



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ALCALOIDES EN
BANISTERIOPSIS CAAPI (SPRUCE EX GRISEBACH) MORTON
RECOLECTADO EN LA PROVINCIA DE NAPO**

Proyecto de investigación previo a la obtención de Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: GÉNESIS SOFÍA JIMA MEZA

TUTOR: JAN SPENGLER

CO-TUTORA: PhD. NOROSKA GABRIELA SALAZAR MOGOLLÓN

Napo-Ecuador

2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, GÉNESIS SOFIA JIMA MEZA, con documento de identidad N° 1900805001, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 22 de febrero de 2024



Génesis Sofía Jima Meza
1900805001

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, GÉNESIS SOFIA JIMA MEZA, con documento de identidad N° 1900805001, en calidad de autora titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ALCALOIDES EN *BANISTERIOPSIS CAAPI* (SPRUCE EX GRISEBACH) MORTON RECOLECTADO EN LA PROVINCIA DE NAPO, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOLCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la ley orgánica de educación superior.

Tena, 22 de febrero de 2024



Génesis Sofía Jima Meza
1900805001

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

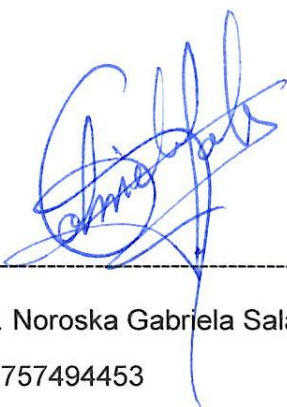
Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ALCALOIDES EN *BANISTERIOPSIS CAAPI* (SPRUCE EX GRISEBACH) MORTON RECOLECTADO EN LA PROVINCIA DE NAPO, en la modalidad: Tesis, fue realizado por: Génesis Sofía Jima Meza, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 22 de febrero de 2024



Jan Spengler
C.I: 1757762099



Ph D. Noroska Gabriela Salazar Mogollón
C.I: 1757494453

DEDICATORIA

A mi familia y a mis amigos que formaron parte de mi vida universitaria, siempre estarán en un pequeño espacio de mi corazón. También dedico este trabajo al desarrollo investigativo en la amazonía, que debería ser potenciado y llenado de personas dispuestas a buscar respuestas en pos de la conservación de los recursos vegetales.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento infinito a mis tutores, Gaby y Jan por brindarme su guía en el desarrollo del presente trabajo, a Jefferson Pastuña, Carolina Ñacato y Melanie Ochoa por siempre brindarme su ayuda.

TABLA DE CONTENIDO

CARÁTULA	
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR ...	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Descripción de la planta y distribución	1
1.1.2 Alcaloides beta-carbolinas en <i>B. caapi</i>	2
1.1.3 Farmacocinética de la bebida ayahuasca	4
1.1.4 Uso medicinal y social	5
1.2 Planteamiento del problema	6
1.3 Justificación de la investigación	7
1.4 Objetivos de la investigación	9
CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO	10
2.1 Identificación de los sitios de colección	10
2.2 Limpieza y secado del material vegetal	11
2.3 Maceración	11
2.4 Preparación de la muestra	11
2.5 Síntesis de estándares	12
2.6 Condiciones del método cromatográfico	14
2.7 Curvas de calibración	15
CAPITULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	17
CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	25
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	30
REFERENCIAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Datos de ubicación geográfica y sitios de colección de muestras de <i>B. caapi</i> en la provincia de Napo.....	11
Tabla 3-1. Promedio de extracto metanólico en mg ($\pm$ desviación estándar) y rendimiento de los extractos	17
Tabla 3-2. Distribución de cada alcaloide en relación al estándar interno en tratamiento SPE, realizado por la integración de áreas de los picos en el GC-MS.....	19
Tabla 3-3. Distribución de cada alcaloide en relación al estándar interno en tratamiento LLE, realizado por la integración de áreas de los picos en el GC-MS.....	20
Tabla 3-4. Rendimientos de los estándares.....	20
Tabla 3-5. Adquisición de datos GC-MS.....	22
Tabla 3-6. Adquisición de datos de la muestra correspondiente al sitio 1 Tena con el tratamiento de la dilución del extracto metanólico de la figura 3-8.	23
Tabla 3-7. Parámetros utilizados en la elaboración del método analítico.....	24
Tabla 3-8. Promedio de concentraciones en mg. mL ⁻¹ ($\pm$ desviación estándar) de alcaloides en <i>B. caapi</i> bajo el método obtenido de la figura 3-7.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. a. Voucher del espécimen registrado de <i>Banisteriopsis caapi</i> . b. y c. ejemplar de <i>B. caapi</i> junto a un árbol de pitón <i>Grias neuberthii</i> en la parroquia Tálag.	2
Figura 1-2. Principales estructuras de alcaloides en <i>B. caapi</i>	3
Figura 2-1. Mapa de ubicación de los principales sitios de colección de tallos de <i>B. caapi</i> (señalados en color verde) en la provincia de Napo-Ecuador.	10
Figura 2-2. Reacciones de síntesis de los alcaloides harmina y tetrahydroharmina a partir de harmalina para cuantificación.	13
Figura 3-1. Visualización del extracto metanólico de <i>B. caapi</i> por GC-MS perteneciente al sitio 1 Tena.	18
Figura 3-2. Cromatograma del extracto <i>B. caapi</i> . del sitio 1 Tena mediante extracción en fase sólida SPE.	19
Figura 3-3. Cromatograma del extracto <i>B. caapi</i> del sitio 1 mediante extracción líquido-líquido (LLE).....	20
Figura 3-4. Cromatograma del estándar sintetizado harmina.	21
Figura 3-5. Cromatograma del estándar sintetizado tetrahydroharmina, también nombrado leptaflorine.	21
Figura 3-6. Cromatograma Full Scan de una mezcla de estándares, difenhidramina, tetrahydroharmina, harmalina, harmina.	21
Figura 3-7. Cromatograma Full Scan de <i>B. caapi</i> del sitio Tena con la aplicación del tampón borato al extracto metanólico	22
Figura 3-8. Cromatograma Full Scan de <i>B. caapi</i> perteneciente al sitio Tena, observación de alcaloides directa por la dilución del extracto metanólico.	22
Figura 4-1. Reacción representativa de las aminas de <i>B. caapi</i> con un solvente prótico.	27

RESUMEN

Ayahuasca hace mención a la planta endémica de la región amazónica *Banisteriopsis caapi* y la bebida elaborada con sus tallos en decocción junto a *Psychotria viridis*. Presenta alcaloides del tipo beta-carbolinas: harmina, harmalina y tetrahydroharmina con propiedades biológicas de inhibición enzimática en monoaminooxidasas MAOs que permiten la actividad de N, N dimetiltriptamina DMT. Algunos estudios determinaron con HPLC y GC el contenido de alcaloides a partir de la bebida elaborada en Brasil, Perú y Bolivia, sin embargo, las concentraciones de estos principios activos cambian según la variedad de la planta, su edad, las condiciones geográficas y el estado silvestre o cultivado. En este sentido, con el objetivo de conocer las concentraciones de los alcaloides en *B. caapi*, usados en la provincia de Napo, Ecuador, se desarrolló un protocolo para la extracción y cuantificación a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se empleó la harmalina comercial para la síntesis química de dos estándares, harmina por oxidación con reactivo Jones y tetrahydroharmina por reducción con boro hidruro de sodio y para garantizar los resultados obtenidos, el protocolo fue verificado usando las figuras del mérito analítico de límite de detección y porcentaje de recuperación. Adicionalmente, se realizó un análisis preliminar con muestras de tallos de *B. caapi* de 3 localidades: Tena, Ahuano y Tálag. Cada uno de los sitios analizados presentó variabilidad de concentraciones, siendo de: 0,05 a 0,125 mg. mL⁻¹ de tetrahydroharmina, 0,03 a 0,06 mg. mL⁻¹ de harmalina y 0,17 a 0,48 mg. mL⁻¹ de harmina.

Palabras Clave: *B. caapi*, GC-MS, Provincia de Napo, beta-carbolinas, cuantificación.

ABSTRACT

Ayahuasca refers to an endemic plant of the Amazon region, *Banisteriopsis caapi*, and the beverage made from its stems in decoction with *Psychotria viridis* leaves. This plant produces alkaloids called beta-carbolines: harmine, harmaline and tetrahydroharmine (THH), which possess biological properties of enzymatic inhibition of monoamine oxidases (MAOs), enabling the activity of N, N dimethyltryptamine (DMT). Several studies have determined the alkaloid content of this beverage in Brazil, Peru and Bolivia using HPLC and GC method. However, the concentrations of these compounds differ due to geographical conditions and whether the plants are cultivated in a garden or found in the wild. In this regard, a protocol was developed to determine the concentrations of *B. caapi* alkaloids used in the Napo province of Ecuador. The extraction and quantitation were performed using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Harmaline, a certified standard was employed for the synthesis of other two standards, harmine (oxidized with Jones reagent) and THH (reduced with sodium borohydride). To ensure the accuracy of the results, the protocol underwent to verification using confidence parameters, including the limit of detection and percentage of recovery. Stem samples of *B. caapi* collected from three locations in the Napo province: Tena, Ahuano and Tálag, were subjected to the analytical procedure, the results demonstrated variability among sited, with broad range of 0,05 to 0,125 mg. mL⁻¹ for THH, 0,03 to 0,006 mg. mL⁻¹ for harmaline and 0,17 to 0,48 mg. mL⁻¹ for harmine.

Keywords: *B. caapi*, GC-MS, Napo province, beta-carbolines, quantitation.

CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Antecedentes

1.1.1 Descripción de la planta y distribución

El neotrópico es una vasta región que alberga una gran diversidad de plantas [1], del total estimado, las plantas con flores comprenden cerca de 110 000 especies que producen un alto perfil de metabolitos con propiedades curativas conocidas a través de la medicina tradicional de los pueblos autóctonos [2]. Las familias más representativas Passifloraceae, Rubiaceae, Malpighiaceae, Fabaceae y Solanaceae son fuentes de compuestos activos de alcaloides, fenoles, quinolinas, terpenoides, entre otros, que cumplen funciones en la salud como antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorios y cicatrizantes [3].

A pesar de la riqueza florística de la región, es difícil que se realicen estudios completos por cada especie, del total de especies registradas en un rango de 50 000 a 100 000, solo en 50 se desarrollan investigaciones científicas exhaustivas [4]. Ecuador forma parte de los 17 países megadiversos [5] pero en pocas plantas se tiene usos comerciales farmacéuticos, se encuentran la chinchona *Cinchona officinalis*, uña de gato *Uncaria tomentosa* y la sangre de drago *Croton lechleri*, el resto de productos farmacéuticos a nivel global no contienen compuestos aislados de plantas provenientes del Neotrópico [4,6], no obstante, se debería priorizar la atención a las especies vegetales que existen en la región como alternativas propias en la elaboración de medicamentos [7].

Malpighiaceae, es una de las familias más diversas que actualmente comprende 74 géneros y 1300 especies, de allí se deriva el género *Banisteriopsis* y contiene a la Ayahuasca que es el nombre común atribuido a *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Grisebach) C. V. Morton, palabra que proviene del idioma quichua y se traduce como “la liana de las almas” [8]. Es una especie vegetal nativa del bosque tropical amazónico, su hábito es de liana/enredadera y arbusto que se distribuye ampliamente en Brasil, Venezuela, Colombia, Perú, Ecuador y Bolivia [4,5].

B. caapi es una planta perenne de crecimiento lento, la estructura de liana se forma a partir de los 5 años y puede alcanzar una altura de 30 metros, el tallo tiene corteza lisa de color café con hendiduras lobulares en los bordes, las hojas son ovaladas y se extienden en direcciones opuestas. Los periodos de floración son los meses de diciembre a agosto, exhiben colores blanco a rosado pálido con crecimiento alternado en forma de panículas axilares en las ramas terminales; el fruto es nuez de samara de 5 mm de largo [11]. Los ejemplares de *B. caapi* que provienen de tallos cortados son estériles y no florecen [12].

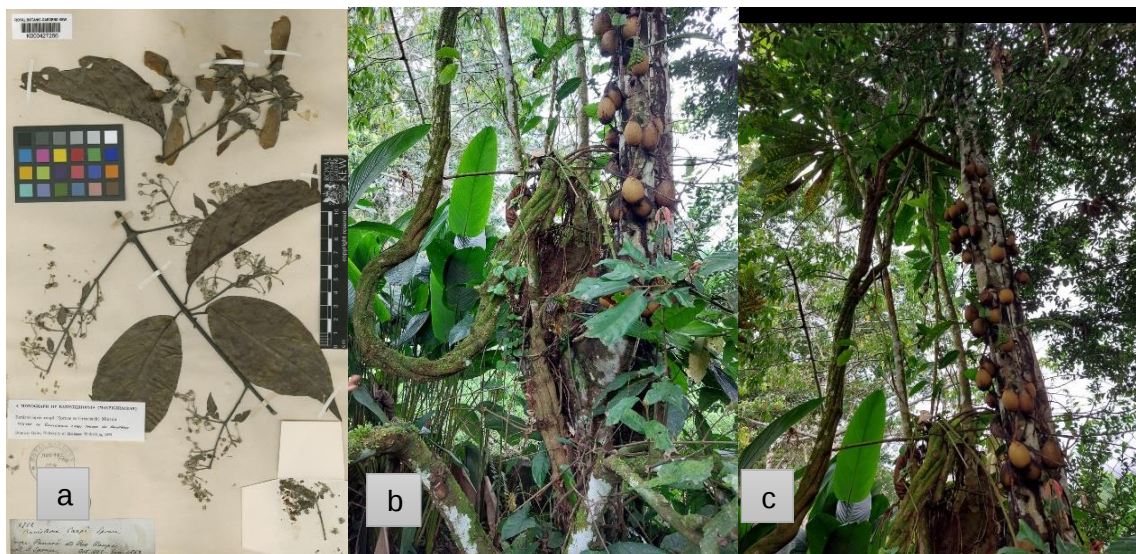


Figura 1-1. a. Voucher del espécimen registrado de *Banisteriopsis caapi*. b. y c. ejemplar de *B. caapi* junto a un árbol de pitón *Grias neuberthii* en la parroquia Tálag.

Fuente: a. Real Botanical Garden of Kew Plants (RBG) of the World Online, 2023 [13].

Realizado por: b. y c. Jima, Génesis, 2024

En la Figura 1-1, el apartado a. muestra un ejemplar de *B. caapi* colectado en la amazonía colombiana y registrado en el herbario del RBG Kew, organización que tiene a disposición la publicación del catálogo en línea de los principales componentes de identificación: hojas, florecencia y fruto [13]. Los apartados b. y c. son fotografías de elaboración propia que indican el crecimiento guiado de la liana *B. caapi* a la altura de un árbol de pitón *G. neuberthii* en la zona de la parroquia Talag, provincia de Napo.

1.1.2 Alcaloides beta-carbolinas en *B. caapi*

Los alcaloides son subproductos de rutas de biosíntesis en las plantas y representan una parte importante de productos naturales, son moléculas que no cumplen funciones esenciales en el desarrollo de la planta, sin embargo, los compuestos producidos

previenen el ataque de insectos y microorganismos, en consecuencia, ayudan en la protección y adaptación de las plantas en los ecosistemas [14,15].

Muchos alcaloides y metabolitos producidos en las plantas también poseen actividad biológica [16], en especial el género *Banisteriopsis* registra actividad antimicrobiana contra *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. Además, se han realizado ensayos de actividad antiprotozoario de los alcaloides beta-carbolinas contra parásitos tropicales de malaria y leishmaniasis [17]. A su vez, los extractos vegetales del género *Banisteriopsis* contienen actividad antiinflamatoria y antioxidante [18].

Los beta-carbolinas de *B. caapi*, son alcaloides tipo indol, pues contienen la estructura del centro indol con un grupo metoxi adicional, el cual es fusionado con un tercer anillo de seis miembros con un átomo de nitrógeno y un grupo metilo adicional. Poseen diferentes grados de insaturación (número de dobles enlaces): la tetrahydroharmina (THH) presenta una amina secundaria y un centro quiral, siendo el enantiómero natural (*R*) [19], la harmalina es una imina y la harmina contiene la subestructura de piridina, tal como se muestra en la figura 1-2 [20].

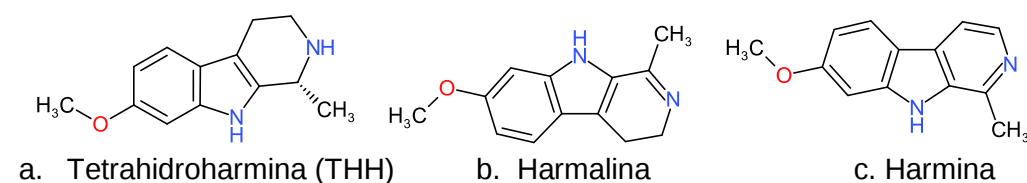


Figura 1-2. Principales estructuras de alcaloides en *B. caapi*
Realizado por: Jima, Génesis, 2024.

En las plantas, estos compuestos se forman a partir del triptófano por reacciones de condensación con aldehídos o ceto ácidos. El peso molecular de la harmalina es 214,3 g.mol⁻¹ cuya oxidación genera harmina de peso molecular 212,25 g.mol⁻¹ y la reducción produce tetrahydroharmina, de peso molecular 216,28 g.mol⁻¹ [14,21]. Las moléculas son solubles en solventes orgánicos como metanol, etanol, diclorometano (DCM), éter dietílico, cloroformo, entre otros. La formación de sales con ácidos aumenta la solubilidad con el agua. Además, por la estructura aromática tricíclica son fluorescentes [22,23].

1.1.3 Farmacocinética de la bebida ayahuasca

La rápida propagación vegetativa de *B. caapi* hace que se extienda su uso en toda la región amazónica y sea difícil conocer el sitio exacto de procedencia. Su domesticación ha sido impulsada por la bebida ayahuasca, que es elaborada con plantas que se cultivan en los jardines, sin embargo, el crecimiento de *B. caapi* es lento y se buscan plantas en estado silvestre, sus tallos son colectados para elaborar una decocción junto a las hojas de *Psycotria viridis* durante 14 horas [24]. La liana *B. caapi* y la bebida tienen la misma nominación, según el sitio geográfico cambia el nombre vernáculo a yagué, ayahuasca, caapi, natema, etc. [12].

Gran parte de las investigaciones se centran en estudiar la bebida y los componentes moleculares que estimulan los efectos alucinógenos en personas [24–26], donde el tallo de la planta *B. caapi* aporta los alcaloides beta-carbolinas [27] mientras que *P. viridis* contiene en sus hojas N, N-dimetiltriptamina DMT considerado el agente precursor del estado alucinógeno. Esta mezcla de alcaloides es clave en la farmacocinética humana, normalmente el DMT es inactivado por enzimas mono-aminooxidasas MAOs que son parte del metabolismo primario en seres vivos. Su catálisis se centra en aminas similares a las estructuras de tiraminas, compuestos presentes en la dieta de alimentos fermentados como el queso, a su vez, las MAOs se encargan de controlar las concentraciones de neurotransmisores dopamina, serotonina y epinefrina, correspondientes a las aminas biogénicas que el organismo produce. La estructura molecular de los alcaloides harmina y harmalina guarda una similitud con las moléculas objetivos sobre las cuáles actúan las MAOs y se convierten en inhibidores reversibles enzimáticos, interrumpiendo temporalmente la catálisis del DMT, por ello, el DMT logra una actividad directa en los receptores de serotonina y estimula a las células nerviosas a experimentar estados de relajación y alucinaciones [28].

Uno de los efectos adversos ocasionados por la inhibición enzimática es que los neurotransmisores llegan al torrente sanguíneo y provocan síntomas de intoxicación relacionados al incremento de la presión arterial, temblores, diarreas y vómitos [29–31]. Los alcaloides beta-carbolinas de *B. caapi* son inhibidores reversibles no competitivos que interactúan con el sitio activo temporalmente y son desplazados de forma natural por el incremento de los propios sustratos que son catalizados por las MAOs, por tal motivo, cuando se practica el consumo de ayahuasca, las personas presentan síntomas de intoxicación que van desapareciendo paulatinamente [32].

1.1.4 Uso medicinal y social

La experiencia del consumo de la bebida se publicó por primera vez en la comunidad científica cuando Richard Spruce, investigador inglés visitó la amazonía venezolana y presencié el ritual realizado por los habitantes aledaños en 1851, describió que después de ingerir la bebida las personas experimentan un estado alucinógeno [10]. El consumo de la ayahuasca es una práctica ancestral que en un principio se relacionaba con los habitantes étnicos de la amazonía, las ceremonias se organizan en grupos que acompañan a las personas en la sanación de enfermedades [33].

En Brasil, desde el año 2010 la legalización del consumo de la bebida ha sido impulsado únicamente por la libertad de práctica religiosa en organizaciones como União do Vegetal (UDV), Santo Daime y Barquinha que agregaron a la bebida ayahuasca a sus costumbres religiosas [6,9,25,27]. No obstante, por el carácter alucinógeno de la bebida también hay quienes lo adquieren solamente para uso recreacional y no se tiene un adecuado uso de la bebida [34]. En el 2019 se reportaron casos de convulsiones asociados a la bebida ayahuasca en Estados Unidos (EE. UU.), por ello, la agencia de drogas y crimen agregó a las plantas *B. caapi* y *P. viridis* a la lista de especies en preocupación catalogadas como “Nuevas sustancias psicoactivas” NPSs por sus siglas en inglés, precisamente recopila información de compuestos de origen vegetal y los sintetizados a partir de ellos, un ejemplo son los cannabinoides que tienen un efecto estimulante y su abuso puede conllevar a la muerte [35,36]. Sin embargo, en el caso de la ayahuasca los reportes de convulsiones son causados por la bebida que es la decocción de dos plantas y a diferencia de la especie vegetal *B. caapi* es inactiva si se consume de manera independiente [37].

Es importante mencionar que la acción farmacológica de la bebida es variable de una persona a otra. Callaway [25] realizó un estudio en el que utilizó HPLC con detector de fluorescencia para analizar la bebida elaborada por la organización brasileña UDV, las concentraciones medidas por cada alcaloide fueron de 1,70 mg. mL⁻¹ de harmina; 0,20 mg/ml de harmalina; 1,07 mg. mL⁻¹ de THH y 0,24 mg. mL⁻¹ de DMT en una muestra de 2 ml.kg⁻¹ que se administró a 14 voluntarios. Como resultados se registraron las concentraciones de alcaloides en plasma y orina junto con las diferentes respuestas de los voluntarios a los cambios fisiológicos de mareos, el incremento de la presión sanguínea, la dilatación de pupilas y temperatura corporal.

Riba et al, [30] llevó a cabo un estudio similar, su aporte fue que definieron el estado psicológico que las personas experimentan con el consumo de ayahuasca de una manera detallada en dos dosis diferentes, a 0,63 mg y 0,80 mg de polvo liofilizado de la bebida. Uno de los trabajos más completos fue el realizado por McKenna [24], sus estudios cuantificaban el contenido de alcaloides en la bebida, planta y la actividad enzimática utilizando espectrofotometría UV-Vis [24].

Los experimentos en personas son limitados porque hasta el momento no es posible comprender a nivel molecular cómo cambia el control enzimático que hay en el organismo, relacionando la concentración de alcaloides ingeridos en la bebida, generalmente el estado alucinógeno inicia a la 1h 30 min y el efecto se mantiene por 4 horas ya que es ayudado por los alcaloides beta-carbolinas, a su vez la inhibición enzimática causa ligeras intoxicaciones, por ello, es importante obtener información de las concentraciones de inhibición enzimática a nivel celular y una vez que se tenga claro pasar a ensayos en humanos y descifrar con mayor detalle la farmacocinética ya que el transporte a nivel molecular en los alcaloides de *B. caapi* primero es pasar por los órganos digestivos, luego cruza la barrera del sistema sanguíneo e ingresa al cerebro [38].

1.2 Planteamiento del problema

Desde la publicación de *B.caapi* en el Journal of Washington a inicios del año 1900 nació un creciente interés en los países occidentales para entender la planta y la cinética de la bebida ayahuasca, también las personas realizaban viajes a la Amazonía en busca de la experiencia alucinógena en los sitios donde lo practican y en la provincia del Napo varias comunidades realizan el turismo de ayahuasca, donde las familias venden la experiencia del consumo de bebida y en otros casos comercializan directamente el tallo de *B. caapi* [34,39]. En vista del creciente interés, ha conllevado a una sobredemanda por parte de las personas, el uso solamente es del tallo y se corta toda la planta, tiene un crecimiento lento y para suplir la demanda se buscan plantas que se encuentran en estado silvestre provocando que el estado de conservación de la planta se encuentre amenazado [9].

Los factores ambientales y la ubicación geográfica son condiciones que pueden contribuir a que los ejemplares de un tipo de especie produzcan contenidos de metabolitos en diferentes rangos de concentraciones [40]. La producción de alcaloides

beta-carbolinas en *B. caapi* no registra la misma concentración de un sitio a otro, numerosos análisis químicos se han realizado con el fin de explorar el perfil de metabolitos y monitorear el contenido de los alcaloides principales [41,42]. En los análisis reportados las técnicas analíticas desarrolladas enfocadas en compuestos alcaloides son múltiples y se usan diferentes métodos tanto en condiciones cromatográficas en gases, donde los detectores de nitrógeno/fósforo y *flame ion detector* (FID) son los más aplicados [14], también es utilizada la cromatografía líquida reportados para el análisis de alcaloides harmala, es una técnica que usa tratamientos de muestra extensos para monitorear la composición química en la bebida [39]. Sin embargo, el trabajo realizado no es completo porque se miden las concentraciones de alcaloides a partir de la bebida, omitiendo el contenido de alcaloides en la planta colectada por localidades provenientes de las regiones donde es cultivada. Además, en los trabajos clásicos son pocos los que han abordado este tipo de tema usando un método analítico verificado que minimice los pasos de extracción y preparación de muestra desde el material vegetal.

Tradicionalmente en la región amazónica se cosecha la planta para elaborar la bebida y venderla, en especial los turistas lo adquieren pero se debe tener un uso adecuado porque los alcaloides de la planta al ser inhibidores pueden conducir simultáneamente a alucinaciones e intoxicaciones cuando hay usos recreativos y para evitar reacciones graves se tiene que cuidar el tipo de dieta que se acompaña en la ingesta de la bebida [23]. Es por ello, que el contenido de concentraciones de alcaloides que producen las plantas que crecen en la provincia de Napo tendrían que conocerse y el análisis químico del material vegetal de *B. caapi* representa un punto de inicio en donde las técnicas para el desarrollo de este tipo de trabajo deberían ser precisas y estandarizadas [9,39].

1.3 Justificación de la investigación

La riqueza metabólica registrada en las plantas del género *Banisteriopsis* es interesante debido a la variabilidad de metabolitos que pueden presentarse en diferentes localizaciones y condiciones de crecimiento [29]. Se ha explorado y registrado información de la liana *B. caapi* en varios países de la cuenca amazónica, sin embargo, en Ecuador, específicamente la provincia de Napo, la planta es conocida por locales y extranjeros, cuyo uso es principalmente para las ceremonias religiosas de las comunidades quichua, sin embargo, las plantas que se cultivan en la zona no tienen un registro de información exploratoria que indique las concentraciones de los tres

principales alcaloides: harmina, harmalina y TTH. Este estudio se centra en analizar la variabilidad de las concentraciones de metabolitos en los extractos vegetales de *B. caapi* colectados en diferentes localidades de la provincia de Napo ya que el consumo de la bebida ayahuasca es un referente turístico al que visitan personas que tienen interés en experimentar las ceremonias. Por lo tanto, es pertinente que la difusión y consumo de *B. caapi* sea controlado, así las comunidades autóctonas que preparan la bebida ayahuasca por motivos religiosos como tradicionales podrían considerar de qué sitio las lianas colectadas proporcionan un mayor efecto en las bebidas que elaboran.

La especie *B. caapi* es una de las pocas plantas que registra una composición química exclusivamente alcaloide, el resto de plantas del género *Banisteriopsis* presenta otro tipo de compuestos, principalmente fenoles y triterpenoides con alta actividad antioxidante [43]. La planta *B. caapi* ha ganado popularidad no sólo porque es empleada por parte de los pueblos amazónicos, sino que está siendo estudiada por su potencial farmacológico, como antidepresivo y neuroregenerativo en modelos de animales etc. Los estudios de las aplicaciones de la planta se empezaron en la década de 1990s y es importante que se realicen estandarizaciones del perfil químico [44,45]. Por lo cual, medir el contenido de alcaloides en las plantas que crecen en la provincia de Napo mediante la elaboración de curvas de calibración con patrones de cada alcaloide en CG-MS permitiría conocer exhaustivamente la composición química de *B. caapi* en muestras provenientes de diferentes localidades.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo general

Establecer un método analítico adecuado para determinar las concentraciones del perfil de alcaloides del tipo beta-carbolinas en *B. caapi* colectado en la provincia de Napo-Ecuador.

1.4.2 Objetivos específicos

- Estandarizar un método de extracción de alcaloides a partir del material vegetal sin pérdida de analitos durante la preparación de muestra.
- Caracterizar el perfil de alcaloides presentes en los tallos de *B. caapi* por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas GC-MS.
- Sintetizar los patrones tetrahidroharmina y harmina a partir de la harmalina para la construcción de curvas de calibración.
- Cuantificar los principales alcaloides harmina, harmalina y tetrahidroharmina provenientes de los tallos de *B. caapi* por técnicas de análisis químico.

CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Identificación de los sitios de colección

El trabajo con el material vegetal de *B. caapi* se realizó con el permiso de investigación otorgado por el ministerio del ambiente bajo el nombre de “MAATE-CMARG-2023-0017 Identificación molecular y evaluación de efecto antimicrobiano y antioxidante de extractos caracterizados fitoquímica o nutricionalmente de especies medicinales y comestibles de la amazonía en las provincias de Napo y Pastaza”.

Las muestras de *B. caapi* fueron colectadas en tres localidades diferentes de la provincia de Napo: Tena, Talag y Ahuano, las muestras de esta última localidad fueron donadas por el jardín etnobotánico Sacha Hambi para el desarrollo de la presente investigación. Se colectó únicamente el tallo de las lianas, se utilizaron tijeras de podar para cortar longitudes de 10 a 15 cm de largo en plantas que tenía una edad de 5 años y su modo de cultivo fue a partir del tallo de otra planta. Las demás muestras pertenecientes a los dos lugares de referencia de los sitios Tena y Tálag también fueron colaboración de personas que cultivan *B. caapi* en sus jardines, en la tabla 2-1 se registraron las coordenadas geográficas de cada sitio, después se guardaron las muestras y se transportaron a la universidad, en la figura 2-1 se presenta un mapa de la distribución de los principales sitios de colección con mayor detalle.

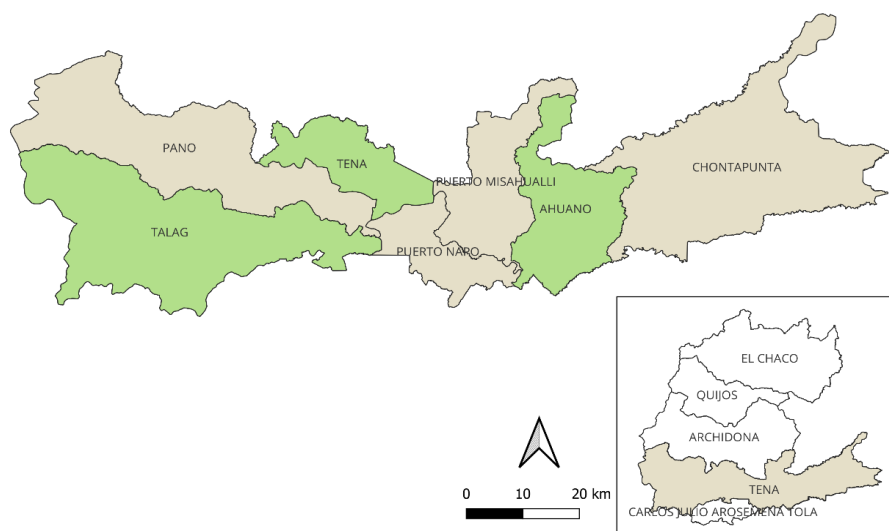


Figura 2-1. Mapa de ubicación de los principales sitios de colección de tallos de *B. caapi* (señalados en color verde) en la provincia de Napo-Ecuador.
Realizado por: Jima, Génesis, 2024.

Tabla 2-1. Datos de ubicación geográfica y sitios de colección de muestras de *B. caapi* en la provincia de Napo

Datos geográficos	Sitios de colección		
	Tena	Talag	Ahuano
Latitud	1°00'04.6"S	1°04'32.2"S	1°03'34.4"S
Longitud	77°48'46"W	77°52'33.8"W	77°31'53.3"W
Altura msnm	575	523	374

Realizado por: Jima, Génesis, 2024.

2.2 Limpieza y secado del material vegetal

La limpieza inicial del material colectado se realizó con jabón líquido, luego se enjuagó con agua destilada y se aplicó alcohol al 70% por 1 minuto, después el alcohol se removió con agua destilada. El secado de los tallos fue durante 6 días en la estufa a 40°C. Cumplido el tiempo se retiraron los tallos de la estufa y se pulverizaron manualmente con ayuda de una lima rectangular. Para asegurar que el polvo esté completamente seco, se volvió a colocar el tallo pulverizado en la estufa durante una noche a 40°C.

2.3 Maceración

Las maceraciones se realizaron tres veces por cada muestra colectada de los tres sitios, el tratamiento de la muestra vegetal se inició pesando 100 mg de polvo de *B. caapi* en un tubo de eppendorf de 2 mL junto con 1 mL de MeOH preparado a una concentración de 0,1 mg. mL⁻¹ de estándar interno difenhidramina. La muestra se llevó a vortex por 1 min para asegurar que el polvo vegetal quede completamente cubierto por el solvente. Seguido, la muestra se colocó en baño de ultrasonido en periodos de 15 min, pausándolo para realizar agitación con vórtex por 1 min hasta completar las 2 h de ultrasonido [46,47]. Finalizado el tiempo de maceración, se realizó un último vórtex de 1min y se centrifugó la muestra a 10000 rpm por 5 min. A continuación, se transfirieron 500 µL de sobrenadante a otro tubo de eppendorf de 1,5 mL y se dejó concentrar la muestra al vacío. Se registró el peso de extracto seco.

2.4 Preparación de la muestra

Para la preparación del extracto vegetal previo al análisis en el GC-MS, se consideraron los demás métodos reportados que son la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE), utilizados como medio de separación de los alcaloides de la matriz de la muestra para la posterior cuantificación [14,27,33,48].

2.4.1 Aplicación de extracción en fase sólida (SPE)

Al extracto concentrado se añadió 3 mL de una solución de tampón borato a pH 9.0, la solución es cargada a un cartucho C18 conectado a un colector de fracciones al vacío. El cartucho se condicionó inicialmente con 2 mL de metanol, 1 mL de agua tipo 1 y 2 mL de solución de buffer. Una vez cargado el cartucho con la muestra de *B. caapi*, se hizo un primer lavado con 1 mL de agua tipo 1 y con 1 mL de una solución de acetonitrilo-agua (1:9), la elución de los analitos se realizó con 2 mL de metanol [14].

2.4.2 Aplicación de extracción líquido-líquido (LLE)

A partir del extracto, la muestra se acidifica con 500 µL de H₂SO₄ al 2% para formar sales de alcaloides y se aplica vórtex por 1 min, seguido se limpia la muestra agregando 500 µL de éter dietílico (x2), a la solución se aplica vórtex por 1 min; luego, la muestra es centrifugada a 10 000 rpm por 5 min y la capa orgánica formada se descarta. A continuación, la parte acuosa es alcalinizada con 100 µL de hidróxido de amonio (NH₄OH) al 25% y se aplica vórtex por 1 min, seguidamente se agrega 500 µL de éter dietílico (x2). La fase orgánica es recuperada y concentrada al vacío. El extracto final se reconstituye en metanol para análisis en GC-MS.

2.4.3 Tratamiento directo del extracto a partir de la alcalinización con buffer.

En esta parte, se añadió 1 mL de buffer borato al extracto concentrado para ajustar la muestra a un pH 9, nuevamente se llevó a vortex y ultrasonido de 1 min para liberar el extracto de las paredes del tubo y se centrifugó la muestra a 10 000 rpm por 5 min, nuevamente se retiró el sobrenadante y se transfirió a un tubo para concentrarlo al vacío.

A las muestras concentradas se les registró el peso y se resuspendieron con 1 mL de MeOH, seguidamente se diluyó la muestra en proporción (1:1) con MeOH, después se realiza una segunda dilución (7:3) en un vial para el análisis de GC-MS [46].

2.5 Síntesis de estándares

La síntesis de harmina y tetrahidroharmina a partir de la harmalina comercial fue llevada a cabo mediante reacciones de oxidación y reducción, basados en protocolos descritos en la literatura [49–51].

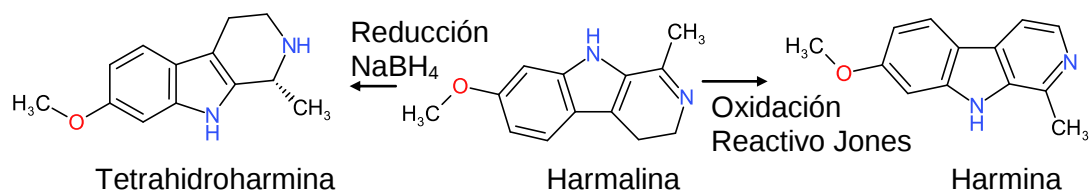


Figura 2-2. Reacciones de síntesis de los alcaloides harmina y tetrahydroharmina a partir de harmalina para cuantificación.
Realizado por: Jima, Génesis, 2024.

2.5.1 Estándar harmina

En la síntesis del estándar harmina se utilizó bibliografía con modificaciones. Se inició preparando el reactivo de Jones disolviendo dicromato de potasio (500 mg) en ácido sulfúrico 50% (2 mL) bajo agitación magnética constante, la solución se tornó de una coloración rojiza y se colocó en un baño de agua. Después fue diluido con 5 mL de acetona y se agregaron porciones de una suspensión de harmalina (241 mg) en acetona [49]. La reacción se dejó en agitación durante la noche en un total de 15 h. Luego se filtró el sedimento formado (para separar sales de cromo y residuos especiales) y se añade a la solución restante isopropanol (1 mL) para reaccionar el exceso del reactivo Jones. Una coloración verdosa indica la conversión de Cr(VI) a Cr(IV) [52]. Se agitó otro periodo de 15 h, en lo cual se forma una solución negra y un precipitado, lo cual consiste en la harmalina. El ácido sulfúrico luego fue neutralizado con NaOH (1,6 g en 5 mL de agua) [44]. El precipitado fue filtrado, lavado con pequeñas cantidades de isopropanol, y luego secado al aire. El polvo obtenido se disolvió en CHCl₃ y con ayuda de cromatografía de capa fina se verificó la formación de harmina, utilizando una mezcla de fase móvil entre diclorometano, metanol y ácido fórmico en un gradiente de proporción 90:7:3 [53,54]. Además, se empleó GC-MS para realizar la identificación del patrón sintetizado, preparado en MeOH a una concentración de 0,05 mg. mL⁻¹ [48].

2.5.2 Estándar Tetrahydroharmina

Para la síntesis de tetrahydroharmina se adoptaron protocolos descritos en las bibliografías [27,41,47]. Inicialmente, se disolvió borohidruro de sodio NaBH₄ (77 mg) en metanol (27 mL) bajo agitación en un baño de hielo. Después se añadió harmalina (217 mg) poco a poco con ayuda de una espátula. El progreso de la reacción fue monitoreado con cromatografía en capa fina con MeOH y cloroformo (1:10, v/v). La fluorescencia de

la harmalina bajo la lámpara UV desapareció después de 10 minutos, y luego de 40 minutos se añadió HCl 200 mM (10 mL) para reaccionar con el exceso de agente reductor. Después del cese de formación de burbujas, la solución fue alcalinizada con NaOH 1M. Finalmente, la solución fue extraída con diclorometano (3x15 mL), se unieron las fases orgánicas y se secó con sulfato de sodio anhidro. Después de filtrar y concentrar en el rotavapor se obtuvo un residuo que fue recrystalizado con EtOH, y secado al aire, dando lugar a unos cristales blanquecinos (129,2 mg) [27,41].

2.5.3. Difenhidramina (DPH) como referencia interna

Difenhidramina (DPH) fue usado como referencia interna, tomando en cuenta que había sido utilizado para la cuantificación de alcaloides de bebidas de ayahuasca por Pires [27]. El estándar interno fue aislado a partir de una pastilla “Soñodor”, que contiene 50 mg de difenhidramina hidrocloreto (DPH*HCl) como principio activo y lactosa monohidrato como excipientes [55]. La pastilla fue pulverizada, se empleó cloroformo como solvente para disolver la difenhidramina y separarla de la lactosa, el contenido del filtro fue lavado con cloroformo y los filtrados se concentraron en el rotavapor, el residuo fue colectado con MeOH y se transfirió a un balón de aforo de 50 mL, así resultando en un estándar de la concentración de 1 mg. mL⁻¹ (DPH*HCl). posteriormente se verificó la pureza e identidad de la molécula a través de GC-MS.

2.6 Condiciones del método cromatográfico

Los viales que se analizaron en el GC-MS fueron operados de la siguiente manera: el espectrómetro se programó en el modo de ionización de electrones (EI) a 70 eV, la temperatura de la fuente de iones fue de 200°C. La separación de los analitos se logró usando una columna capilar SH-I-5MS compuesta de una fase estacionaria de enlace cruzado de 5% difenil y 95% dimetilpolisiloxano (RT5-). Se inyectó 1 µL de la muestra en modo *splitless*. El gas de arrastre Helio tuvo una tasa de flujo de 1,03 mL/min. La temperatura del horno se programó de la siguiente manera; temperatura inicial de 70 °C, seguido de un incremento progresivo a 210 °C que se mantuvo por 5 min, luego subió la temperatura a una tasa de 10 °C/min hasta llegar a los 300 °C y el barrido espectral fue de 50-500 m/z [56].

2.6.1 Identificación y cuantificación de alcaloides

Inicialmente se prepararon las soluciones de estándares en metanol (dos fueron sintetizados: harmina y tetrahydroharmina) a una concentración de 0,02 mg. mL⁻¹. Cada estándar se analizó en el modo de adquisición de datos full Scan, después se realizó una identificación de nivel 1, que incluye los índices de retención de Kovats, los patrones de fragmentación de cada molécula registrados en las librerías y el uso del estándar certificado (harmalina comprado desde una casa comercial) [57]. En la aceptación de la identidad de los analitos se consideró un intervalo de tolerancia de 10 unidades [58]. Una vez consolidada la identificación de los estándares, la información se correlaciona con los índices de retención de las moléculas presentes en el extracto vegetal y los estándares. La cuantificación se realizó en el modo de adquisición *single ion monitoring* (SIM), los iones característicos m/z de cada estándar fueron m/z 201 de tetrahydroharmina, m/z 214 de harmalina y m/z 212 de harmina.

2.7 Curvas de calibración

Linealidad

Las soluciones estándar de los tres alcaloides: harmina, harmalina y tetrahydroharmina se prepararon disolviendo cada estándar en metanol a una concentración de 0,2 mg. mL⁻¹. Adicional a ello, se estableció un intervalo de concentraciones de 0.005, 0.010, 0.015, 0.020 y 0.025 mg. mL⁻¹ para construir una curva de calibración dentro del rango de los analitos de la muestra ajustándose a la relación lineal de $y = mx + b$ donde y es el área del pico y x es la concentración correspondiente [27,48].

Recuperación

Posterior a la construcción de la curva de calibración, se determinó el porcentaje de recuperación añadiendo concentraciones conocidas de cada estándar en un rango de 0,008 y 0,023 mg. mL⁻¹ para evaluar la recuperación y precisión analítica del método de extracción [59].

Se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{concentración leída}}{\text{concentración añadida}} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Límite de detección

Se determinó al leer 7 veces el blanco de procesamiento para representar la señal de ruido del cromatógrafo y se calculó la desviación estándar S_y de las respuestas de las áreas, cuyo valor se multiplicará por 3.3, también se utilizó la pendiente de la curva de calibración. Utilizando la siguiente ecuación:

$$LOD = \frac{3.3 S_y}{m} \quad \text{Ec. 2}$$

Límite bajo de cuantificación

El valor del límite de cuantificación se obtuvo con la relación de la pendiente de la curva calibración y la desviación estándar S_y multiplicado por 10.

$$LOQ = \frac{10 S_y}{m} \quad \text{Ec. 3}$$

CAPITULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1 Identificación de los sitios de colección

Una vez colectado el material vegetal de *B. caapi* de los tres sitios de la provincia de Napo: Tena, Tálag y Ahuano, los tallos fueron debidamente limpiados y secados, las muestras se almacenaron en refrigeración para conservarlas antes y después de realizar el análisis químico pertinente.

3.2 Preparación de la muestra

Dentro de la pulverización del material vegetal que consistió en raspar manualmente con una lima el tallo y corteza de la liana *B. caapi*, se tomó un peso estándar de 100 mg de polvo para la maceración y seguidamente se secó la muestra en la estufa a 40 °C para asegurar la mayor pérdida de humedad.

3.3 Maceración

En ±100 mg de material vegetal pulverizado se obtuvo un total de 10,59 mg de extracto en Tena; 7,49 mg en Talag y 9,15 mg en Ahuano, como se visualiza en la tabla 3-1, además se calculó el rendimiento de la extracción con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Peso de extracto}}{\text{Peso de material vegetal}} \times 100 \quad \text{Ecu. 4}$$

Tabla 3-1. Promedio de extracto metanólico en mg (± desviación estándar) y rendimiento de los extractos

Sitio	Peso inicial n = 3	Peso de extracto n = 3	%Rendimiento
Tena	100,0 ± 0,2707	10,59 ± 0,8257	10,58
Talag	100,4 ± 0,3	7,49 ± 0,4239	7,48
Ahuano	100,1 ± 1,1372	9,15 ± 0,7162	9,11

Las mediciones de los pesos de extractos iniciales obtenidos por maceración con MeOH, las muestras fueron maceradas por triplicado n = 3.

Realizado por: Jima, Génesis, 2024

3.4 Preparación de la muestra para análisis GC-MS

Después del tratamiento del material vegetal se siguieron dos procesos de extracción de alcaloides reportados que son la extracción líquido-líquido [14,33] y la extracción en fase sólida (SPE). Adicionalmente, se realizó un análisis diferente, basado en la referencia de Pires [27] que consistió en preparar las muestras a partir del extracto macerado y luego alcalinizar con tampón borato para tener una lectura de los tres alcaloides sin los procesos de extracciones previamente mencionados.

3.4.1 Tratamiento con extracción en fase sólida

Se prepararon tres maceraciones del sitio 1 Tena, la primera muestra se analizó sin ajuste de pH directamente en el GC-MS, cuyo resultado se muestra en la Figura 3-1, e indica el cromatograma del extracto vegetal de *B. caapi*. En el cromatograma se observa el alcaloide harmina y el estándar interno difenhidramina, debido a que los demás alcaloides harmalina y tetrahydroharmina no se encuentran se realizó SPE para que los tres alcaloides estén presentes en la cuantificación.

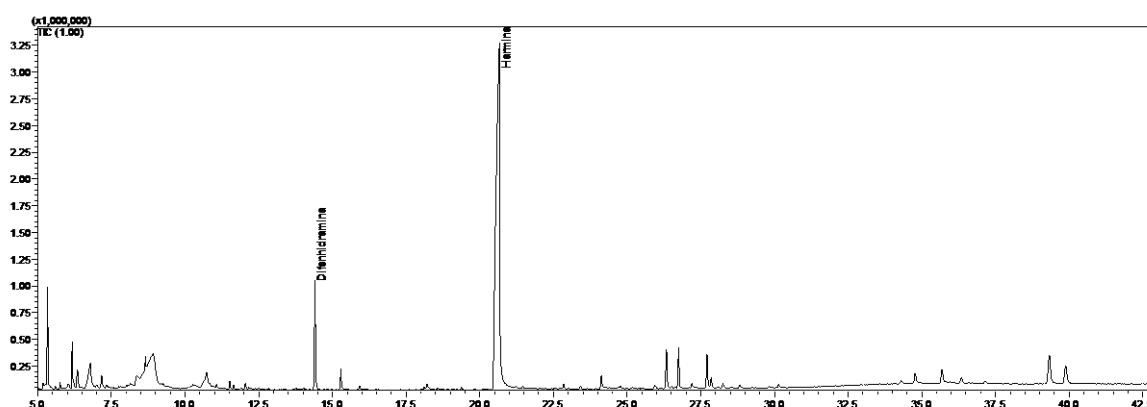


Figura 3-1. Visualización del extracto metanólico de *B. caapi* por GC-MS perteneciente al sitio 1 Tena.

Realizado por: Jima, Génesis, 2024.

El tratamiento con SPE se aplicó a la segunda muestra macerada que consistió en utilizar un cartucho C-18 de sílice, fue condicionado y activado para eluir la muestra con tampón borato, en el cromatograma de la Figura 3-2, se muestra el resultado obtenido de la separación de los tres alcaloides y el estándar interno.

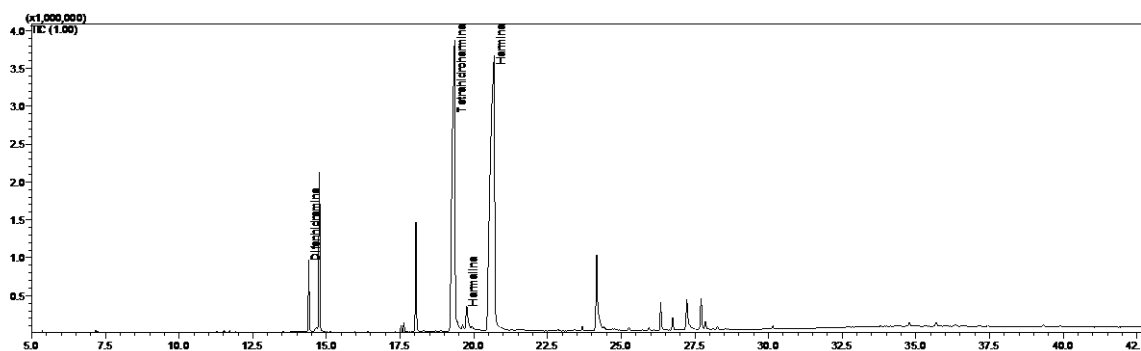


Figura 3-2. Cromatograma del extracto *B. caapi*. del sitio 1 Tena mediante extracción en fase sólida SPE.

Realizado por: Jima, Génesis, 2024

En la tabla 3-2 se muestra la integración de las áreas de los picos de cada analito, que nos permite conocer cómo están distribuidos los tres alcaloides con relación al área del estándar interno y su porcentaje.

Tabla 3-2. Distribución de cada alcaloide en relación al estándar interno en tratamiento SPE, realizado por la integración de áreas de los picos en el GC-MS.

Compuesto	Área	Área %
Difenhidramina	2088131	3,27
Tetrahydroharmina	24847685	38,95
Harmalina	971731	1,52
Harmina	35887450	56,25

Realizado por: Jima, Génesis, 2024

3.4.2 Tratamiento con extracción líquido-líquido LLE

Cada proceso de extracción se realizó por triplicado correspondiente al sitio 1 Tena, y en la tercera muestra macerada se realizó el proceso de LLE, este tratamiento consistió en formar sales de alcaloides con H_2SO_4 y luego basificar con NH_4OH para después extraer los alcaloides con el solvente orgánico éter dietílico, en la Figura 3-3 se indica el resultado obtenido.

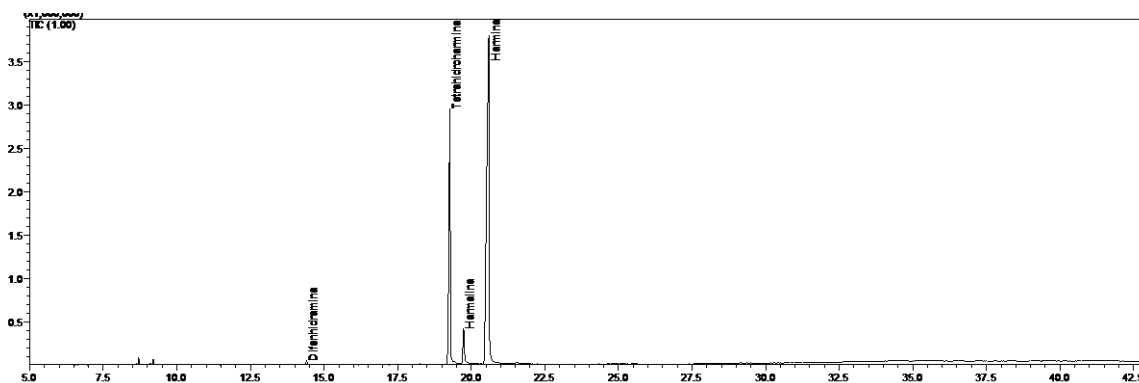


Figura 3-3. Cromatograma del extracto *B. caapi* del sitio 1 mediante extracción líquido-líquido (LLE).

Realizado por: Jima, Génesis, 2024

Igualmente, como en el resultado de SPE, se realizó la integración considerando las áreas de los picos de los tres alcaloides con relación al estándar interno.

Tabla 3-3. Distribución de cada alcaloide en relación al estándar interno en tratamiento LLE, realizado por la integración de áreas de los picos en el GC-MS.

Compuesto	Área	Área %
Difenhidramina	99808	0,30
Tetrahydroharmina	9997769	29,84
Harmalina	1271415	3,79
Harmina	22137154	66,07

Realizado por: Jima, Génesis, 2024

3.5 Rendimientos y pureza de los estándares sintetizados.

Los cálculos del rendimiento de las reacciones se encuentran en el anexo 1 y en la tabla 3-4 se muestran los porcentajes de rendimiento obtenidos.

Tabla 3-4. Rendimientos de los estándares.

Compuesto	Cantidad de producto (mg)	Porcentaje de rendimiento (%)
Harmina	200	85
Tetrahydroharmina	129,2	54

Realizado por: Jima, Génesis, 2024

La tetrahydroharmina, sin embargo, se obtuvo en una mezcla racémica, mientras el producto natural es de configuración (*R*), que coincide con los tiempos de retención de los extractos vegetales, a continuación, en la figura 3-4 y 3-5 se muestran los estándares sintetizados que fueron analizados en el cromatógrafo de gases:

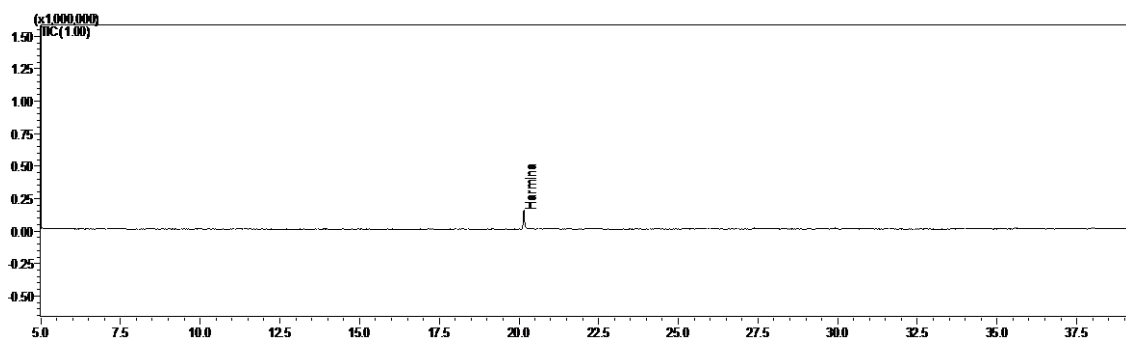


Figura 3-4. Cromatograma del estándar sintetizado harmina.

Realizado por: Jima, Génesis, 2024

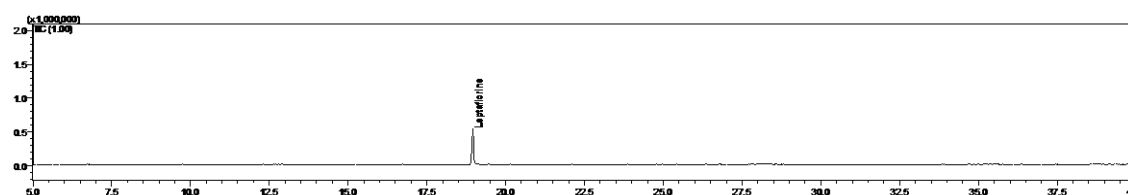


Figura 3-5. Cromatograma del estándar sintetizado tetrahidroharmina, también nombrado leptafloirine.

Realizado por: Jima, Génesis, 2024.

3.6 Identificación molecular de alcaloides presentes en las muestras de *B. caapi*

A continuación, se muestra el cromatograma con los estándares de los tres alcaloides harmina, harmalina, tetrahidroharmina y difenhidramina.

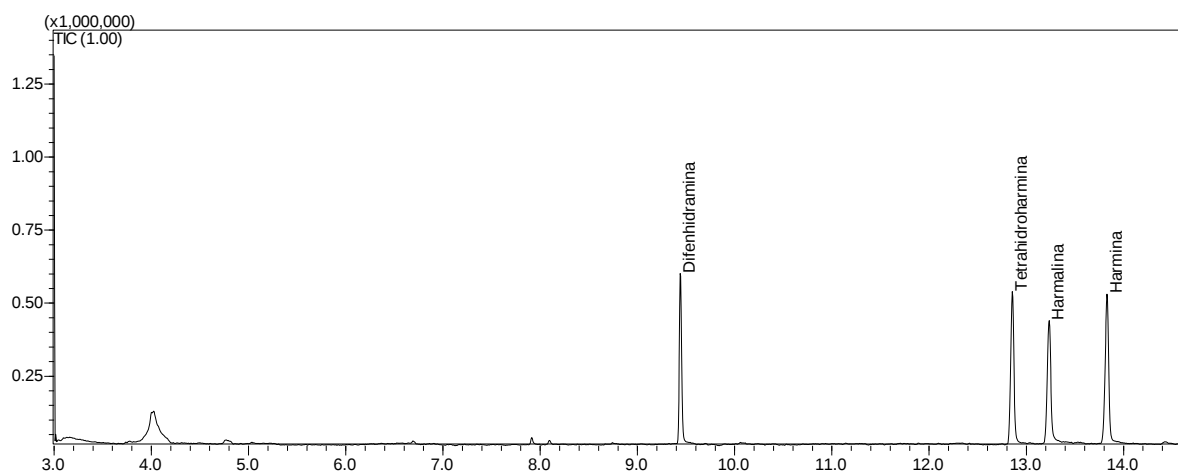


Figura 3-6. Cromatograma Full Scan de una mezcla de estándares, difenhidramina, tetrahidroharmina, harmalina, harmina.

Realizado por: Jima, Génesis, 2024.

En la Tabla 3-5 se presentan los datos correspondientes a las características de cada estándar: los sintetizados: harmina y tetrahidroharmina, y el certificado harmalina registrados por el método descrito para GC-MS, además se muestra los tiempos de

retención de cada uno, el ion precursor y el índice de retención.

Tabla 3-5. Adquisición de datos GC-MS

Compuesto / Analito	Masas	Tiempo de retención (min)	Ion precursor (m/z)	Índice de retención experimental	Índice de retención teórico
THH	216,1	12,91	201	2234	2230
Harmalina	214,1	13,290	213	2271	2267
Harmina	212,1	13,29	212	2330	2322
Difenhidramina	255,1	9,340	58	1895	1888

Índices de retención experimentales usando una fase estacionaria con enlace cruzado de 5% de difenil y 95% dimetilpolisiloxano.

Realizado por: Jima, Génesis, 2024.

3.6.1 Aplicación del método cromatográfico en las muestras

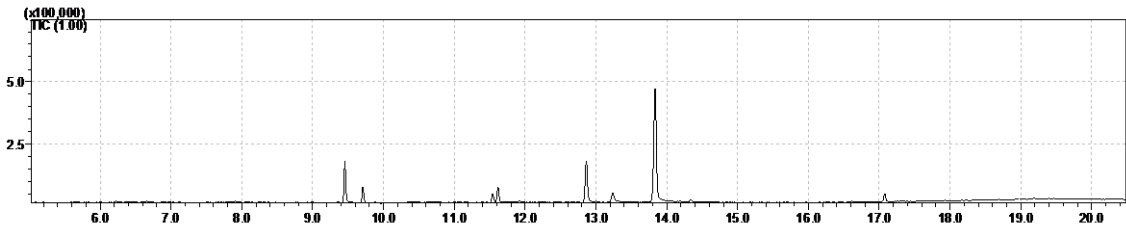


Figura 3-7. Cromatograma Full Scan de *B. caapi* del sitio Tena con la aplicación del tampón borato al extracto metanólico

Realizado por: Jima, Génesis, 2024.

El análisis cuantitativo de las muestras de los tres sitios consistió en la aplicación del tampón borato directamente en el extracto metanólico, luego la solución acuosa fue concentrada al vacío y se reconstituyó en un solvente adecuado para el análisis en el GC-MS, su resultado se encuentra en la Figura 3-7. Un análisis adicional consistió en diluir la muestra para la lectura cromatográfica directa, mostrado en la figura 3-8.

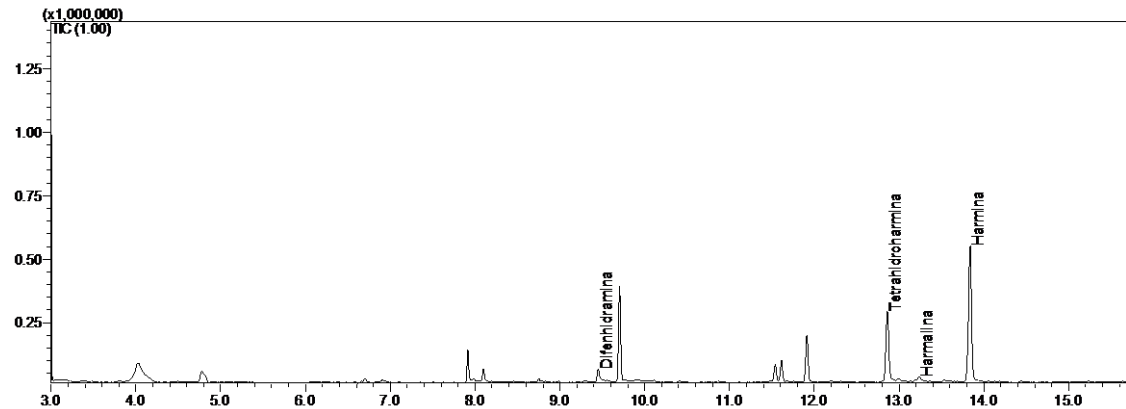


Figura 3-8. Cromatograma Full Scan de *B. caapi* perteneciente al sitio Tena, observación de alcaloides directa por la dilución del extracto metanólico.

Realizado por: Jima, Génesis, 2024.

Además, se realizaron identificaciones de otros compuestos presentes en las muestras, descritos en la Tabla 3-6.

Tabla 3-6. Adquisición de datos de la muestra correspondiente al sitio 1 Tena con el tratamiento de la dilución del extracto metanólico de la figura 3-8.

Compuesto / Analito	Ion precursor (m/z)	Tiempo de retención (min)	Índice de retención experimental	Índice de retención teórico	% Similitud
Difenhidramina	58	9.452	1896	1888	95
Tetrahidroharmina	201	12.862	2234	2230	90
Harmalina	213	13.237	2271	2267	82
Harmina	212	13.838	2331	2322	94
Éster metílico del ácido pentanoico, 5-ciano-	55	4.155	1131	1130	71
Ácido 6-metoxi-6-oxohexanoico	59	4.855	1240	1241	76
Ácido pentadecanoico, 14-metil-, éster metílico	74	8.79	1821	1814	82
15-metilhexadecanoato de metilo	74	9.740	1922	1924	94
(12E, 15E)-12,15-octadecadienoato de metilo	67	11.575	2103	2093	86
16-hidroxi-hexadecanoato de metilo	55	11.65	2111	2121	74
Éster hept-2-ildifenilmetílico del ácido succínico	167	18.195	2759	2766	79

Índices de retención experimentales usando una fase estacionaria de enlace cruzado de 5% difenil y 95% dimetilpolisiloxano.

Realizado por: Jima, Génesis, 2024.

3.7 Aplicación del método analítico

Para el desarrollo del método analítico se determinaron los parámetros de confianza de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y recuperación, en la Tabla 3-7 se registran los valores obtenidos.

Tabla 3-7. Parámetros utilizados en la elaboración del método analítico.

Ítem de verificación	Parámetro	Compuestos		
		THH	Harmalina	Harmina
Linealidad	Rango de concentración (mg.mL ⁻¹)	0,005 a 0,025	0,005 a 0,025	0,005 a 0,025
	Ecuación	y = 11698x – 32,045	y = 5522,4x – 19,604	y = 10435x – 22,83
	R	0,9927	0,9903	0,9913
Recuperación (%)	Valor bajo	102,24	107,49	99,20
	Valor alto	110,66	100,26	87,68
LOD	S/N=3	0,0013	0,0007	0,0006
LOQ	S/N=10	0,0040	0,0021	0,0018

Realizado por: Jima, Génesis, 2024.

En el método analítico se logró una linealidad $R^2 > 0,99$ para los rangos de concentraciones de los tres estándares y el porcentaje de recuperación de las muestras enriquecidas del analito con valor bajo 0,008 mg. mL⁻¹ y valor alto 0,023 mg. mL⁻¹ se obtuvieron en el intervalo de 87,68 a 110,66%, acorde a los requerimientos del ICH (*International Conference of Harmonization*)[60]. En la tabla 3-8 se muestran las concentraciones de cada alcaloide correspondiente a los tres sitios de muestras colectadas de la provincia de Napo.

Tabla 3-8. Promedio de concentraciones en mg. mL⁻¹ (± desviación estándar) de alcaloides en *B. caapi* bajo el método obtenido de la figura 3-7.

Sitio	THH	Harmalina	Harmina
Tena (n=3)	0,1258±0,0155	0,0659±0,0094	0,3512±0,0321
Talag (n=3)	0,0943±0,0040	0,0541±0,0015	0,4869±0,0190
Ahuano (n=3)	0,0516±0,0006	0,0367±0,0006	0,1726±0,0108

Realizado por: Jima, Génesis, 2024.

Las concentraciones registradas no toman en cuenta las diluciones realizadas para la lectura cromatográfica, el valor leído se transformó al valor de la concentración de la cual partió la dilución inicial del extracto.

Luego de construir las curvas de calibración se analizaron las muestras del material vegetal colectado que fue macerado y preparado únicamente con el tampón borato, las lecturas se realizaron por triplicado y los valores de las concentraciones de material vegetal cuantificado muestran una aproximación de la cantidad real que se encuentra presente en los tallos de *B. caapi* en la provincia de Napo.

CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

Los alcaloides examinados en el material vegetal de *B. caapi* colectado en tres diferentes sitios de la provincia de Napo: Tena, Talag y Ahuano, fueron detectados por GC-MS, inicialmente se enfocó en preparar las muestras del sitio 1 Tena, empleando la extracción líquido-líquido [14] y la extracción en fase sólida [27] son procedimientos reportados en investigaciones de análisis químico de los alcaloides betacarbolinas, además, se optó por añadir la referencia interna difenhidramina desde el proceso de maceración, es un compuesto que no coincide con los tiempos de retención de los analitos en muestras de *B. caapi*, y ha sido empleado en trabajos de cuantificación.

Debido a que en el análisis directo del extracto metanólico no hay una completa visualización de los tres alcaloides en GC-MS como se muestra en la Figura 3-1, se observa el estándar interno difenhidramina y otra señal que coincide con la harmina, lo que conduce a la necesidad de aumentar los pasos de extracción a través de un aumento en la superficie de contacto entre el extractor y los alcaloides, por lo tanto, sin estos pasos de extracción se verifica una ineficiencia en el método de detección si se realizara un análisis directo del material vegetal macerado. Es así como los otros dos alcaloides analizados directamente desde el extracto metanólico no están presentes en la lectura cromatográfica.

Los alcaloides en el material vegetal en los procesos de extracciones tienen un comportamiento de ácido-base [61][62], el cambio de su estado está dado por su valor de pK_a y el medio en el que se encuentre, la forma básica del alcaloide es lograda cuando se utiliza un tampón para establecer un pH básico y permite la detección adecuada en cromatografía de gases.

En los casos más comunes se utilizan las extracciones como la que se llevaron a cabo en este estudio junto con el análisis en cromatografía de gas, las lecturas se tomaron en cuenta que la muestras a analizar tengan un pH de 9,00 [63]. Los dos procesos LLE y SPE ayudan a separar los analitos de la matriz quitando impurezas que afectan en la detección de iones del equipo cromatográfico, sin embargo, estos procesos presentan limitaciones, se interviene una mayor manipulación de la muestra.

Por un lado, la extracción en fase sólida, involucra el uso de una solución de equilibrio que es el tampón borato, constituido con ácido bórico e hidróxido de sodio, su función es que la muestra conserve el pH 9,0, después los alcaloides harmina, harmalina y TTH eluyen del cartucho con una solución de metanol, luego la muestra es concentrada y se coloca en un vial para su análisis. Por otra parte, en la técnica de extracción líquido-líquido, el proceso involucrado en la separación de alcaloides es el siguiente: inicialmente se forman sales de alcaloides con un ácido fuerte H_2SO_4 después la muestra es alcalinizada con NH_4OH , de esta forma, el alcaloide recupera la estructura de base R_2-NH y es separado de la solución acuosa con un solvente orgánico afín a los metabolitos de interés, sin embargo con la ley del coeficiente de partición de solventes que sucede al interactuar las fases acuosa y orgánica, ocasiona que no todos los analitos sean extraídos por el solvente orgánico, es decir algunos alcaloides, en cantidades pequeñas tienden a quedarse en la matriz acuosa [64].

Al colocar una concentración conocida de estándar interno al inicio del procesamiento de la muestra permite controlar el cambio de concentraciones que hay en las muestras antes y después de realizar la extracción líquido-líquido mostrado en las Figuras 3-1 y 3-3, la referencia interna es un indicador del cambio de concentraciones por la adición o disminución de volúmenes, si se incrementa el volumen la concentración del analito se reduce, en la Figura 3-3, se muestra un cromatograma analizado después de la extracción líquido-líquido, el estándar interno se encuentra reducido y cerca de la línea base, que se encuentra también reflejado con el porcentaje de área de la tabla 3-3.

La basificación de los alcaloides en SPE se logra cuando se aplica el tampón borato y en LLE con NH_4OH , los dos tratamientos logran una reducción de interferencias en las muestras y permiten la observación de los tres alcaloides y el estándar interno, ambos métodos ayudaron a tener una separación de los analitos de interés. Sin embargo, SPE es más eficiente para separar y recuperar compuestos que LLE, en la Figura 3-2, el cromatograma evidencia que luego de aplicar SPE separa los tres alcaloides con mayor similitud a la muestra analizada desde el extracto metanólico de la figura 3-1 y el en cromatograma de la figura 3-3 del proceso LLE es distinto, mostrando una mayor pérdida de estándar interno. Por lo tanto, SPE es el proceso que ayuda a una mayor recuperación de alcaloides y compuestos en la matriz vegetal de *B. caapi* que LLE [27].

No obstante, se realizaron lecturas con un tratamiento alternativo a los procesos de extracción, consistió en concentrar la muestra del extracto vegetal y aplicar el tampón

borato de esta manera solamente se alcaliniza el extracto, se retira el solvente acuoso y se prepara nuevamente en metanol para analizar en GC-MS, el cromatograma de la figura 3-7 muestra que igualmente hay una separación de los tres alcaloides en la matriz, la distribución entre los alcaloides es similar a los obtenidos en los análisis reportados, en el que hay una concentración predominante de harmina, seguido de tetrahydroharmina y en menor cantidad de harmalina [45][9].

Este proceso fue el seleccionado para la cuantificación de los alcaloides correspondiente a los tres sitios, sin el uso de extracciones adicionales, asegurando una menor manipulación de muestra y por lo tanto una menor posibilidad de introducir contaminantes e interferentes en las muestras de *B. caapi* en la provincia de Napo.

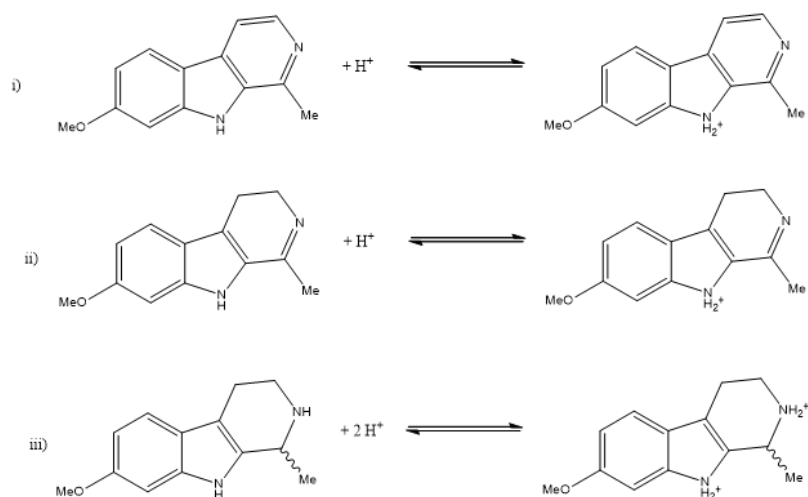


Figura 4-1. Reacción representativa de las aminas de *B. caapi* con un solvente prótico.

Realizado por: Spengler, Jan, 2024.

Es importante también indicar que la figura 3-8 muestra las condiciones empleando una dilución directa desde el extracto metanólico, sin aplicación del tampón borato, se observó la separación de los tres picos cromatográficos: harmina, harmalina y THH en una dilución de 1 a 10, el análisis directo a través de la dilución de las muestras representa una ventaja al disminuir el tratamiento de la muestra [9]. Una explicación de que éstas reacciones están regidas por el equilibrio químico, representado en la figura 4-1, la forma amina de los alcaloides hace que tengan un comportamiento de bases débiles, se convierten de la forma R_2-NH a su ácido conjugado $R_2-NH_2^+$, según el medio en el que se encuentre, si el medio es ligeramente ácido como el metanol, las aminas reaccionan quitando un protón al solvente (se protona) y se forma su ácido conjugado $R_2-NH_2^+$ y entre más diluido el ácido conjugado se disocia más, que pueden ser observados como 3 picos cromatográficos separados por cada alcaloide. Sin embargo,

las concentraciones de los alcaloides en menores cantidades pueden salirse del límite de detección, por ello, se opta por alcalinizar la muestra directamente para el análisis y tener valores cuantificables. A partir del cromatograma de la figura 3-8 se llevó a cabo una identificación de los demás picos cromatográficos de forma manual para reportar otros compuestos que se encuentran en el material vegetal de *B. caapi* y fueron registrados en la tabla 3-6.

Los estándares sintetizados a partir de la harmalina comercial mostraron similitud con los compuestos presentes en las muestras y no hubo presencia de otros picos (impurezas de otros productos obtenidos por síntesis), el cromatograma mostró el estándar sintetizado coincidiendo con los tiempos de retención de los alcaloides presentes en los extractos, la síntesis fue efectiva teniendo un porcentaje de rendimiento de 85% de harmina y 54% de tetrahydroharmina, luego se construyeron las curvas de calibración para la cuantificación de los alcaloides en los extractos vegetales.

En la Tabla 3-7 se indicaron los parámetros de confianza del método analítico que se basaron en los lineamientos del ICH [60], el método mostró una buena linealidad, se lograron valores de $R > 0,99$ de los tres compuestos analizados para los rangos de concentraciones de 0,005 a 0,025 mg/mL, el límite de detección fue calculado considerando 3 veces la señal ruido del equipo cromatográfico y ubicó valores debajo del rango de la curva de calibración de 0,0006 mg/mL para harmina, 0,0007 mg/mL de harmalina y 0,0013 mg/mL en THH y los límites de cuantificación se halló considerando 10 veces la señal ruido para cada alcaloide: 0,0018 mg/mL en harmina, 0,0021 mg/mL en harmalina y 0,0040 mg/mL en THH. Los porcentajes de recuperación de las concentraciones conocidas de los analitos se ubicaron en rangos de 87,68 a 110,66 % lo que indica que no hay pérdidas significativas de analitos durante el procesamiento de la muestra.

Una vez desarrollado el método analítico se aportaron cuantificaciones tomando en cuenta la colección de muestras desde diferentes localidades en la provincia de Napo tratándolas con la alcalinización de tampón borato al extracto metanólico concentrado, los registros de concentraciones en los diferentes sitios muestran ligeras variaciones de un sitio a otro, siendo el sitio Tena, el que posee una concentración mayoritaria, seguido del sitio Tálag y por último el sitio Ahuano, los cuales mostraron que se obtiene por cada 100 mg de polvo vegetal de *B. caapi* los siguientes rangos de concentraciones por alcaloide son 0,05 a 0,125 mg. mL⁻¹ de tetrahydroharmina, 0,03 a 0,06 mg. mL⁻¹ de

harmalina y 0,17 a 0,48 mg. mL⁻¹ de harmina, registrados con mayor detalle en la Tabla 3-8. Las comunidades de la Amazonía, emplean principalmente a *B. caapi* por sus principios curativos, el uso de esta planta está dado tanto en la fabricación de la bebida y las aplicaciones farmacológicas de los usos derivados del extracto del tallo de *B. caapi*.

Las muestras indican una presencia mayoritaria de los alcaloides, en especial tetrahidroharmina es el alcaloide que no actúa como inhibidor de enzimas MAO y se enlaza directamente a los sitios receptores de serotonina, en un inicio, las comunidades quichua empleaban solamente planta *B. caapi* en forma de bebida e incluso por si sola tiene un efecto alucinógeno leve que está dado por este alcaloide, añadir las hojas de *P. viridis* en la bebida es una práctica reciente [65], que se lo utiliza para intensificar el estado alucinógeno, si bien el DMT no es un metabolito producido por *B. caapi*, la tetrahidroharmina también actúa como receptor de serotonina al igual que el DMT, las plantas colectadas del Napo tienen concentraciones de harmina y tetrahidroharmina en rangos similares, la harmalina en cambio, es el alcaloide en menor concentración.

Los alcaloides beta-carbolinas son compuestos encontrados en diversidad de fuentes de plantas vegetales comestibles de la medicina natural [59], entre ellos se encuentra la ruda siria (*Peganum harmala*) [28], las pasas/uvras [66], maracuyá (*Passiflora edulis*) [67]. *P. harmala* produce concentraciones de harmalina en cantidad similar con la harmina, la sobredosis de semillas de *P. harmala* puede conducir a intoxicaciones en animales, los valores registrados de *P. harmala* son de 10% w/w mayores a *B. caapi* de 2% w/w.

Además, hay registro que animales marinos producen betacarbolinas [20], la aplicabilidad de estos alcaloides radica en el potencial efecto antiinflamatorio, también se estudió que los pacientes fumadores tienen una baja tendencia de padecer Alzheimer posiblemente a la presencia de los alcaloides betacarbolinas que hay en el cigarrillo, reportados en concentraciones bajas [68]. El contenido de metabolitos que se producen de un sitio a otro es variable por lo cual, es importante el desarrollo de técnicas para cuantificación enfocado desde un principio en el material vegetal, aportando conocimiento de las concentraciones en las plantas que crecen en la provincia de Napo.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se aplicaron dos técnicas de extracción de analitos previamente reportados y son limitantes cuando se va a realizar una cuantificación fiable de la concentración de los analitos en las muestras, por ello se optó por hacer un análisis directo mediante la alcalinización del extracto macerado, el método aplicado tomó en cuenta investigaciones de beta-carbolinas en HPLC y GC para dar lugar a una técnica analítica sensible en GC-MS y de rápida preparación de la muestra, tomando en cuenta que el pH de la muestra sea básico.

Se cuantificaron las concentraciones de los alcaloides harmina, harmalina y tetrahydroharmina empleando los parámetros de confianza del método analítico como linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y recuperación de las muestras analizadas de *B. caapi* en la provincia de Napo, quienes mostraron variabilidades en sus rangos de concentraciones cuantificados en cada localidad, esto demuestra que en cada sitio las plantas se diferencian en la cantidad de producción de metabolitos. El método aplicado representa un inicio en la investigación de los perfiles que puede ser aplicado a las demás plantas de la provincia de Napo.

5.2 Recomendaciones

La investigación realizada es exploratoria y se debería continuar analizando el perfil químico de esta planta. En otras investigaciones se han encontrado componentes como harmol, en cantidades menores a la harmalina, algunos analitos están cerca de la línea base y no pudieron ser detectados, que es causado por las abundancias de los tres principales alcaloides, para lo cual se debería emplear un mayor tiempo de maceración.

REFERENCIAS

1. Alarcón R, Sáenz M, Morales M, Lindstrom R, Vogel J, Mena P. El cártel de la biodiversidad. Transformación de conocimientos tradicionales en secretos comerciales. 2000. Recuperado: [/libros/10812-opac%0Afiles/511/FlacsoAndes](#) El cártel de la biodiversidad.pdf%0Afiles/510/biblio_view.html
2. Balick MJ. Ethnobotany and the identification of therapeutic agents from the rainforest. *Ciba Found Symp.* 1990;154: 22–31; discussion 32-9. doi:10.1002/9780470514009.ch3
3. Garden TNYB. Flowering Plants of the Neotropics. P. SN, Mori SA, Henderson A, Heald S V., Stevenson DW, editores. Princenton, New Jersey: Princenton Universited Press; 2004.
4. Desmarchelier C. Neotropics and natural ingredients for pharmaceuticals: why isn't South American biodiversity on the crest of the wave? *Phyther Res.* 2010;24: 791–799. doi:10.1002/ptr.3114
5. Armijos C, Ramírez J, Salinas M, Vidari G, Suárez A. Pharmacology and Phytochemistry of Ecuadorian Medicinal Plants: An Update and Perspectives. *Pharmaceuticals.* 2021;14: 1145. doi:10.3390/ph14111145
6. Ramawat KG, Mérillon JM. Natural Products. Ramawat KG, Mérillon J-M, editores. Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. doi:10.1007/978-3-642-22144-6
7. Jiménez Paute RC, Cevallos Vallejo AS, Cisneros Perez PA. Natural products as drugs source in the Ecuador's essential medicines list. *ACI Av en Ciencias e Ing.* 2021;13: 12. doi:10.18272/aci.v13i2.2110
8. Mannocho-Russo H, de Almeida RF, Nunes WDG, Bueno PCP, Caraballo-Rodríguez AM, Bauermeister A, et al. Untargeted Metabolomics Sheds Light on the Diversity of Major Classes of Secondary Metabolites in the Malpigiaceae Botanical Family. *Front Plant Sci.* 2022;13. doi:10.3389/fpls.2022.854842
9. McIlhenny EH, Pipkin KE, Standish LJ, Wechkin HA, Strassman R, Barker SA. Direct analysis of psychoactive tryptamine and harmala alkaloids in the Amazonian botanical medicine ayahuasca by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2009;1216: 8960–8968. doi:10.1016/j.chroma.2009.10.088
10. Morton C V. Botany.- Notes on yagé, a drug plant of southeastern Colombia. *J Washingt Acad Sci.* 1931;21: 485–488. Recuperado: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/39914886>
11. Shultes RE. Hallucinogenic Plants. Golden Press. New York; 1976.
12. Gates B. Flora Neotropica Monograph Number 28. Rogerson CT, editor. New York: The New York Botanical Garden; 1982.
13. Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens K. RBG Kew Plants of the World Online. 2023. Recuperado: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:29180-2>
14. Nikam TD, Nitnaware KM, Ahire ML. Alkaloids derived from tryptophan: Harmine and related alkaloids. Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Springer Berlin Heidelberg; 2013. pp. 553–574. doi:10.1007/978-3-642-22144-6_20
15. Tadeusz A. Alkaloids Chemistry , Biology , Ecology , and Applications. Second. Amsterdam: Elsevier Science Ltd; 2015. Recuperado: <https://www.kriso.ee/db/9780444594334.html>
16. O'Connor SE. 1.25 – Alkaloids. *Comprehensive Natural Products II.* 2010. pp. 977–1007.
17. Laine AE, Lood C, Koskinen AMP. Pharmacological importance of optically active tetrahydro- β -carbolines and synthetic approaches to create the C1 stereocenter. *Molecules.* 2014;19: 1544–67.

doi:10.3390/molecules19021544

18. Santos BWL, Moreira DC, Borges TK dos S, Caldas ED. Components of *Banisteriopsis caapi*, a Plant Used in the Preparation of the Psychoactive Ayahuasca, Induce Anti-Inflammatory Effects in Microglial Cells. *Molecules*. 2022;27: 2500. doi:10.3390/molecules27082500
19. Cordell GA. *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. 1a ed. London: Academic Press, Inc.; 1993. Recuperado: <https://epdf.tips/the-alkaloids-chemistry-and-pharmacology-volume-43.html>
20. Puerto Galvis C, Kouznetsov V. Recent Advances for the C–C and C–N Bond Formation in the Synthesis- of 1-Phenethyl-tetrahydroisoquinoline, Aporphine, Homoaporphine-, and β -Carboline Alkaloids. *Synthesis (Stuttg)*. 2017;49: 4535–4561. doi:10.1055/s-0036-1589512
21. Brito-da-costa AM, Dias-da-silva D, Gomes NGM, Dinis-oliveira RJ, Madureira-carvalho Á. Toxicokinetics and toxicodynamics of ayahuasca alkaloids N,N-dimethyltryptamine (DMT), harmine, harmaline and tetrahydroharmine: Clinical and forensic impact. *Pharmaceuticals*. 2020;13: 1–39. doi:10.3390/ph13110334
22. Carmona C, Galán M, Angulo G, Muñoz MA, Guardado P, Balón Q. Ground and singlet excited state hydrogen bonding interactions of betacarbolines. *Phys Chem Chem Phys*. 2000;2: 5076–5083. doi:10.1039/b005455k
23. Cao R, Peng W, Wang Z, Xu A. Carboline Alkaloids: Biochemical and Pharmacological Functions. *Curr Med Chem*. 2007;14: 479–500. doi:10.2174/092986707779940998
24. McKenna DJ, Towers GHN, Abbott F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: Tryptamine and β -carboline constituents of Ayahuasca. *J Ethnopharmacol*. 1984;10: 195–223. doi:10.1016/0378-8741(84)90003-5
25. Callaway JC, McKenna DJ, Grob CS, Brito GS, Raymon LP, Poland RE, et al. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. *J Ethnopharmacol*. 1999;65: 243–256. doi:10.1016/S0378-8741(98)00168-8
26. Morales-García JA, De La Fuente Revenga M, Alonso-Gil S, Rodríguez-Franco MI, Feilding A, Perez-Castillo A, et al. The alkaloids of *Banisteriopsis caapi*, the plant source of the Amazonian hallucinogen Ayahuasca, stimulate adult neurogenesis in vitro. *Sci Rep*. 2017;7. doi:10.1038/s41598-017-05407-9
27. Pires APS, De Oliveira CDR, Moura S, Dörr FA, Silva WAE, Yonamine M. Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and β -carboline alkaloids in Ayahuasca, an amazonian psychoactive plant beverage. *Phytochem Anal*. 2009;20: 149–153. doi:10.1002/pca.1110
28. Herraiz T, González D, Ancín-Azpilicueta C, Arán VJ, Guillén H. β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food Chem Toxicol*. 2010;48: 839–845. doi:10.1016/j.fct.2009.12.019
29. Costa VM, Grando LGR, Milandri E, Nardi J, Teixeira P, Mladěnka P, et al. Natural Sympathomimetic Drugs: From Pharmacology to Toxicology. *Biomolecules*. 2022;12: 1793. doi:10.3390/biom12121793
30. Riba J, Valle M, Urbano G, Yritia M, Morte A, Barbanoj MJ. Human Pharmacology of Ayahuasca: Subjective and Cardiovascular Effects, Monoamine Metabolite Excretion, and Pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306: 73–83. doi:10.1124/jpet.103.049882
31. Anderson MC, Hasan F, McCrodden JM, Tipton KF. Monoamine oxidase inhibitors and the cheese effect. *Neurochem Res*. 1993;18: 1145–1149. doi:10.1007/BF00978365
32. Andersen G, Marcinek P, Sulzinger N, Schieberle P, Krautwurst D. Food sources and biomolecular targets of tyramine. *Nutr Rev*. 2019;77: 107–115. doi:10.1093/nutrit/nuy036
33. Rivier L, Lindgren J-E. “Ayahuasca,” the South American hallucinogenic drink: An ethnobotanical

- and chemical investigation. *Econ Bot.* 1972;26: 101–129. doi:10.1007/BF02860772
34. Gambelunghe C, Aroni K, Rossi R, Moretti L, Bacci M. Identification of N,N-dimethyltryptamine and β -carbolines in psychotropic ayahuasca beverage. *Biomed Chromatogr.* 2008;22: 1056–1059. doi:10.1002/bmc.1023
 35. Of GO, Demand D. Global overview of drug demand and supply. 2017. pp. 1–66. doi:10.18356/bdc264f4-en
 36. Chambers MI, Appley MG, Longo CM, Musah RA. Detection and Quantification of Psychoactive N , N -Dimethyltryptamine in Ayahuasca Brews by Ambient Ionization High-Resolution Mass Spectrometry. *ACS Omega.* 2020;5: 28547–28554. doi:10.1021/acsomega.0c03196
 37. Frias UA, Mendes Costa MC, Takahashi JA, Oki Y. Banisteriopsis Species: A Source of Bioactive of Potential Medical Application. *Int J Biotechnol Wellness Ind.* 2012;1: 163–171. doi:10.6000/1927-3037/2012.01.03.02
 38. Santillo MF, Liu Y, Ferguson M, Vohra SN, Wiesenfeld PL. Inhibition of monoamine oxidase (MAO) by β -carbolines and their interactions in live neuronal (PC12) and liver (HuH-7 and MH1C1) cells. *Toxicol Vit.* 2014;28: 403–410. doi:10.1016/j.tiv.2013.12.006
 39. Gaujac A, Navickiene S, Collins MI, Brandt SD, de Andrade JB. Analytical techniques for the determination of tryptamines and β -carbolines in plant matrices and in psychoactive beverages consumed during religious ceremonies and neo-shamanic urban practices. *Drug Test Anal.* 2012;4: 636–648. doi:10.1002/dta.1343
 40. Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman MR, Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry.* Elsevier Masson SAS; 2020. pp. 80–89. doi:10.1016/j.plaphy.2020.01.006
 41. Callaway JC, Raymon LP, Hearn WL, McKenna DJ, Grob CS, Brito GS, et al. Quantitation of N,N-Dimethyltryptamine and Harmala Alkaloids in Human Plasma after Oral Dosing with Ayahuasca. *J Anal Toxicol.* 1996;20: 492–497. doi:10.1093/jat/20.6.492
 42. Mcilhenny EH. Ayahuasca Characterization, Metabolism in Humans, and Relevance To Endogenous N,N-Dimethyltryptamines. Doctoral Thesis. 2006.
 43. Samoylenko V, Rahman MM, Tekwani BL, Tripathi LM, Wang Y-H, Khan SI, et al. Banisteriopsis caapi, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol.* 2010;127: 357–367. doi:10.1016/j.jep.2009.10.030
 44. Shi B, Cao R, Fan W, Guo L, Ma Q, Chen X, et al. Design, synthesis and in vitro and in vivo antitumor activities of novel bivalent β -carbolines. *Eur J Med Chem.* 2013;60: 10–22. doi:10.1016/j.ejmech.2012.11.033
 45. Callaway JC. Various alkaloid profiles in decoctions of banisteriopsis caapi. *J Psychoactive Drugs.* 2005;37: 151–155. doi:10.1080/02791072.2005.10399796
 46. Mannocho-Russo H, Bueno PCP, Bauermeister A, De Almeida RF, Dorrestein PC, Cavalheiro AJ, et al. Can Statistical Evaluation Tools for Chromatographic Method Development Assist in the Natural Products Workflow? A Case Study on Selected Species of the Plant Family Malpigiaceae. *J Nat Prod.* 2020;83: 3239–3249. doi:10.1021/acs.jnatprod.0c00495
 47. Santos BWL, de Oliveira RC, Sonsin-Oliveira J, Fagg CW, Barbosa JBF, Caldas ED. Biodiversity of β -carboline profile of banisteriopsis caapi and ayahuasca, a plant and a brew with neuropharmacological potential. *Plants.* 2020;9: 1–14. doi:10.3390/plants9070870
 48. Santos MC, Navickiene S, Gaujac A. Determination of tryptamines and β -carbolines in Ayahuasca beverage consumed during brazilian religious ceremonies. *J AOAC Int.* 2017;100: 820–824.

doi:10.5740/jaoacint.16-0337

49. Manske RHF, Perkin WH, Robinson R. I.—Harmine and harmaline. Part IX. A synthesis of harmaline. *J Chem Soc.* 1927; 1–14. doi:10.1039/JR9270000001
50. Li S, Yang B, Zhang Q, Zhang J, Wang J, Wu W. Synthesis and bioactivity of beta-carboline derivatives. *Nat Prod Commun.* 2010;5: 1591–6. doi:10.1177/1934578X1000501016
51. Snyder HR, Parmerter SM, Katz L. The Synthesis of Derivatives of β -Carboline. III. The Nitration of Harman 1. *J Am Chem Soc.* 1948;70: 222–225. doi:10.1021/ja01181a064
52. Gabriel T, Marcos F. Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones. 1a ed. New York: Springer-Verlag; 2006. doi:10.1007/b135954
53. Santoro RS, Warren RJ. Isolation and identification of 8-(2-diphenylmethoxy-N-methylethylamine)-1,3-dimethylxanthine from dimenhydrinate. *J Pharm Sci.* 1971;60: 791–792. doi:10.1002/jps.2600600540
54. Zibuck R, Streiber JM. A new preparation of ethyl 3-oxo-4-pentenoate: a useful annelating reagent. *J Org Chem.* 1989;54: 4717–4719. doi:10.1021/jo00280a055
55. CIMA. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios CIMA. 2017. Recuperado: <https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html>
56. Waraksa E, Pokrywka A, Konop M, Namieśnik J, Kłodzińska E. Comparison of GC–MS and MEKC methods for caffeine determination in preworkout supplements. *Electrophoresis.* 2019;40: 1540–1549. doi:10.1002/elps.201800512
57. Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics.* 2007;3: 211–221. doi:10.1007/s11306-007-0082-2
58. Bizzo HR, Brilhante NS, Nolvachai Y, Marriott PJ. Use and abuse of retention indices in gas chromatography. *J Chromatogr A.* 2023;1708: 464376. doi:10.1016/j.chroma.2023.464376
59. Tsuchiya H, Hayashi H, Sato M, Shimizu H, Iinuma M. Quantitative analysis of all types of β -carboline alkaloids in medicinal plants and dried edible plants by high performance liquid chromatography with selective fluorometric detection. *Phytochem Anal.* 1999;10: 247–253. doi:10.1002/(SICI)1099-1565(199909/10)10:5<247::AID-PCA465>3.0.CO;2-9
60. Harron DWG. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: The ICH Process. *The Textbook of Pharmaceutical Medicine.* Wiley; 2013. pp. 447–460. doi:10.1002/9781118532331.ch23
61. Varela AP, Burrows HD, Douglas P, da Graça Miguel M. Triplet state studies of β -carbolines. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2001;146: 29–36. doi:10.1016/S1010-6030(01)00551-2
62. Biondic MC. Fotoquímica de β -Carbolinas en soluciones orgánicas diluidas. Universidad de Buenos Aires. 1996. Recuperado: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n2831_Biondic.pdf
63. Dias A, Varela AP, da Graça Miguel M, Becker RS, Burrows HD, Maçanita AL. β -Carbolines. 2. Rate Constants of Proton Transfer from Multiexponential Decays in the Lowest Singlet Excited State of Harmine in Water As a Function of pH. *J Phys Chem.* 1996;100: 17970–17977. doi:10.1021/jp961406u
64. MCKAY HAC, MILES JH. The Partition Law in Solvent Extraction. *Nature.* 1963;199: 65–66. doi:10.1038/199065a0
65. Highpine G. Unraveling the Mystery of the Origin of Ayahuasca by Gayle Highpine. 2012.
66. Herraiz T. Identification and occurrence of β -carboline alkaloids in raisins and inhibition of monoamine oxidase (MAO). *J Agric Food Chem.* 2007;55: 8534–8540. doi:10.1021/jf0719151

67. Pereira CAM, Rodrigues TR, Yariwake JH. Quantification of Harman Alkaloids in Sour Passion Fruit Pulp and Seeds by a Novel Dual SBSE-LC/Flu (Stir Bar Sorptive Extraction-Liquid Chromatography with Fluorescence Detector) Method. J Braz Chem Soc. 2014;25: 1472–1483. doi:10.5935/0103-5053.20140130
68. Herraiz T, Chaparro C. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: β -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. Biochem Biophys Res Commun. 2005;326: 378–386. doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.033

ANEXOS

Anexo 1: Rendimiento de las reacciones

Compuesto: Harmina

De (236,7 mg -> 0,2367 g) de harmalina Se obtuvo 200mg de Harmina

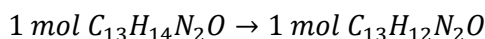
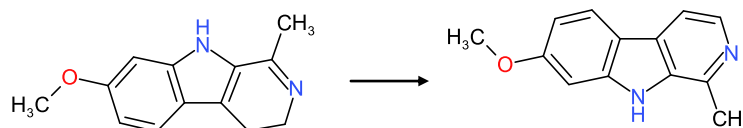
MW Harmalina= 214,3 g.mol⁻¹

MW Harmina = 212,2 g.mol⁻¹

a) Calcular los moles de Harmalina

$$0,2367g \times \frac{1 \text{ mol Harmalina}}{214,3 \text{ g Harmalina}} = 0,0011045264 \text{ mol Harmalina}$$

b) Factor estequiométrico



$$0,0011045264 \text{ mol Harmalina} \times \frac{1 \text{ mol Harmina}}{1 \text{ mol Harmalina}} = 0,0011045264 \text{ mol Harmina}$$

c) Calcular la masa de Harmina

$$0,0011045264 \text{ mol Harmina} \times \frac{212,2 \text{ g Harmina}}{1 \text{ mol Harmina}} = 0,2344 \text{ g Harmina (Rendimiento teórico)}$$

d) Rendimiento porcentual

$$\begin{aligned} \%yield &= \frac{\text{Rendimiento real del producto (g)}}{\text{Rendimiento teórico (g)}} \times 100 \\ \%yield &= \frac{0,2 \text{ (g)}}{0,2344 \text{ (g)}} \times 100 \\ \%yield &= 85 \end{aligned}$$

Compuesto: Tetrahydroharmina

De (217 mg -> 0,217 g) de harmalina se obtuvo 129,2 mg Tetrahydroharmina THH

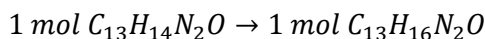
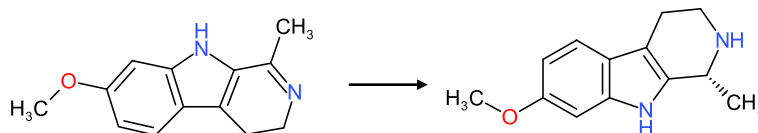
MW Harmalina= 214,3 g.mol⁻¹

MW Tetrahydroharmina= 216,3 g.mol⁻¹

a) Calcular los moles de Harmalina

$$0,217g \times \frac{1 \text{ mol Harmalina}}{214,3 \text{ g Harmalina}} = 0,00101259916 \text{ mol Harmalina}$$

b) Factor estequiométrico



$$0,00101259916 \text{ mol Harmalina} \times \frac{1 \text{ mol THH}}{1 \text{ mol Harmalina}} = 0,00101259916 \text{ mol THH}$$

c) Calcular la masa de THH

$$0,00101259916 \text{ mol THH} \times \frac{216,3 \text{ g THH}}{1 \text{ mol THH}} = 0,2190252 \text{ g THH (Rendimiento teórico)}$$

d) Rendimiento porcentual

$$\%yield = \frac{\text{Rendimiento real del producto (g)}}{\text{Rendimiento teórico (g)}} \times 100$$

$$\%yield = \frac{0,1292 \text{ (g)}}{0,2190252 \text{ (g)}} \times 100$$

$$\%yield = 59$$

Anexo 2: Curvas de calibración

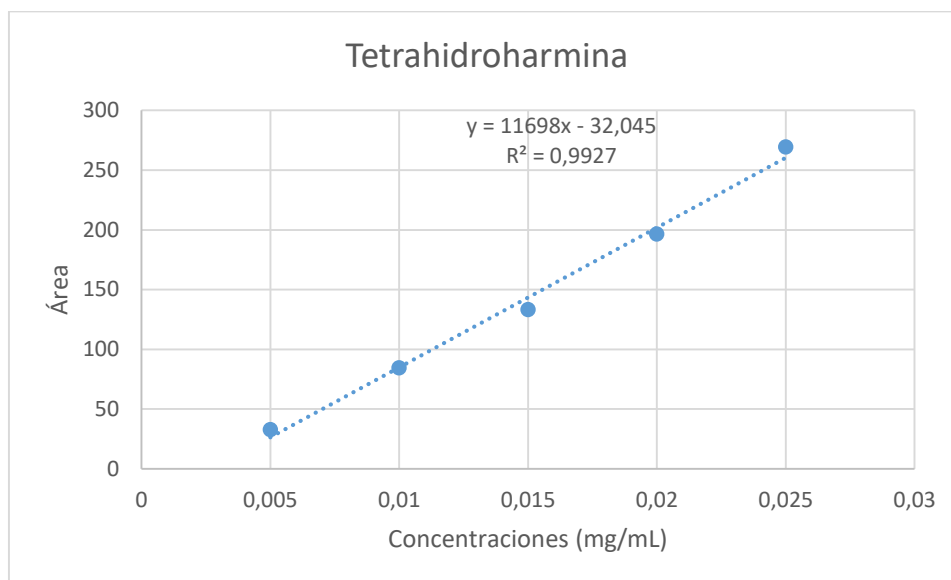


Figura 2-3. Curva de calibración de estándar tetrahidroharmina

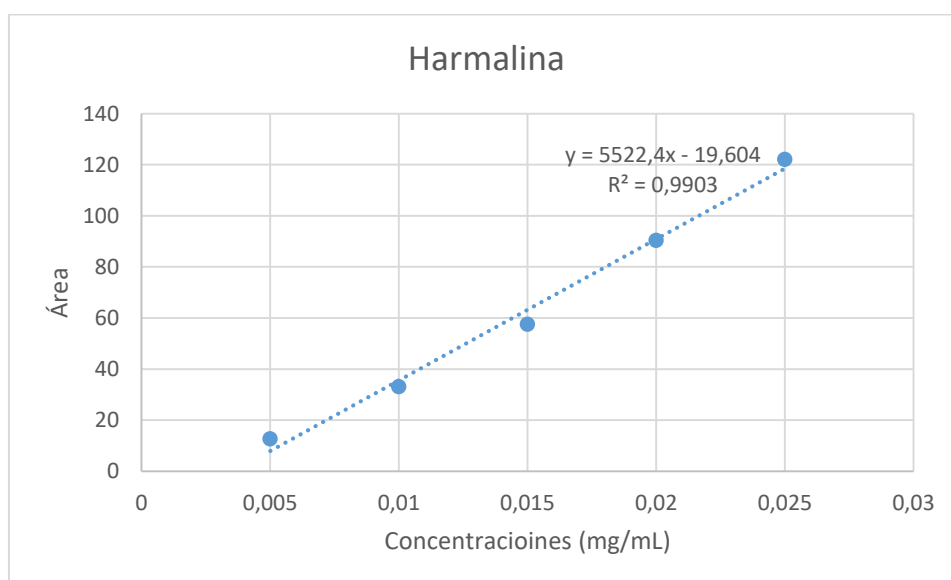


Figura 2-4. Curva de calibración de estándar harmalina

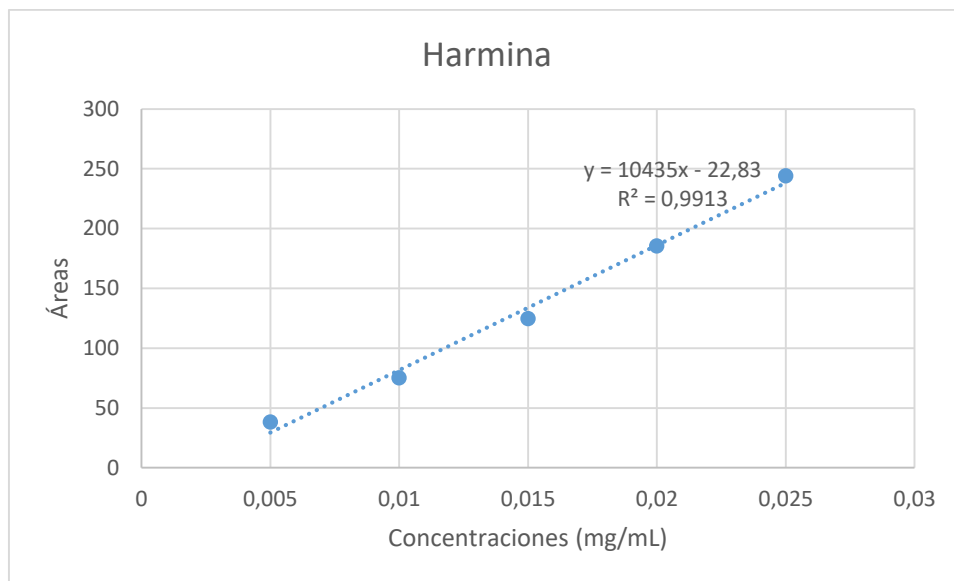


Figura 2-5. Curva de calibración de estándar harmina