Caapi* frente a bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, partiendo de la hipótesis de que las  $\beta$ -carbolicas extraídas de *B. Caapi*

# EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolicinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

tienen una función antibacteriana que podremos evidenciar mediante ensayo de microdilucion en caldo.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Reactivos y equipos.

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

**Tabla 2. Reactivos.**

Nombre	Fórmula	Casa Comercial
Cloroformo	CHCl <sub>3</sub>	Fermont
Metanol	CH <sub>4</sub> O	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 3. Equipos.**

Nombre	Modelo	Marca
HPLC	Series 200	PerkinElmer
Lector ELISA	Multiskan Sky	ThermoScientific
Cámara de Flujo Laminar	Miniflow 120	Instrulab Q
Ultracongelador vertical	WUF-80	WISD
Espectrofómetro	DR 5000	HACH
Incubadora	B12	Heraeus Instruments
Autoclave	25X-1	All American
Bomba de vacío	R-300	BOECO
Centrífuga	XC-2450	Premiere
Rotavapor	RE301	Yamato

## **EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolicas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

pH-Metro	ORION STAR A111	ThermoScientific
Balanza Analítica	BAS31PLUS	Boeco
Refrigeradora	2015KLXB	Durex
Licudadora industrial	Teko 40L	Teko

---

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 recogida y cuando se terminó ésta se recibió la variante nueva (E7 y E8).

### **2.2 MÉTODOS**

#### **2.2.1. EXTRACCIÓN DE $\beta$ – CARBOLINAS DE *B. caapi***

La extracción de  $\beta$  – carbolicas se realizó siguiendo el procedimiento descrito por (Pérez, 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  $\beta$  – carbolicas (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

## **EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

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 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  $\beta$  – 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

## **EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### **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 GOLDTM, ThermoScientific) de 150 mm x 4,6 mm, con tamaño de partícula de 5  $\mu$ 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.

# EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

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

### 2.2.3.1 Cultivos de microorganismos:

**Tabla 4. Medios de Cultivo.**

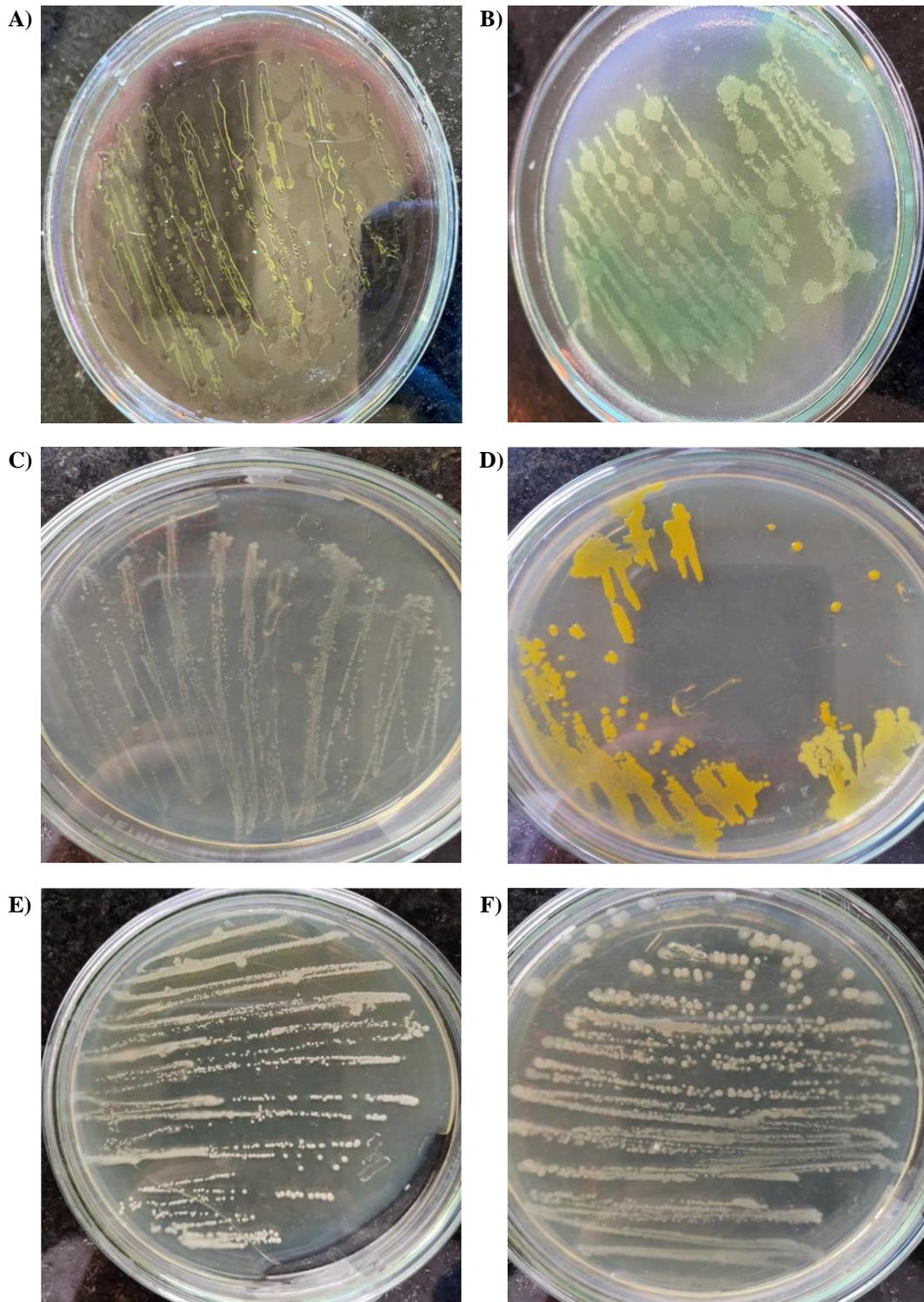
Medio de Cultivo	Composición por litro
Agar sangre	Digerido enzimático de caseína 15g; digerido enzimático de tejido animal 4g; extracto de levadura 2g; cloruro de sodio 5g; agar 14g; sangre 3mL; pH 7,0 $\pm$ 0,2.
Bacto Agar	Bacto Agar 100%. pH final N/A.
Caldo Nutritivo	Peptona de carne 5.0g; extracto de carne 3.0g. pH final 7,4 $\pm$ 0,2.
Cetrimide Agar	Digerido pancreático de gelatina 20,0g; cloruro de Magnesio 1,4g; sulfuro de potasio 10,0g; cetrimida (Bromuro de Tetradeciltrimetilamonio) 0,3g; agar 13,6g.
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.
Levine EMB Agar	Peptona de Carne 10.0g; lactosa 10.0g; fosfato dihidrogeno dipotasio 2.0g; eosin 0.4g; azul de metileno 0.065g; agar 13.5g.
Mueller Hinton II Caldo	Extracto de carne bovina 3.0g; hidrolizado ácido de caseína 17.5g; almidón 1.5g. pH final 7,3 $\pm$ 0,1.

Las cepas bacterianas *Escherichia coli* (ATCC® 25922<sup>TM</sup>), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853<sup>TM</sup>), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923<sup>TM</sup>), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 2146<sup>TM</sup> y ATCC® 1705<sup>TM</sup>) y *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212<sup>TM</sup>) fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) del Ecuador.

## **EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolicas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

Para el mantenimiento de las bacterias, las bacterias *Escherichia coli* fueron sembradas en agar EMB (eosina y azul de metileno), las *Pseudomonas aeruginosa* en agar cetrimide, las *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 1705<sup>TM</sup> en caldo nutritivo, las *Enterococcus faecalis* en agar sangre y las *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 2146<sup>TM</sup> en infusión cerebro-corazón (**Tabla**). Todas las bacterias fueron cultivadas bajo condiciones controladas de temperatura (38° C) por 24h. *E.coli* formó colonias de color verde fosforescente grandes, irregulares, brillantes y convexas (**Figura 1A**). *P. aeruginosa* colonias verdes, irregulares y mucoides de gran tamaño (**Figura 1B**). *E. faecalis* colonias de tamaño pequeño, blancas, mucoides y redondas (**Figura 1C**). *K. pneumoniae* ATCC® 2146<sup>TM</sup> colonias amarillas de tamaño mediano, redondas y lisas (**Figura 1D**). *S. aureus* colonias de color blanco, brillantes, convexas y listas (**Figura 1E**). *K. pneumoniae* ATCC® 1705<sup>TM</sup> colonias grandes, blancas, mucoides y de forma irregular (**Figura 1F**).

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolidinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**



**Figura 1. Cultivos en placa de bacterias utilizadas en el estudio.** A) Colonias de *E. coli* en medio agar EMB. B) colonias de *P. aeruginosa* en medio agar cetrimide. C) Colonias de *E. faecalis*, D) colonias de *K. pneumoniae* A (ATCC® 2146<sup>TM</sup>), E) colonias de *S. aureus*, F) Colonias de *K. pneumoniae* B (ATCC® 1705<sup>TM</sup>) en medio nutritivo.

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolicinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

### 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 <sub>2</sub> (mL)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (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, *E. coli* sembró en agar EMB, *P. aeruginosa* en agar cetrimide, *E. faecalis* en infusión de cerebro corazón, *K. pneumoniae* ATCC® 2146<sup>TM</sup> en agar sangre, *S. aureus* y *K. pneumoniae* ATCC® 1705<sup>TM</sup> en medio nutritivo. 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 6,75 mL obteniendo así nuestro inóculo final.

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolidas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

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.coli* y *E.faecalis* y levofloxacina para *P.aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* (control positivo, C+). De esta manera, los pocillos correspondientes al control positivo tuvieron una concentración de 3  $\mu$ g/mL de ampicilina y 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 de 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, en los valores de UFC/mL, 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. Para las razones se utilizó un t-test no pareado, comparando las razones mayores a 1 con el control positivo. En estos test estadísticos, se consideró que las diferencias eran estadísticamente

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolidas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

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

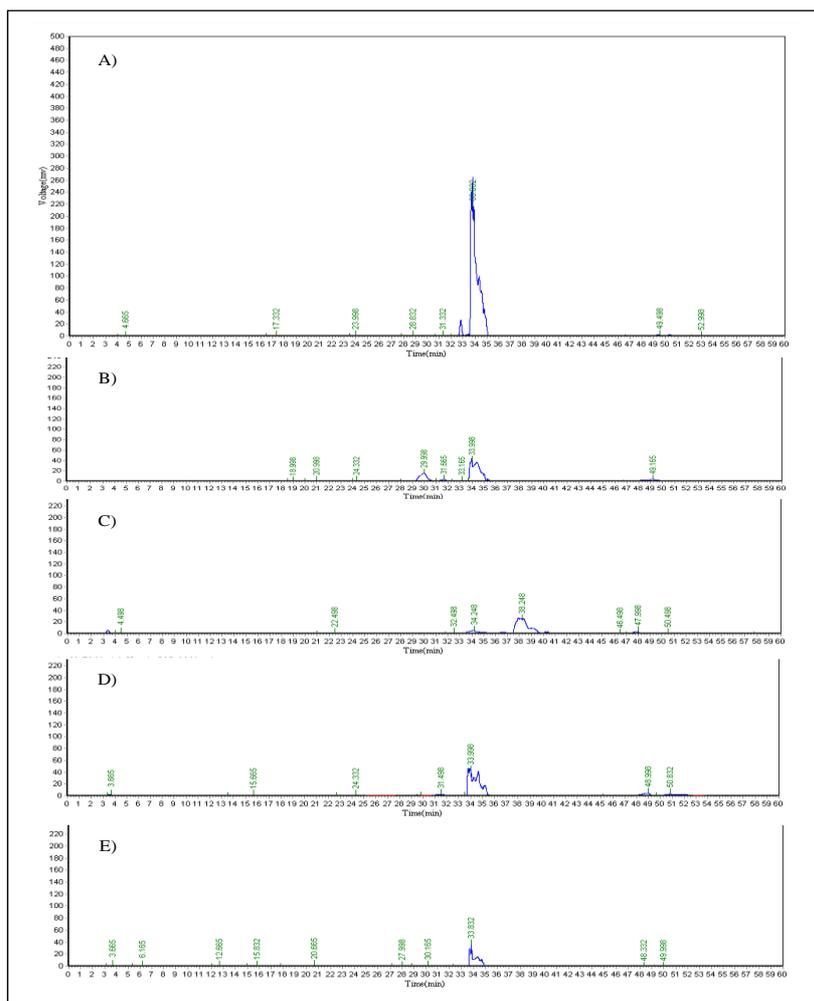
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 LOS EXTRACTOS DE $\beta$ – CARBOLIDAS EXTRAÍDAS DE *B. caapi*

##### PRESENTAN HARMINA EN SU COMPOSICIÓN.

Los extractos de  $\beta$  – carbolidas extraídas de *B. caapi* fueron analizados cuantitativa y cualitativamente mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa con el objetivo de determinar su concentración de harmina, una de las principales  $\beta$  – carbolidas presentes en *B. caapi*. Se realizaron distintas diluciones dependiendo del color que mostraban, como posible indicador de las concentraciones: Extracto 3 (1:500), Extracto 7 (1:10), Extracto 8 (1:100), Extracto 9 (1:250). Los extractos fueron analizados a una longitud de onda de 320nm, máximo de absorción de la harmina (Wang et al., 2010). La **Figura 2** muestra cromatogramas representativos obtenidos como resultado del análisis por HPLC. Se observa que los tiempos de retención de los extractos 3, 8 y 9 (**Figura 2B, 2D, 2E**) son alrededor de 33.8 min, y estos valores concuerdan con el tiempo de retención del estándar comercial de harmina (**Figura 2A**), denotando que los extractos 3, 8 y 9 contienen harmina en su composición. Por otro lado, el tiempo de retención del extracto 7 es alrededor de 37.5 min lo que indica la presencia de otro compuesto distinto a la harmina.

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS



**Figura 2. Resultados HPLC extractos de  $\beta$  – carbolinas extraídas de *B. Caapi* y estándar de harmina evaluados a 320nm. A) Solución estándar de Harmina. B) Extracto 3. C) Extracto 7. D) Extracto 8. E) Extracto 9.**

A través de rectas patrón, utilizando concentraciones conocidas del estándar de harmina y analizando al área bajo la curva, se pudo determinar la concentración de harmina en los extractos (**Tabla 6**). El Extracto 3 mostró la mayor concentración de harmina con 47.5 mM, seguido del Extracto 8 con 13.5 mM y el Extracto 9 3.7mM. En el extracto E7, no pudo cuantificarse la harmina.

**Tabla 6. Concentración de extractos  $\beta$  – carbolinas extraídas de *B. Caapi* por HPLC.**

Extracto	Variante	Concentración de Harmina (mM)	Peso de partida (g)	Concentración normalizada (mM/g)
Extracto 3	Antigua	47.5	340	0.14
Extracto 7	Nueva	0	250	-
Extracto 8	Nueva	13.5	200	0.06
Extracto 9	Antigua	3.7	50	0.07

# EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolidas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

## 3.2 EL EXTRACTO DE $\beta$ – CARBOLIDAS EXTRAÍDAS DE *B. CAAPI* TIENE PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS.

La actividad antibacteriana del extracto de  $\beta$  – carbolidas extraídas de *B. Caapi* fue evaluada a través de microdilución en caldo (CLSI., 2012; Stephen et al., 2005), utilizando el extracto a diferentes concentraciones en cultivos de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* A y B. El protocolo utilizado fue descrito por (CLSI., 2012; Stephen et al., 2005).

Debido a que los extractos se evaluaron antes de poder cuantificar de manera absoluta su concentración de  $\beta$  – carbolidas (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 300  $\mu$ l se aplicaron 6  $\mu$ l de la dilución correspondiente o 6  $\mu$ 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 de cada extracto de  $\beta$  – carbolidas extraídas de *B. Caapi* dependiendo del factor de dilución.

Extracto	2X $\mu$ M	X $\mu$ M	1/2X $\mu$ M	1/5X $\mu$ M	1/10X $\mu$ M
E3	1900	950	475	190	95
E8	540	270	135	54	27
E9	149	74	37	15	7

Con posterioridad al periodo de incubación con los extractos, las placas fueron analizadas a una longitud de onda de 600 nm para determinar el crecimiento bacteriano por turbidez. Posteriormente, los valores de densidad óptica (OD) obtenidos (**Figura suplementaria 7**), fueron transformados a unidades formadoras de colonias (UFC), empleando como recta patrón, diluciones seriadas de cultivos de cada microorganismo a partir de una concentración de UFC/mL conocida por comparación con estándar de McFarland. A partir de

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolicinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

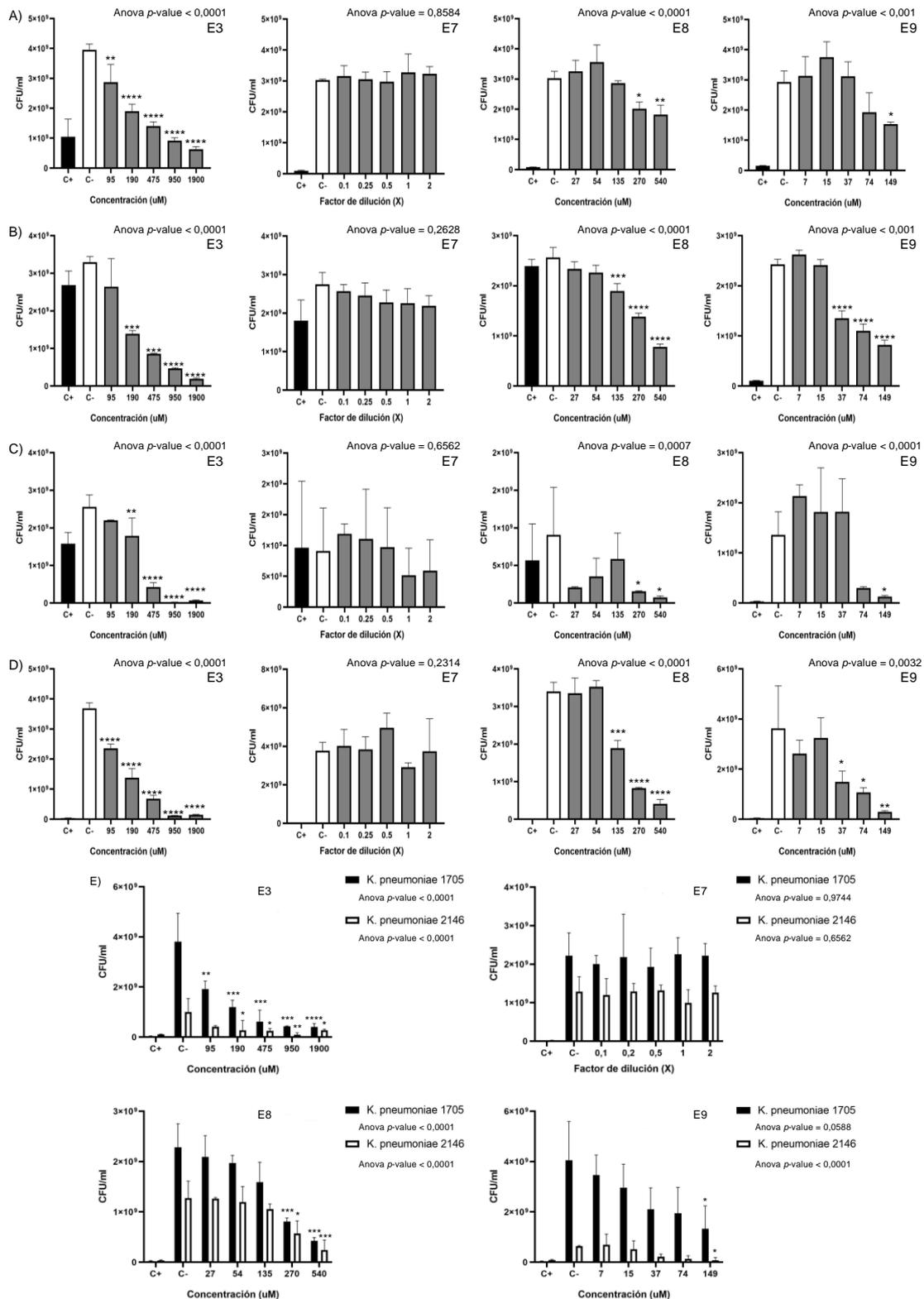
estos valores de UFC, se calcularon también los porcentajes de inhibición de crecimiento y las razones. Estas últimas, se calcularon de la siguiente manera:

$\frac{\text{Porcentaje de inhibición del tratamiento.}}{\text{Porcentaje de inhibición del control positivo}}$ , donde a mayor razón, mayor eficacia del extracto. De

la misma forma, el IC<sub>50</sub> absoluto fue obtenido, de manera gráfica, analizando las curvas de porcentaje de inhibición de crecimiento.

Para la representación del efecto de los extractos sobre el crecimiento bacteriano, nos decidimos por representar las UFC/mL frente a las distintas concentraciones de harmina (**Fig. 3**), en lugar de emplear la OD (**Figura suplementaria 7**). Ambos gráficos tienen prácticamente la misma forma, mostrando disminuciones del crecimiento bacteriano similares y prácticamente idéntica significancia estadística para el análisis de ANOVA y los post-test de Dunnet.

# EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

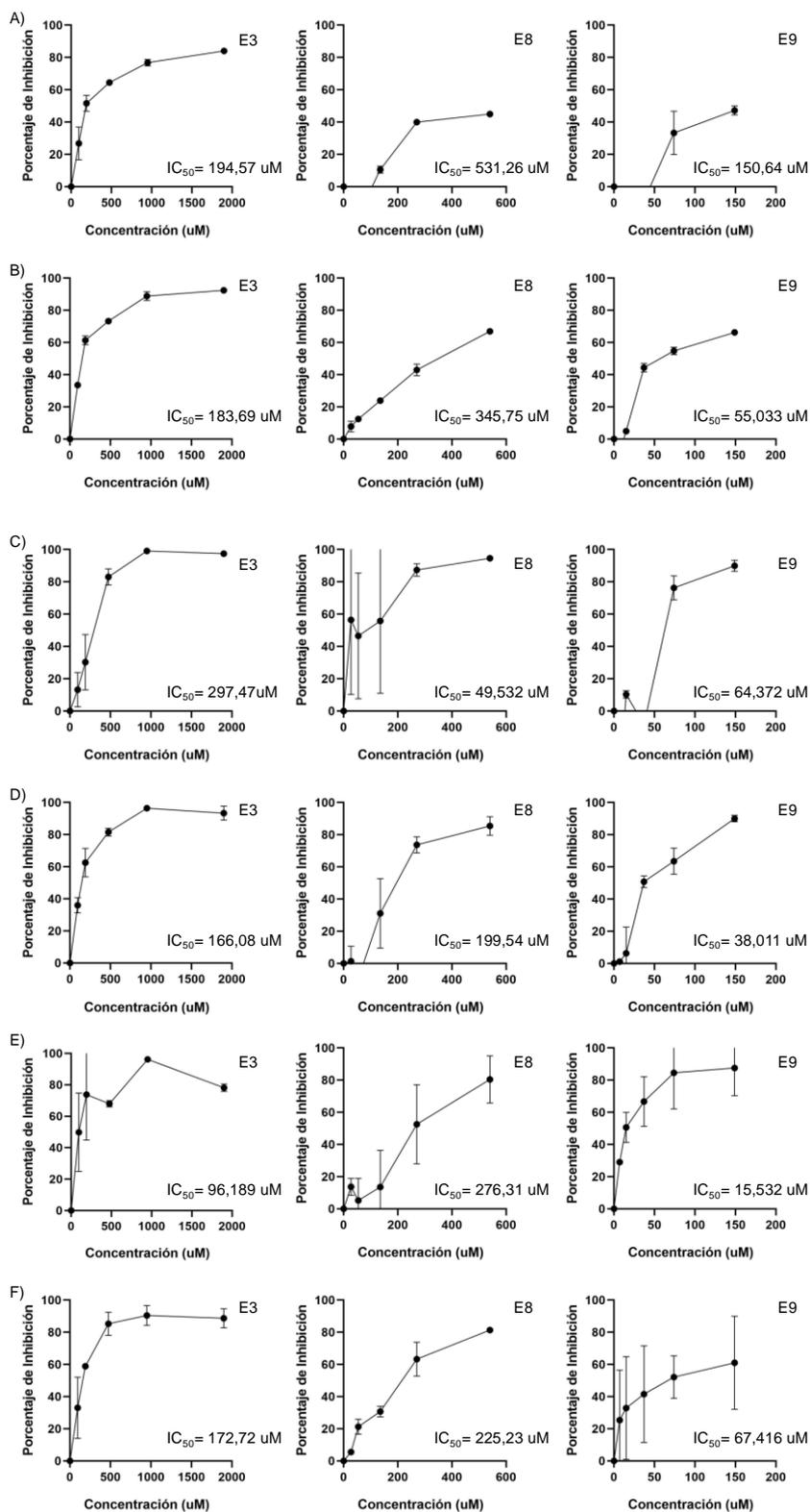


**Figura 3.** Unidades formadoras de colonias (CFU) por mL, de bacterias analizadas, después de tratamiento con extractos de  $\beta$  - carbolinas o controles. A) *P. aeruginosa*; B) *E. coli*; C) *E. faecalis*; D) *S. aureus* E) *K. pneumoniae*. C+: Control positivo (Metanol 2% + Levofloxacina para *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* o Ampicilina para *E. coli* y *E. faecalis*). C-: Control negativo (Metanol 2%). Dunnet's post-test (Control negativo vs tratamiento) (\* = p-value < 0,05; \*\* = p-value < 0,01; \*\*\* = p-value < 0,001; \*\*\*\* = p-value < 0,0001).

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolicinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

Tal y como puede observarse en la **Figura 3**, los extractos E3, E8 y E9, tuvieron un efecto significativo ( $p$  ANOVA  $< 0,001$ ) sobre el crecimiento de las todas las bacterias evaluadas (**Figuras 3A, 3B, 3C, 3D, 3E**) reflejado en un descenso de UFC/mL dependiente de la dosis. Por el contrario, el extracto E7, el único en el que no pudo cuantificarse la harmina, no tuvo efecto significativo sobre ninguna de ellas. En todos los extractos con efecto sobre el crecimiento bacteriano, al menos los dos puntos de concentración más elevada tuvieron un efecto significativo en comparación con el control negativo. El extracto E3 parece el de mayor efecto antibiótico puesto que casi todos sus puntos de concentración tienen un efecto significativo sobre el crecimiento de todas las bacterias. Entre las dos *K. pneumoniae*, evaluadas (Fig. 3E), la más sensible a nuestros extractos fue la *K. pneumoniae* A (barras blancas) puesto que presentó un descenso mayor en UFC/mL cuando se incubó con los distintos extractos. Esta diferencia fue menor para el extracto E8 que se obtuvo de una variante de *B. caapi* distinta a E3 y E9, donde estas diferencias fueron mayores. De hecho, para *K. pneumoniae* B (barras negras), el efecto global del extracto E9 no llegó a la significancia estadística ( $p$  ANOVA = 0,0588) y solo el punto de mayor concentración alcanzó una diferencia en el crecimiento bacteriano estadísticamente significativa en comparación con el control negativo.

# EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS



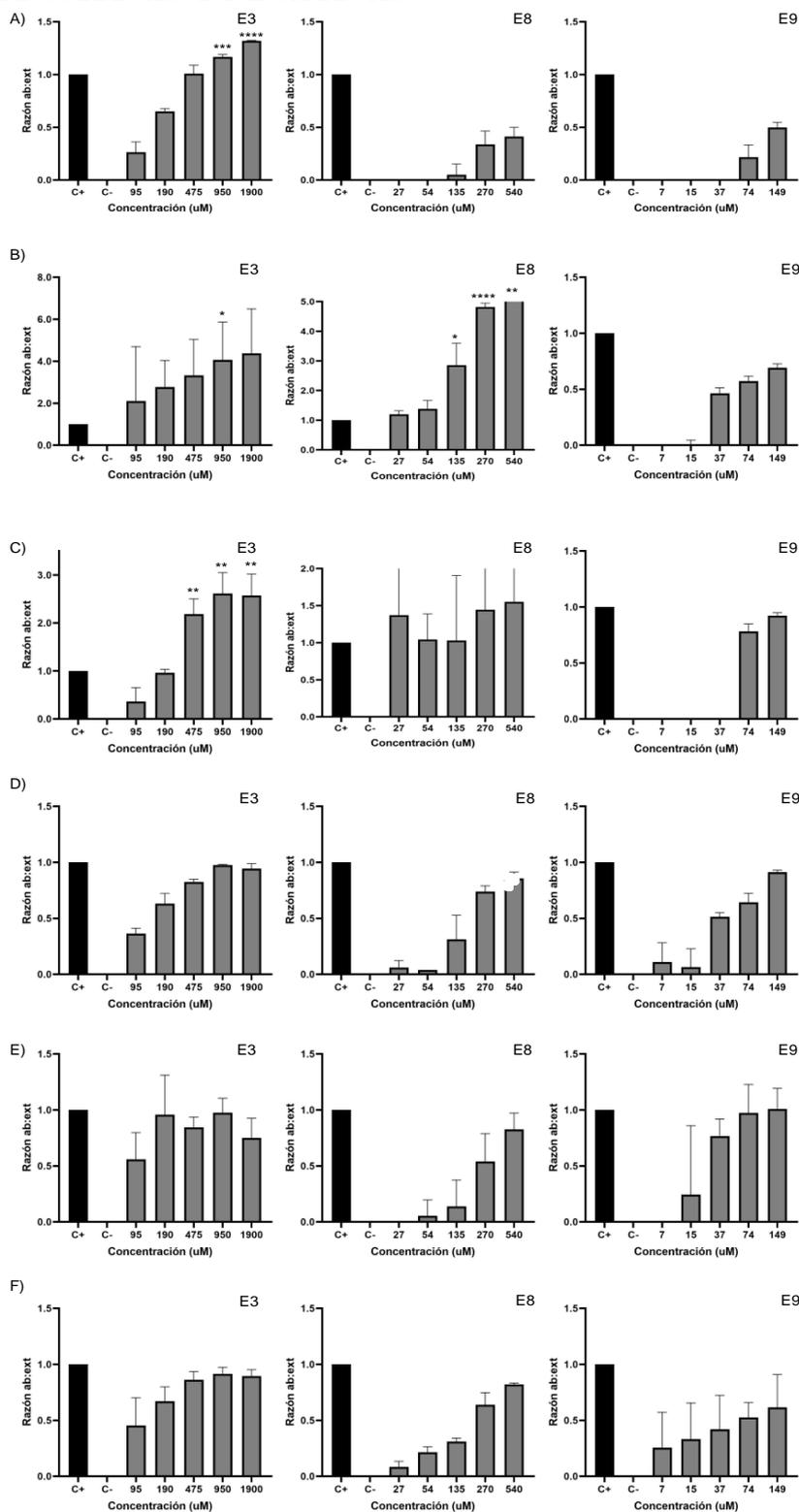
**Figura 4.** Porcentajes de inhibición de los extractos de  $\beta$ -carbolicinas o controles sobre bacterias analizadas mostrando los valores de  $\text{IC}_{50}$ . A) *P. aeruginosa*; B) *E. coli*; C) *E. faecalis*; D) *S. aureus* E) *K. pneumoniae* A. F) *K. pneumoniae* B. C+: Control positivo (Metanol 2% + Levofloxacina para *K. pneumoniae*, *S. Aureus* y *P. aeruginosa* o Ampicilina para *E. coli* y *E. faecalis*). C-: Control negativo (Metanol 2%).

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbólinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

En la **Figura 4**, se representan los valores de inhibición del crecimiento bacteriano, calculados a partir del descenso de UFC/mL, en función de las concentraciones de harmina de cada extracto. Tal y como puede observarse, el extracto E9 presentó los valores de IC<sub>50</sub> absolutos más bajos para todas las bacterias menos para *E. faecalis* (**Figura 4C**) donde, aunque por poca diferencia E8 tuvo una IC<sub>50</sub> menor. Esto nos indica que el extracto más potente es el E9. Del mismo modo, el extracto que presenta una mayor eficacia en la inhibición del crecimiento bacteriano, consiguiendo mayores porcentajes de inhibición, fue el E3, de la misma variedad de *B. caapi* que el E9. De aquí deducimos que la variedad antigua, tiene mayor efecto antibiótico.

Comparando el efecto sobre *K. pneumoniae* A y B, en ambas se alcanzaron porcentajes de inhibición más elevados con el E3 (96% y 90%, respectivamente) que con el resto de extractos (**Fig. 4E y F**), indicando que este es el más eficaz contra este microorganismo. Por el contrario, el extracto más potente, el que arrojó valores de IC<sub>50</sub> menores, fue el E9 (15,5 y 67,4  $\mu$ M respectivamente). En consonancia con una mayor sensibilidad de *K. pneumoniae* A, los valores de IC<sub>50</sub> para los extractos de la variedad antigua E3 y E9 fueron inferiores (50% menores) para esta cepa de *Klebsiella*. De hecho, en *K. pneumoniae* B, el efecto global del E9 no alcanzó la significancia estadística ( $p = 0,115$ ) (**Fig. 4F**). En relación al E8, ambas *Klebsiella* tuvieron un IC<sub>50</sub> similar (275,3 vs 225,2  $\mu$ M).

# EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS



**Figura 5. Razones entre porcentaje de inhibición obtenido por el extracto  $\beta$ -carbolicinas dividido para el porcentaje de inhibición del antibiótico.** A) *P. aeruginosa*; B) *E. coli*; C) *E. faecalis*; D) *S. aureus* E) y F) *K. pneumoniae*. C+: Control positivo (Metanol 2% + Levofloxacina para *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* o Ampicilina para *E. coli* y *E. faecalis*). C-: Control negativo (Metanol 2%). Unpaired t-test comparando los valores de razón mayores a 1 frente al control positivo (\* = p-value < 0,05; \*\* = p-value < 0,01; \*\*\* = p-value < 0,001; \*\*\*\* = p-value < 0,0001).

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

La **Figura 5.** muestra las razones entre el porcentaje de inhibición obtenido por el extracto dividido para el porcentaje de inhibición obtenido por el antibiótico en el control positivo de cada bacteria. Mediante las razones, comparamos la potencia de nuestros extractos con la del antibiótico empleado como control positivo. Por ejemplo, si la razón es = 1, tanto el extracto (a la concentración indicada) como el antibiótico tienen la misma eficacia. Si por el contrario, la razón es = 2, el extracto tiene el doble de eficacia.

Se observó que en las bacterias *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* A E3 mostró razones mayores a 1, en distintas concentraciones. Asimismo, E9 mostró razones mayores a 1 para la bacteria *K. pneumoniae* A. Para *E. coli*, se observaron razones mayores a 1 en E3, desde concentraciones de harmina de 95  $\mu$ M hasta 1900  $\mu$ M. Sin embargo, estos valores no alcanzan la significancia estadística ( $p$  ANOVA de 0, 1429). Para *K. pneumoniae* B, no se obtuvieron razones mayores a 1 con ningún extracto abundando en la idea de que es el microorganismo menos sensible de los evaluados.

En resumen, los extractos de la variedad antigua E3 y E9 presentaron mayor eficacia que E8, incluso mayor que el del antibiótico comercial empleado en los controles positivos.

### 4. DISCUSIÓN

El impacto que los microorganismos resistentes a antibióticos tienen en la salud pública a nivel mundial es una de las mayores preocupaciones de las organizaciones que velan por la salud como la OMS (Founou et al., 2017). La resistencia a antibióticos es mediada por la presencia de genes de resistencia que aparecen como resultado de la presión selectiva ejercida sobre los microorganismos, producto del uso incorrecto de antibióticos y del mal manejo de desechos de las industrias, y es agravada por el vacío que existe en el desarrollo de nuevas terapias (Founou et al., 2017; Martins & Rabinowitz, 2020). También, este problema incrementa los costos de cuidado de la salud, pues significa una mayor hospitalización,

## **EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

morbilidad y mortalidad tanto en países desarrollados como subdesarrollados (Martins & Rabinowitz, 2020). Se estima que para 2050 10 millones de muertes serán atribuidas a la resistencia a antibióticos y el impacto económico sería de 100 billones de dólares, si no se encuentran soluciones para este problema (Founou et al., 2017). Por estas razones es importante seguir buscando nuevos principios activos con la capacidad de disminuir el impacto de este problema. A través de los años la OMS ha defendido el uso de medicina natural a base de plantas y sus extractos, pues son consideradas una fuente rica en compuestos que pueden ser usados para crear nuevos fármacos y con sus mismas propiedades, además de tener el potencial de causar menos efectos secundarios (I. Ahmad et al., 2020; Garg et al., 2021; Nenaah, 2010).

El objetivo de este proyecto fue evaluar la capacidad antibacteriana de las  $\beta$  – carbolinas, obtenidas de extractos de *B. caapi*, frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas. En efecto, se evidenció que existe una inhibición en el crecimiento bacteriano.

El extracto se analizó mediante HPLC de fase reversa y se demostró la presencia de harmina en distintas concentraciones en los extractos E3, E8 y E9, pero no en E7. Es importante señalar, que los extractos no contienen solamente harmina, sino una combinación de  $\beta$  – carbolinas, por lo que los resultados no se deben atribuir solamente a la harmina. Por ejemplo, (Arshad et al., 2008) encontró que harmane y harmalina tenían una mayor capacidad de inhibición bacteriana, en comparación con la harmina. Asimismo, (Nenaah, 2010) mostró que cuando el tratamiento antimicrobiano constituía de diferentes  $\beta$  – carbolinas existía un mayor efecto, mostrando así que en realidad existe una relación sinérgica entre estos alcaloides. Por tanto, los valores de  $IC_{50}$  atribuidos en función de la harmina, deben ser tomados con precaución. Sin embargo, el extracto 7 no mostró la presencia de harmina ni inhibición en el crecimiento de las bacterias, por lo que se puede afirmar que la harmina es responsable, al menos en parte, de los efectos inhibitorios sobre el crecimiento bacteriano.

## **EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolicinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

Los porcentajes de inhibición encontrados para *P. aeruginosa* muestran una alta eficacia utilizando E3, que incluso muestra una razón mayor a 1, evidenciando que el tratamiento con el extracto muestra un mayor porcentaje de inhibición que el antibiótico, en este caso Levofloxacina. De igual forma, los porcentajes de inhibición de *E. coli*, *E. faecalis* y *S. aureus* evidencian una alta eficacia y razones mayores a 1 con el E3. Los resultados para las dos cepas de *K. pneumoniae* son dispares la cepa ATCC® 2146<sup>TM</sup> (*K. pneumoniae* A) muestra una alta sensibilidad E3, E8 y E9, con porcentajes de inhibición de 96%, 80% y 87%, respectivamente y obteniendo razones superiores a 1 con E3 y E9, mostrando que el tratamiento con estos extractos proporciona mejores resultados que los antibióticos comerciales (Levofloxacina). Cabe resaltar que esta cepa bacteriana es catalogada como una “superbacteria” por ser resistente a los carbapenémicos, por lo que los resultados obtenidos son de gran importancia clínica (Hudson et al., 2014). Por otro lado, la cepa ATCC® 1705<sup>TM</sup> (*K. pneumoniae* B) muestra eficacias mixtas con porcentajes de inhibición desde 90% a 61%, y ningún extracto supera la razón de 1. En términos de potencia, debemos tomar en cuenta que el IC<sub>50</sub> solamente se refiere a la concentración de harmina, por lo que se recomienda a futuro realizar la caracterización de todos los alcaloides presentes en los extractos. Los resultados más sobresalientes de potencia se encontraron con la cepa ATCC® 2146<sup>TM</sup> de *K. pneumoniae*, pues los IC<sub>50</sub> obtenidos fueron los más bajos, de nuevo resaltando la importancia clínica que el extracto podría llegar a tener.

El mecanismo de acción antibiótica asociado a las  $\beta$  – carbolicinas extraídas de *B. caapi* aún falta por elucidarse. Sin embargo, la literatura indica que estos alcaloides inhiben la acción de las topoisomerasas y quinasas reguladoras del ciclo celular (I. Ahmad et al., 2020; Li et al., 2010; Moura et al., 2007; Nenaah, 2010; Patel et al., 2012). De hecho, en eucariotas, promueve la apoptosis y la autofagia y provoca el arresto del ciclo celular inhibiendo la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Estos efectos se obtienen debido a que las  $\beta$  – carbolicinas tienen la capacidad

## **EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolicas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

de intercalarse en el ADN causando roturas y mutaciones en el mismo (I. Ahmad et al., 2020; Li et al., 2010; Patel et al., 2012; Moura et al., 2007). Este mecanismo, por tanto, es similar al de las fluoroquinolonas, los cuales son antibióticos de amplio espectro atacando tanto a bacterias gram-positivas como gram-negativas en infecciones del tracto respiratorio y urinario (National Institute of Diabetes and Kidney Diseases, 2020). Estos antibióticos igualmente tienen la habilidad de intercalarse en el ADN de las bacterias, inhibiendo las topoisomerasas tipo II del ADN (Bhattacharya et al., 2020). Las fluoroquinolonas más utilizadas son la ciprofloxacina, gemifloxacina, levofloxacina y moxifloxacina (National Institute of Diabetes and Kidney Diseases, 2020). Sin embargo, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) resalta que las fluoroquinolonas deben ser administradas con precaución debido a que aumenta el riesgo de enfermedades mentales. En ese sentido, y como se mencionó más arriba, los extractos naturales tienen la potencialidad de sustituir medicamentos que poseen efectos secundarios negativos. En ese sentido, en este trabajo utilizamos levofloxacina como antibiótico en el control positivo para las bacterias *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*. La bibliografía indica que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de este antibiótico es desde 0.04  $\mu\text{M}$  hasta 5  $\mu\text{M}$  (Bale et al., 1994). En este estudio, se utilizó una concentración de 8.3  $\mu\text{M}$ , con el fin de asegurar que exista una fuerte inhibición en el crecimiento de las bacterias, para poder comparar estos resultados con el de los extractos de  $\beta$  – carbolicas. Aunque es cierto que nuestros valores de  $\text{IC}_{50}$  son superiores a estos, cabe recalcar que el valor de CMI, por definición, es siempre menor al  $\text{IC}_{50}$ , parámetro empleado en el presente trabajo para harmina. A pesar de ello, estos valores no difieren de nuestras  $\text{IC}_{50}$  mucho más allá del orden de magnitud.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son alentadores, lo que justificaría análisis y estudios adicionales sobre el potencial antibiótico de los extractos de *B. caapi*. Es necesaria una caracterización total de los extractos para determinar sus componentes y

## **EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

concentraciones de cada uno. Para ello, se sugiere un análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, combinado con cromatografía de gases. Además, es vital continuar determinando la capacidad antimicrobiana, antiparasitaria y citotóxica del extracto pues se ha encontrado que las  $\beta$  – carbolinas poseen la habilidad de inhibir el crecimiento de virus, parásitos y células cancerígenas (I. Ahmad et al., 2020; Patel et al., 2012; Xing et al., 2012). Asimismo, se ha encontrado que el uso de  $\beta$  – carbolinas, junto con antibióticos, aumenta el porcentaje de inhibición en el crecimiento de microorganismos, afectando incluso a cepas resistentes a diferentes tipos de antibióticos (Hee Jae et al., 2010).

En definitiva, el presente trabajo evidencia la presencia de harmina en los extractos de *B. caapi* utilizados. Asimismo, los resultados son relevantes pues los extractos han mostrado la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas y gram-negativas, incluso en cepas resistentes a antibióticos.

### **5. CONCLUSIONES.**

Los extractos  $\beta$ -carbolinas extraídas de *B. caapi* son una fuente prometedora de tratamiento contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, con efectos comparables a los controles positivos.

Las bacterias Gram-positivas son más sensibles al tratamiento que las Gram-negativas, probablemente debido a su permeabilidad.

### **6. RECOMENDACIONES.**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son alentadores. Sin embargo, se recomienda una caracterización total de los extractos para determinar sus componentes y concentraciones de cada uno, para esto se recomienda un análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, combinado con cromatografía de gases.

Asimismo, es fundamental continuar determinando la capacidad antimicrobiana, antiparasitaria y citotóxica del extracto. Además de determinar los mecanismos moleculares

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

por los cuales los extractos tienen un efecto inhibitorio, para esto se recomienda una PCR cuantitativa y un test de Ames para detectar mutagénesis.

### 7. BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, A., Ali Khan, K., Sultana, S., Siddiqui, B. S., Begum, S., Faizi, S., & Siddiqui, S.

(1992). Study of the in vitro antimicrobial activity of harmine, harmaline and their derivatives. *Journal of Ethnopharmacology*, 35(3), 289–294.

[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90027-O](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90027-O)

Ahmad, I., Fakhri, S., Khan, H., Jeandet, P., Aschner, M., & Yu, Z. L. (2020). Targeting cell cycle by  $\beta$ -carboline alkaloids in vitro: Novel therapeutic prospects for the treatment of cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 330(July), 109229.

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109229>

Alamin, M. A., MELbadawi, S., MALqurashi, A., & Ibrahim, A. M. (2015). Antibacterial

Activities of Peganumharmala (Harmal) Seeds Against Pathogenic E. Coli strain. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem.*, 1(September), 1–4.

Arshad, N., Zitterl-Eglseer, K., Hasnain, S., & Hess, M. (2008). Effect of Peganum harmala or its B-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>

Ayoob, I., Hazari, Y. M., Lone, S. H., Shakeel-u-Rehman, Khuroo, M. A., Fazili, K. M., & Bhat, K. A. (2017). Phytochemical and Cytotoxic Evaluation of Peganum Harmala:

Structure Activity Relationship Studies of Harmine. *ChemistrySelect*, 2(10), 2965–2968.

<https://doi.org/10.1002/slct.201700232>

Bale, M. J., Jones, R. N., & Erwin, M. E. (1994). Minimum inhibitory concentration quality-control guidelines for biapenem, DU-6859a, FK-037, levofloxacin, grepafloxacin, and

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolidas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

- ceftizoxime when using various national committee for clinical laboratory standards susceptibility test methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 19(1), 65–68. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(94\)90054-X](https://doi.org/10.1016/0732-8893(94)90054-X)
- Bhattacharya, P., Mukherjee, S., & Mandal, S. M. (2020). Fluoroquinolone antibiotics show genotoxic effect through DNA-binding and oxidative damage. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 227, 117634. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117634>
- Broberg, C. A., Palacios, M., & Miller, V. L. (2013). Whole-genome draft sequences of three multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains available from the American Type Culture Collection. *Genome Announcements*, 1(3), 3–4. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00312-13>
- Callaway, J. C., Mckenna, D. J., Grob, C. S., Brito, G. S., Raymon, L. P., Poland, R. E., Andrade, E. N., Andrade, E. O., & Mash, D. C. (1999). Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 65).
- Cao, R., Peng, W., Wang, Z., & Xu, A. (2007). Carboline Alkaloids: Biochemical and Pharmacological Functions. In *Current Medicinal Chemistry* (Vol. 14).
- CLSI. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition* (Vol. 32, Issue 2).
- Founou, R. C., Founou, L. L., & Essack, S. Y. (2017). Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 12(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189621>
- Frecska, E., Bokor, P., & Winkelman, M. (2016). The therapeutic potentials of ayahuasca: Possible effects against various diseases of civilization. *Frontiers in Pharmacology*, 7(MAR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00035>
- Garg, A. K., Faheem, M., & Singh, S. (2021). *Role of Medicinal Plant in Human Health*

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolidas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

*Disease*. 11(1), 19–21.

- Guo, D. D., Luo, L. M., Ma, H. L., Zhang, S. P., Xu, H., Zhang, H., Wang, Y., Yuan, Y., Wang, Z., & He, Y. X. (2020). The Regulator PltZ Regulates a Putative ABC Transporter System PltIJKNOP of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 in Response to the Antimicrobial 2,4-Diacetylphloroglucinol. *Frontiers in Microbiology*, 11(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01423>
- Hamill, J., Hallak, J., Dursun, S. M., & Baker, G. (2018). Ayahuasca: Psychological and Physiologic Effects, Pharmacology and Potential Uses in Addiction and Mental Illness. *Current Neuropharmacology*, 17(2), 108–128. <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180125095902>
- Hee Jae, S., Lee, H.-S., & Lee, D.-S. (2010). *The synergistic antibacterial activity of 1-Acetyl-B-Carbolina and B-Lactams against Methicilin-Resistan Staphylococcus aureus (MRSA)* (pp. 501–505). *J. Microbiol. Biotechnol.*
- Hudson, C. M., Bent, Z. W., Meagher, R. J., & Williams, K. P. (2014). Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099209>
- Ikeda, M., Mizoguchi, M., Oshida, Y., Tatsuno, K., Saito, R., Okazaki, M., Okugawa, S., & Moriya, K. (2018). Clinical and microbiological characteristics and occurrence of *klebsiella pneumoniae* infection in Japan. *International Journal of General Medicine*, 11, 293–299. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S166940>
- J.Oliveira, C. R. W. (2020). Gram Negative Bacteria. *Definitions StarPearls*., 1–9. <https://doi.org/10.32388/ikoib6>
- 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.

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolidas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

<https://doi.org/10.1016/j.etp.2007.12.003>

- Kulkarni, A. P., Nagvekar, V. C., Veeraraghavan, B., Warriar, A. R., Deepak, T. S., Ahdal, J., & Jain, R. (2019). Current Perspectives on Treatment of Gram-Positive Infections in India: What Is the Way Forward? *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7601847>
- Li, S., Yang, B., Zhang, Q., Zhang, J., Wang, J., & Wu, W. (2010). Synthesis and Bioactivity of B-Carboline Derivatives. *Natural Product Communications*, 1(4), 9–12.
- Martins, A. F., & Rabinowitz, P. (2020). The impact of antimicrobial resistance in the environment on public health. *Future Microbiology*, 15(9), 699–702. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0331>
- Miller, S. I., & Salama, N. R. (2018). The gram-negative bacterial periplasm: Size matters. *PLoS Biology*, 16(1), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004935>
- Moura, D. J., Richter, M. F., Boeira, J. M., Pêgas Henriques, J. A., & Saffi, J. (2007). Antioxidant properties of  $\beta$ -carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, 22(4), 293–302. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem016>
- National Institute of Diabetes and Kidney Diseases. (2020). Fluoroquinolones. *LiverTox: Clinical and Research Information of Drug-Induced Liver Injury [Internet]*, Md.
- Nenaah, G. (2010). Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia*, 81(7), 779–782. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.04.004>
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final Reports and Recommendations. *Archives of Pharmacy Practice*, 7(3), 110. <https://doi.org/10.4103/2045-080x.186181>
- Patel, K., Gadewar, M., Tripathi, R., Prasad, S. K., & Patel, D. K. (2012). A review on

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolidas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

- medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta-carboline alkaloid “ Harmine.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(8), 660–664. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60116-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60116-6)
- Perez, M. J., & Arisqueta, L. (2020). *Optimización del método de extracción de  $\beta$ -carbolidas a partir de B. caapi y caracterización del extracto para su posterior aplicación en modelos celulares con fines terapéuticos.*
- Pontefract, B. A., Ho, H. T., Crain, A., Kharel, M. K., & Nybo, S. E. (2020). Drugs for Gram-negative bugs from 2010-2019: A decade in review. *Open Forum Infectious Diseases*, 7(7), 1–10. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa276>
- Raro, O. H. F., da Silva, R. M. C., Filho, E. M. R., Sukiennik, T. C. T., Stadnik, C., Dias, C. A. G., Oteo Iglesias, J., & Pérez-Vázquez, M. (2020). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* From Transplanted Patients in Brazil: Phylogeny, Resistome, Virulome and Mobile Genetic Elements Harboring blaKPC–2 or blaNDM–1. *Frontiers in Microbiology*, 11(July), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01563>
- Santos, B. W. L., de Oliveira, R. C., Sonsin-Oliveira, J., Fagg, C. W., Barbosa, J. B. F., & Caldas, E. D. (2020). Biodiversity of  $\beta$ -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>
- Sizar, O., & Unakal, C. G. (2020). Gram Positive Bacteria. *Definitions*, 1–6. <https://doi.org/10.32388/cgz9dj>
- SNDPP. (2021). *Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021 Toda una vida*. 1–15.
- Stephen, J. ., Rankin, I., Harbeck, R., Sautter, R., McCarter, Y., Sharp, S., Ortez, J., & Spiegel, C. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. American Society for Microbiology.
- Van Den Bogaard, A. E., & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolicas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

antibiotics: Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial*

*Agents*, 14(4), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00145-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00145-X)

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>

Xing, M., Shen, F., Liu, L., Chen, Z., Guo, N., Wang, X., Wang, W., Zhang, K., Wu, X., Wang, X., Li, Y., Sun, S., & Yu, L. (2012). Antimicrobial efficacy of the alkaloid harmaline alone and in combination with chlorhexidine digluconate against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* grown in planktonic and biofilm cultures. *Letters in Applied Microbiology*, 54(5), 475–482. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03233.x>

### ÍNDICE DE FIGURAS

*Figura 2.* Cultivos en placa de bacterias utilizadas en el estudio.

*Figura 2.* Resultados HPLC extractos de  $\beta$  – carbolicas extraídas de *B. Caapi* y estándar de harmina evaluados a 320nm.

*Figura 3.* Unidades formadoras de colonias (CFU) por mL, de bacterias analizadas, después de tratamiento con extractos de  $\beta$  – carbolicas o controles.

*Figura 4.* Porcentajes de inhibición de los extractos de  $\beta$ -carbolicas o controles sobre bacterias analizadas.

*Figura 5.* Razones entre porcentaje de inhibición obtenido por el extracto  $\beta$ -carbolicas dividido para el porcentaje de inhibición del antibiótico.

### 8. ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1. Bacterias empleadas y principales características.**

**Tabla 2. Reactivos.**

**Tabla 3. Equipos.**

**Tabla 4. Medios de Cultivo.**

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

# EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolidas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

Tabla 6. Concentración de extractos  $\beta$  – carbolidas extraídas de *B. Caapi* por HPLC.

Tabla 7. Concentraciones finales de cada extracto de  $\beta$  – carbolidas extraídas de *B. Caapi* dependiendo del factor de dilución.

## 9. MATERIAL SUPLEMENTARIO:

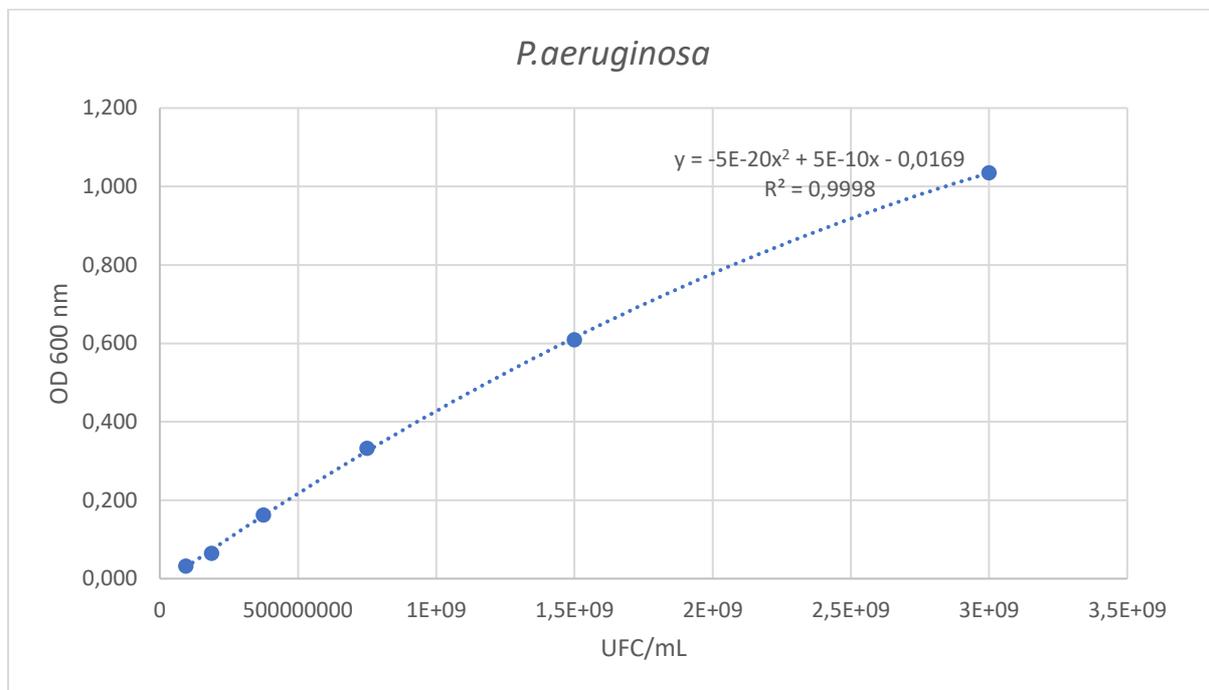
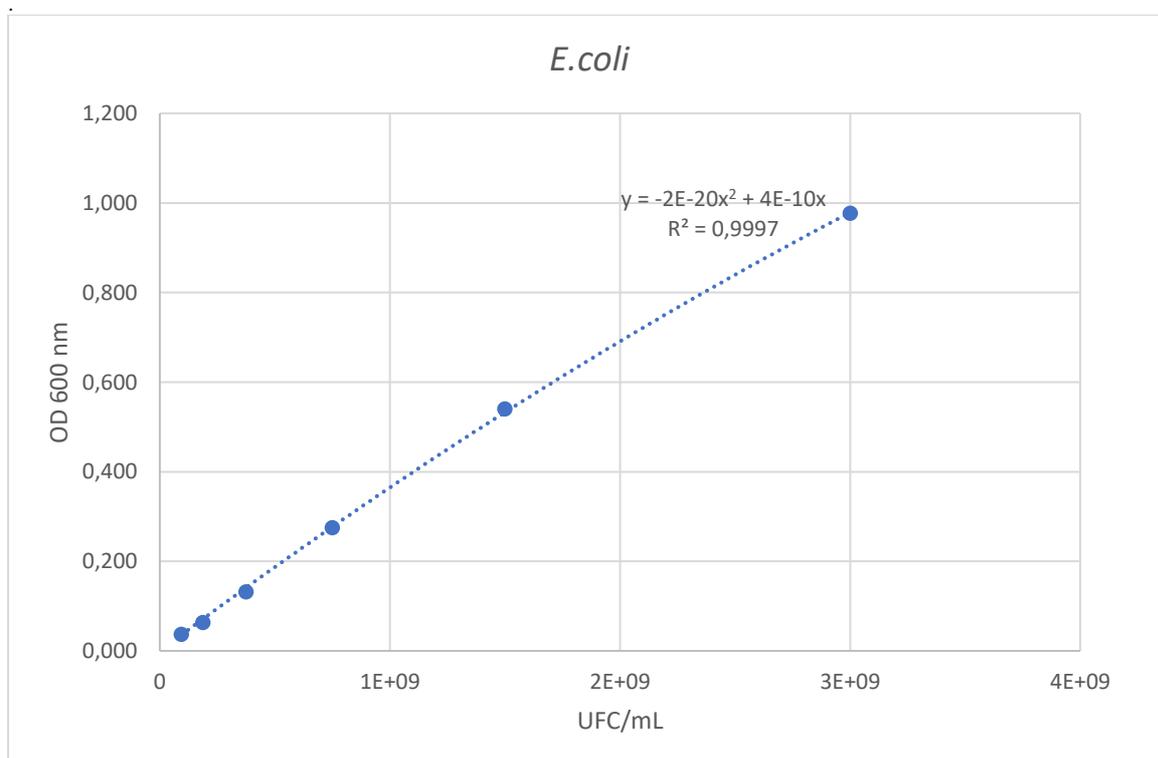
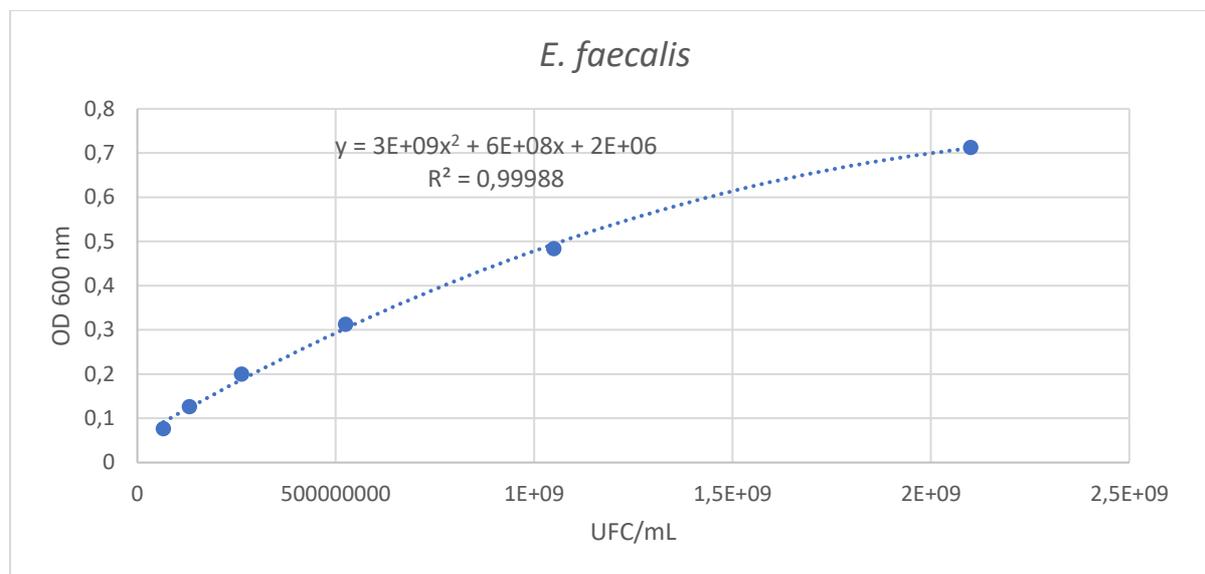


Figura Suplementaria 1. Recta patrón para determinar la concentración de *P. aeruginosa* partiendo de la densidad óptica, para determinar UFC/mL.

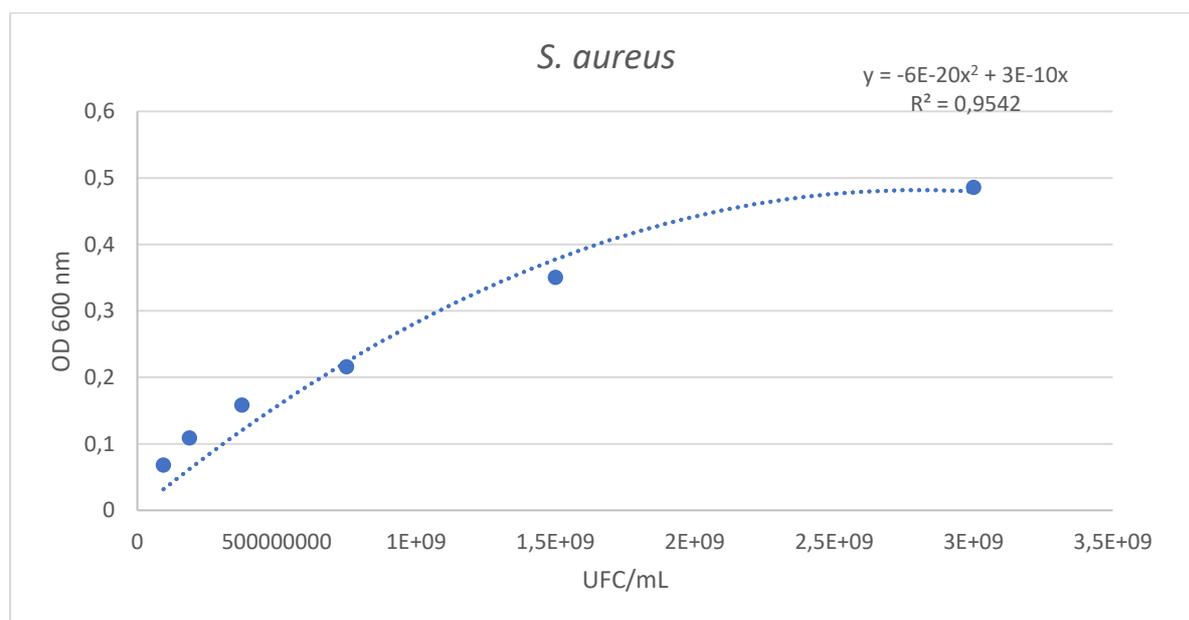


## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -carbolinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS

*Figura Suplementaria 2.* Recta patrón para determinar la concentración de *E.coli* partiendo de la densidad óptica, para determinar UFC/mL.

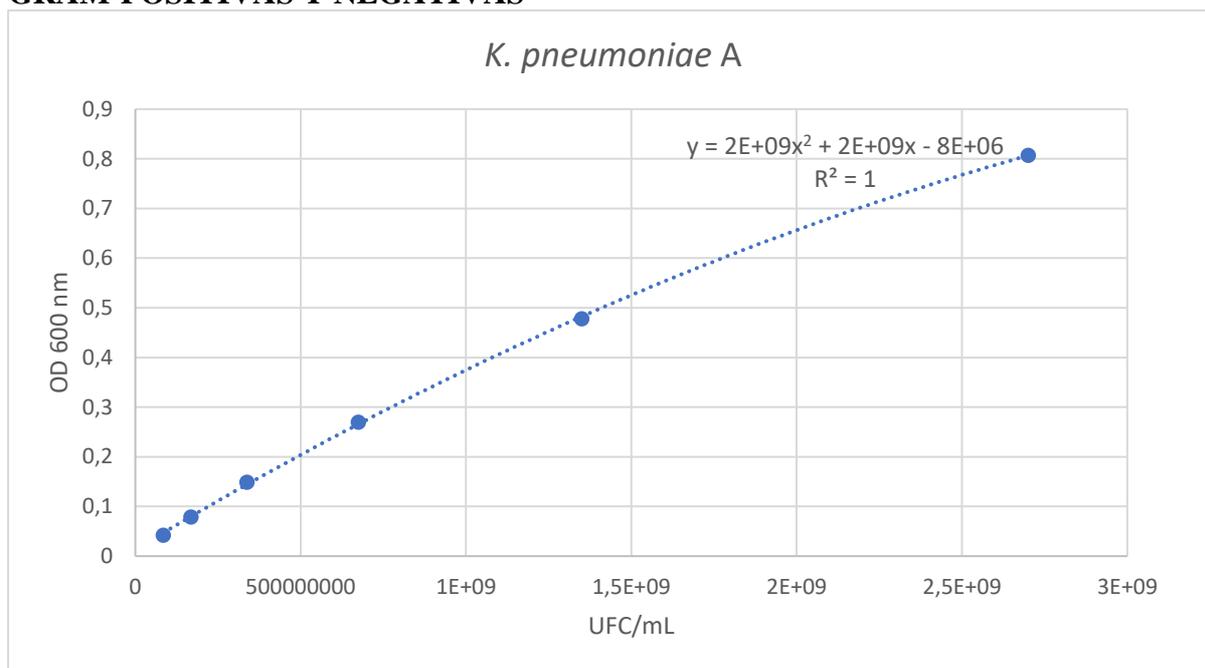


*Figura Suplementaria 3.* Recta patrón para determinar la concentración de *E. faecalis* partiendo de la densidad óptica, para determinar UFC/mL.

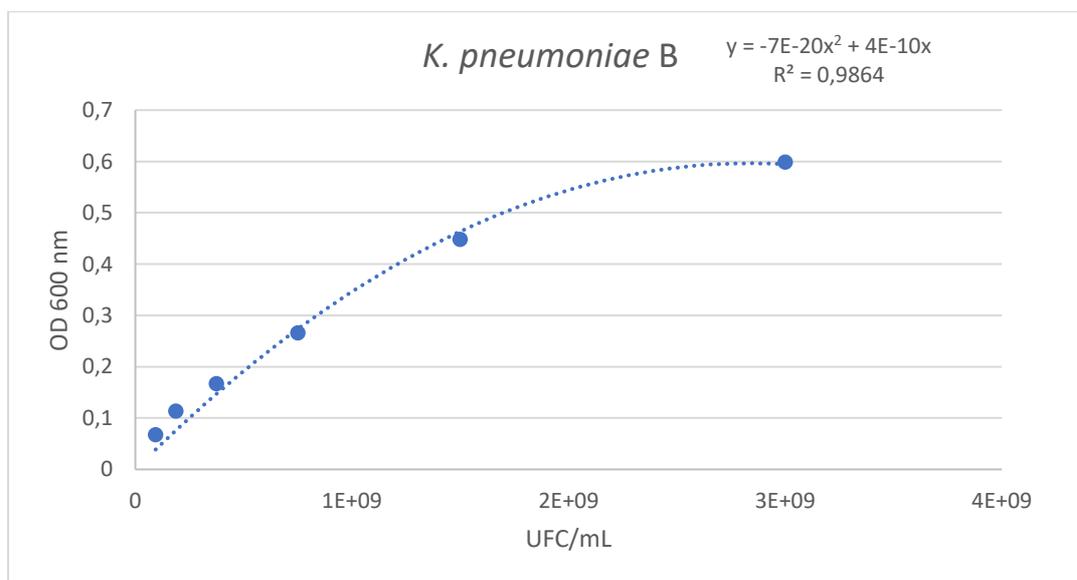


*Figura Suplementaria 4.* Recta patrón para determinar la concentración de *S. aureus* partiendo de la densidad óptica, para determinar UFC/mL.

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolicinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

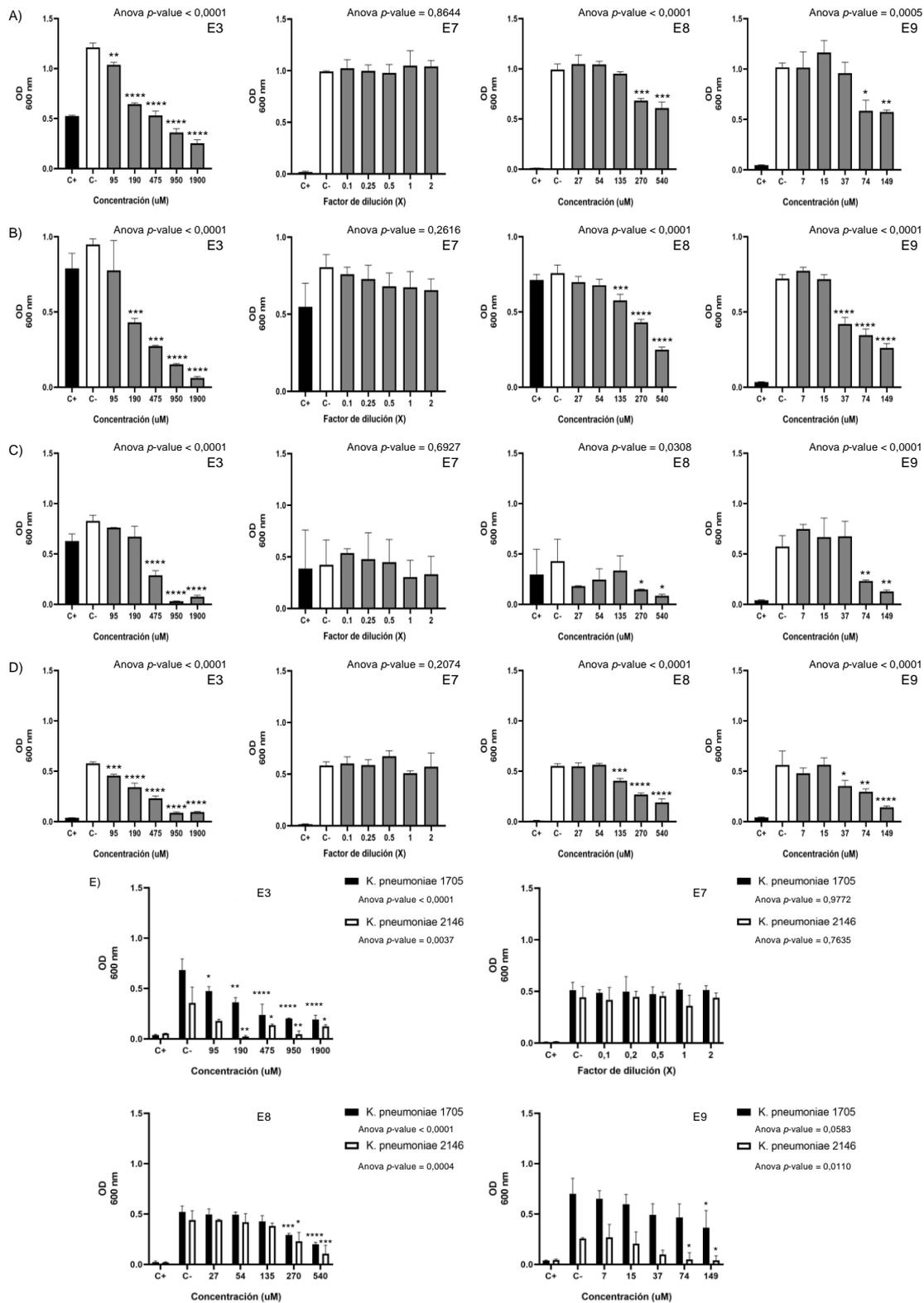


**Figura Suplementaria 5.** Recta patrón para determinar la concentración de *K. pneumoniae A* partiendo de la densidad óptica, para determinar UFC/mL.



**Figura Suplementaria 6.** Recta patrón para determinar la concentración de *K. pneumoniae B* partiendo de la densidad óptica, para determinar UFC/mL.

# EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS $\beta$ -CARBOLINAS EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS



**Figura Suplementaria 7. Densidad óptica de cultivos de placa de bacterias a 600 nm después de tratamiento con extractos de  $\beta$ -carbolicinas o controles. A) *P. aeruginosa*; B) *E. coli*; C) *E. faecalis*; D) *S. aureus* E) *K. pneumoniae*. C+: Control positivo (Metanol 2% + Levofloxacina para *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* o Ampicilina para *E. coli* y *E. faecalis*). C-: Control negativo (Metanol 2%). Dunnet's post-test (Control negativo vs tratamiento) (\* = p-value < 0,05; \*\* = p-value < 0,01; \*\*\* = p-value < 0,001; \*\*\*\* = p-value < 0,0001).**

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LAS  $\beta$ -carbolinas EXTRAÍDAS DE *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA) CONTRA BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y NEGATIVAS**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	C+	C-	2X	X	1/2X	1/5X	1/10X					
<b>B</b>	C+	C-	2X	X	1/2X	1/5X	1/10X					
<b>C</b>	C+	C-	2X	X	1/2X	1/5X	1/10X					
<b>D</b>	C+	C-	2X	X	1/2X	1/5X	1/10X					
<b>E</b>	C+	C-	2X	X	1/2X	1/5X	1/10X					
<b>F</b>	C+	C-	2X	X	1/2X	1/5X	1/10X					
<b>G</b>												
<b>H</b>												

Copyright © 2009 Edita Aksambiene

**Figura Suplementaria 8. Diseño de placa para el ensayo de microdilución en caldo.** C+: Control positivo; C- : Control negativo; 2X: Extracto concentrado 2X; X: Extracto normal; 1/2X: Extracto diluido 1/2. 1/5X: Extracto diluido 1/5. 1/10X: Extracto diluido 1/10. Todas las diluciones se realizaron con metanol al 100%.