

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PERFIL QUÍMICO DA AYAHUASCA E DA ESPÉCIE *BANISTERIOPSIS CAAPI* E  
SEU POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO EM CULTURA DE CÉLULAS BV-2**

**ALUNA: BEATRIZ WERNECK LOPES SANTOS**  
**ORIENTADORA: ELOISA DUTRA CALDAS**

**BRASÍLIA – DF**  
**2021**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PERFIL QUÍMICO DA AYAHUASCA E DA ESPÉCIE *BANISTERIOPSIS CAAPI* E  
SEU POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO EM CULTURA DE CÉLULAS BV-2**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

**BRASÍLIA – DF**

**2021**

Beatriz Werneck Lopes Santos

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 06 de dezembro de 2021.

Banca examinadora

---

Profa. Dra. Eloisa Dutra Caldas  
Universidade de Brasília  
Presidente

---

Prof. Dr. Maurício Yonamine  
Universidade de São Paulo

---

Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula  
Universidade Federal de Alfenas

---

Profa. Dra. Andrea Barretto Motoyama  
Universidade de Brasília

*Aos meus pais, Geraldo e Terezinha, pelo amor,  
dedicação e exemplo de humanidade.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Geraldo e Terezinha, pelo apoio incondicional, confiança e incentivo aos estudos. Eu nunca teria chegado a lugar algum sem eles.

Ao meu marido Aldo por sempre acreditar que eu era capaz e por estar ao meu lado durante toda essa jornada.

Ao meu irmão Felipe, minha cunhada Samira e meu afilhado Samuel por completar nossa família e nos trazer tantas alegrias em todos os momentos.

À professora Eloisa pela orientação, confiança e ensinamentos. Por ser um exemplo de profissionalismo e uma grande pesquisadora.

À CAPES e à FAP-DF pelo auxílio financeiro.

À professora Maria Lucília dos Santos do laboratório de síntese do instituto de química da UnB pela grande ajuda na síntese dos padrões analíticos.

À União do Vegetal pelo auxílio na coleta das amostras de mariri e ayahuasca, em especial ao mestre Mesquita pela recepção em Cruzeiro do Sul e visita à floresta e ao professor Beethoven pela coordenação de um grande projeto de coleta de amostras.

Aos engenheiros Diogo e Felipe da Embrapa Agroenergia pela ajuda com a trituração das amostras.

Às professoras Regina Célia de Oliveira e Júlia Sonsin de Oliveira e à mestranda Camila do Instituto de Biologia pela ajuda na coleta das amostras de mariri e ayahuasca.

Ao biólogo Daniel Moreira do Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada pela imensurável ajuda com a cultura de células e ensaios biológicos, assim como às professoras Tatiana Borges e Selma Kuckelhaus

A todos os colegas do LabTox, em especial Patrícia, Denise, Gabriel, Ettore e Peter pelo companheirismo, ensinamentos e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Às amigas Nayara e Jose e pela amizade, companheirismo e ajuda em todos os momentos do doutorado.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE QUADROS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	vii
RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
I. INTRODUÇÃO .....	3
II. REVISÃO DA LITERATURA .....	5
<b>1. Ayahuasca, uso tradicional e uso urbano</b> .....	5
<b>2. Propriedades psicotrópicas e composição da ayahuasca</b> .....	7
<b>3. Análise fitoquímica da ayahuasca, <i>B. caapi</i> e <i>P. viridis</i></b> .....	10
3.1. <i>Métodos analíticos</i> .....	10
3.2. <i>Análise qualitativa dos principais alcaloides presentes na ayahuasca</i> .....	11
3.3. <i>Análise quantitativa de alcaloides presentes na ayahuasca</i> .....	15
<b>4. Toxicidade da ayahuasca</b> .....	19
<b>5. Efeitos terapêuticos da ayahuasca e seus componentes</b> .....	20
5.1 <i>Estudos em humanos</i> .....	20
5.2 <i>Estudos em modelo animal</i> .....	22
5.3. <i>Ensaio in vitro</i> .....	24
<b>6. Micróglia e inflamação</b> .....	25
<b>7. Ensaio de atividade biológica em culturas de células</b> .....	30
7.1. <i>Viabilidade celular</i> .....	30
7.2 <i>Apoptose e necrose</i> .....	31
7.3 <i>Estresse oxidativo – espécies reativas de oxigênio</i> .....	33
III. OBJETIVOS.....	35
IV. ESTRUTURA DA TESE.....	36
1. Biodiversity of $\beta$ -Carboline Profile of <i>Banisteriopsis caapi</i> and Ayahuasca, a Plant and a Brew with Neuropharmacological Potential.....	37
2. Anti-inflammatory potential of <i>Banisteriopsis caapi</i> and its components in microglial cells .....	38

V. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	68
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
ANEXO I.....	79

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

<b>Figura 1.</b> Diferentes tipos de cipó <i>B. caapi</i> utilizados no preparo da ayahuasca: (A) tucunacá; (B) caupuri; (C) ourinho fresco; (D) ourinho alguns dias após coleta. ....	6
<b>Figura 2.</b> Estruturas químicas dos principais alcaloides presentes na ayahuasca e da serotonina. ....	9
<b>Figura 3.</b> Esquema de “interruptor” fenotípico exibido pela micróglia (Braga et al. 2019) ...	26
<b>Figura 4.</b> Mecanismos comuns de ativação da micróglia e produção de fatores envolvidos em doenças neurodegenerativas (Smith et al., 2012) .....	30
<b>Figura 5.</b> Esquema de dupla marcação com anexina V FITC e iodeto de propídio ( <a href="https://lifebiolab.com/wp-content/uploads/2019/03/Life-biolab-Annexin-V-Kit-FITC-Pi.pdf">https://lifebiolab.com/wp-content/uploads/2019/03/Life-biolab-Annexin-V-Kit-FITC-Pi.pdf</a> ) .....	32

### CAPÍTULO 2

<b>Figure 2.1.</b> HPLC-DAD chromatogram of a <i>Banisteriopsis caapi</i> methanolic extract, at 230 nm .....	44
<b>Figure 2.2.</b> Viability of BV-2 cells treated at different concentrations for 2 hours with <i>B. caapi</i> extract (BH), the isolated fractions F1 to F5 and the $\beta$ -carboline. Values are presented as mean $\pm$ SEM. RLU: relative light units; * $p$ <0.05, ** $p$ < 0.01, *** $p$ <0.001 compared to cells with no treatment (0 $\mu$ g/mL). ....	46
<b>Figure 2.3.</b> Results from flow cytometric analysis for apoptosis detection of 24 h treated BV-2 cells. Representation of different cell populations based on FITC Annexin V/PI staining. Mean $\pm$ SEM; * $p$ <0.05, ** $p$ < 0.01, *** $p$ <0.001 compared to control cells (0 $\mu$ g/mL).....	48
<b>Figure 2.4.</b> ROS production of 24 h treated BV-2 cells. MFI: mean fluorescence intensity; Mean $\pm$ SEM; * $p$ <0.05, ** $p$ < 0.01, *** $p$ <0.001 compared to control (0 $\mu$ g/mL). ....	49
<b>Figure 2.5.</b> Cytokine production by BV-2 cells after treatment with F4 for 2 h. Mean $\pm$ SEM * $p$ <0.05; ** $p$ <0.01; *** $p$ <0.001 compared to control cells (0 $\mu$ g/mL). ....	50
<b>Figure 2.6.</b> Cytokine production by BV-2 cells after treatment with F5 for 2 h. Mean $\pm$ SEM; * $p$ <0.05; ** $p$ <0.01; *** $p$ <0.001 compared to cells with no treatment (0 $\mu$ g/mL). ....	52
<b>Figure 2.7.</b> Cytokine production by BV-2 cells after treatment with harmine for 2 h. Mean $\pm$ SEM; * $p$ <0.05; ** $p$ <0.01; *** $p$ <0.001 compared to cells with no treatment (0 $\mu$ g/mL). ....	53
<b>Figure 2.8.</b> Cytokine production by BV-2 cells after treatment with harmaline for 2 h. Mean $\pm$ SEM; * $p$ <0.05; ** $p$ <0.01; *** $p$ <0.001 compared to cells with no treatment (0 $\mu$ g/mL). ....	54
<b>Figure 2.9.</b> Cytokine production by BV-2 cells after treatment with THH for 2 h. Mean $\pm$ SEM; * $p$ <0.05; ** $p$ <0.01; *** $p$ <0.001 compared to cells with no treatment (0 $\mu$ g/mL). ....	56
<b>Figure 2.10.</b> Cytokine production by BV-2 cells after treatment with <i>B. caapi</i> for 2 h. Mean $\pm$ SEM; * $p$ <0.05, ** $p$ < 0.01, *** $p$ <0.001 compared to cells with no treatment (0 $\mu$ g/mL). ....	57
<b>Figure 2.11.</b> Cytokine production by BV-2 cells after treatment with F1 for 2 h. Mean $\pm$ SEM; * $p$ <0.05 compared to cells with no treatment (0 $\mu$ g/mL). ....	58
<b>Figure 2.12.</b> Cytokine production by BV-2 cells after treatment with F2 for 2 h. Mean $\pm$ SEM; Mean $\pm$ SEM; ** $p$ < 0.01 compared to cells with no treatment (0 $\mu$ g/mL). ....	59
<b>Figure 2.13.</b> Cytokine production by BV-2 cells after treatment with F3 for 2 h. Mean $\pm$ SEM; * $p$ <0.05 compared to cells with no treatment (0 $\mu$ g/mL). ....	60



## LISTA DE QUADROS

### REVISÃO DA LITERATURA

**Quadro 1.** Moléculas isoladas e identificadas em extratos de *B. caapi*.....24

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DA LITERATURA

**Tabela 1.** Concentrações de alcaloides na ayahuasca, em *B. caapi* e *P. viridis* reportados na literatura e métodos de extração e quantificação utilizados. As faixas de concentrações e as médias obtidas são expressas em mg/g para *B. caapi* em mg/mL para ayahuasca.....28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•OH	Hidroxil
5HT	Serotonina
5HT <sub>2A</sub>	Receptor 2A de serotonina
ACN	Acetonitrila
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BC	<i>Banisteriopsis caapi</i>
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDI	Centro de Desenvolvimento Integral Luz do Vegetal
CNS	Central nervous system
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CONAD	Conselho nacional antidrogas
CYP1A1	<i>Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1</i>
DAMPS	Padrões Moleculares associados a danos
DCF	2'-7' diclorofluoresceína
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DMT	N,N-dimetiltriptamina
DYRK1A	<i>Dual specificity tyrosine-phosphorylationregulated kinase 1A</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ESI	<i>Eletrospray</i>
FAP	Fundação de Apoio à Pesquisa
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GC-FID	Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
GC-NPD	Cromatografia gasosa acoplada a detector de nitrogênio-fósforo
H <sub>2</sub> DCF	2'-7' diclorodihidrofluoresceína

H <sub>2</sub> DCFDA	Diacetato de 2'-7' diclorodihidrofluoresceína
H <sub>2</sub> DCFDA-AM	Acetometil éster de diacetato de 2'-7' diclorodihidrofluoresceína
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HO <sub>2</sub> •	Hidroperoxil
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo
HPLC-FD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência
IFN	Interferon
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	Interleucina
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
LPS	Lipopolissacarídeo
MAO	Monoamina oxidase
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOAEL	Nível sem efeitos adversos observáveis
O <sub>2</sub> •-	Superóxido
O <sub>3</sub>	Ozônio
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PDMS/PDV	Polimetilsiloxano/divinilbenzeno
PI	<i>Propidium iodide</i>
PPi	Pirofosfato inorgânico
RLU	<i>Relative light units</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RO <sub>2</sub> •	Peroxil
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RSD	<i>Relative standard deviation</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>

SNC	Sistema nervoso central
SPME	Microextração em fase sólida
TGF	Fator de crescimento transformador
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th17	Linfócito T auxiliar tipo 17
THH	Tetrahydroharmina
TNF	Fator de necrose tumoral
TOF	<i>Time of flight</i>
UDV	União do vegetal
UV	Ultravioleta

## RESUMO

SANTOS, Beatriz Werneck Lopes. **Perfil químico da ayahuasca e da espécie *Banisteriopsis caapi* e seu potencial anti-inflamatório em cultura de células BV-2.** Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília 2021.

A ayahuasca é uma bebida psicotrópica com grande potencial terapêutico preparada principalmente pela decocção do cipó de *Banisteriopsis caapi* e das folhas da *Psychotria viridis*. Este estudo teve como objetivos caracterizar o perfil químico de indivíduos de *B. caapi* e de amostras de ayahuasca coletadas em diversas regiões do país e avaliar a atividade biológica do extrato de *B. caapi* e seus componentes em células de micróglia BV-2. No total, 33 amostras de ayahuasca e 176 amostras de cipó da família Malpighiaceae foram coletadas, sendo 159 *B. caapi*. Os cipós secos foram triturados e extraídos com metanol e a ayahuasca diluída em água para análise por método LC-MS/MS otimizado e validado. As concentrações médias das amostras de *B. caapi* foram de 4,79 mg/g de harmina, 0,451 mg/g de harmalina e 2,18 mg/g de THH, com uma alta variabilidade entre as amostras (DPR de 78,9 a 170%). Amostras nativas de *B. caapi* tiveram concentração de harmina maior do que as cultivadas e amostras do DF/GO tiveram maior concentração de THH do que as amostras do Acre. Concentrações nas amostras de ayahuasca variaram de 0,109 a 7,11 mg/mL de harmina, 0,012 a 0,945 mg/mL de harmalina, 0,09 a 3,05 mg/mL de THH e 0,10 a 3,12 mg/mL de DMT. Foi confirmada a hipótese de que a harmina é reduzida a harmalina e então a THH durante a decocção no preparo da ayahuasca. Uma amostra de *B. caapi* do tipo ourinho coletada em Goiás foi submetida a cromatografia semipreparativa (HPLC-DAD) para isolamento de potenciais novos compostos desta planta. As frações isoladas foram analisadas por LC-MS/MS do tipo TOF de alta resolução para determinação de massa exata  $[M+H]^+$ : F1 – 174,0918 e 233,1289; F2 – 353,1722; F3 – 304,3001; F4 – 188,1081; F5 – 205,0785. A atividade biológica das frações, do extrato de *B. caapi* e das  $\beta$ -carbolinas harmina, harmalina e THH foi avaliada por meio dos testes de viabilidade celular, apoptose/necrose, produção de EROS e produção de citocinas por células microgliais BV-2, cultivadas em DMEM. A maioria dos tratamentos resultou em ação anti-inflamatória com redução na produção de citocinas pró-inflamatórias, em especial as frações F4 e F5 e as  $\beta$ -carbolinas. Os resultados sugerem que compostos presentes no extrato de *B. caapi* têm potencial para tratar doenças neurodegenerativas, uma vez que o excesso de ativação microglial pró-inflamatória está envolvido na neuropatologia de doenças do SNC.

**Palavras-chave:** ayahuasca; *Banisteriopsis caapi*;  $\beta$ -carbolinas; micróglia; citocinas.

## ABSTRACT

SANTOS, Beatriz Werneck Lopes. **Chemical profile of ayahuasca and *Banisteriopsis caapi* and its anti-inflammatory potential in BV-2 cell culture**. Doctoral thesis in Pharmaceutical Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil 2021.

Ayahuasca is psychoactive brew with important therapeutic potential that is prepared by the decoction of *Banisteriopsis caapi* vine and *Psychotria viridis* leaves. The main objectives of this study were to investigate the chemical profile of *B. caapi* and of ayahuasca collected in various Brazilian regions and to evaluate the biological activity of *B. caapi* extract and its components in BV-2 microglial cells. In total, 33 ayahuasca samples and 176 Malpighiaceae lianas, of which 159 *B. caapi*, were collected. Dried liana samples were powdered, extracted with methanol, diluted, and analyzed by an optimized and validated LC-MS/MS method. Ayahuasca samples were diluted with water and analyzed. Mean concentrations in *B. caapi* were 4.79 mg/g harmine, 0.451 mg/g harmaline, and 2.18 mg/g tetrahydroharmine (THH), with a high variability among the samples (RSD from 78.9 to 170%). Native *B. caapi* samples showed significantly higher harmine concentrations than cultivated ones, and samples from the Federal District/Goiás had higher THH content than those collected in the State of Acre. Concentrations in ayahuasca samples ranged from 0.109 to 7.11 mg/mL harmine, 0.012 to 0.945 mg/mL harmaline, 0.09 to 3.05 mg/mL THH, and 0.10 to 3.12 mg/mL DMT. The analysis of paired ayahuasca/*B. caapi* confirmed that harmine is reduced to harmaline and to THH during the brew preparation. A *B. caapi* sample of “ourinho” type was submitted to semipreparative chromatography (HPLC-DAD) for the isolation of potentially new compounds. Isolated samples were analyzed by high resolution LC-MS/MS TOF for exact mass determination  $[M+H]^+$ : F1 – 174.0918 e 233.1289; F2 – 353.1722; F3 – 304.3001; F4 – 188.1081; F5 – 205.0785. Biological activity of fractions, *B. caapi* extract and  $\beta$ -carbolines harmine, harmaline and THH was evaluated by cellular viability and apoptosis/necrosis assays and ROS and cytokines production by BV-2 microglial cells. Most of the treatments resulted in anti-inflammatory effects with the reduction of proinflammatory cytokines production, especially fractions F4 and F5 and the  $\beta$ -carbolines. The results suggest that the compounds present in *B. caapi* extract have the potential to treat neurodegenerative diseases, as the excess of proinflammatory microglial activation is involved in the neuropathology of CNS diseases.

**Key words:** ayahuasca; *Banisteriopsis caapi*;  $\beta$ -carbolines; microglia; cytokines.

## I. INTRODUÇÃO

Ayahuasca é uma bebida normalmente preparada a partir da decocção das espécies vegetais *Banisteriopsis caapi*, conhecida como mariri ou jagube, e *Psychotria viridis*, chamada de chacrona ou rainha. A preparação é de uso tradicional por comunidades indígenas há centenas de anos com objetivos mágico-religiosos e curativos devido aos efeitos psicotrópicos observados. Desde a década de 30, grupos religiosos urbanos têm surgido e fazem uso da ayahuasca a fim de se utilizar de suas propriedades psicoativas, uso que tem ganhado grande relevância na atualidade (Luna, 1984; McKenna et al., 1984; Tupper, 2008; McKenna et al., 1998)

Com o crescimento do consumo da ayahuasca nos últimos anos, tem-se aumentado a preocupação dos possíveis efeitos tóxicos pelo seu uso não ritualístico, ao mesmo tempo em que se explora o seu potencial terapêutico. Relatos sobre o uso terapêutico da ayahuasca demonstram seu potencial na reabilitação de dependentes químicos, no alívio dos sintomas relacionados à depressão e na melhoria da função neuromotora em pacientes portadores da doença de Parkinson, o que faz dessa preparação um novo aliado como fonte de compostos com atividade farmacológica (Fábrega et al., 2010; Palhano-Fontes et al., 2008; Serrano-Dueñas et al., 2001).

Os principais compostos químicos contidos no chá são as  $\beta$ -carbolinas harmalina, harmalina e tetrahydroharmina (THH) presentes na *B. caapi*, e a N,N-dimetiltriptamina (DMT), presente na *P. viridis* (McKenna et al., 1984; Smith et al., 1998), mas uma caracterização química abrangente é necessária para se identificar todas as substâncias presentes que possam ter efeitos biológicos. Além disso, a identificação correta de espécies vegetais empregadas nas preparações pode ser desafiadora. Entre os centros que preparam a bebida, existe uma diversidade de plantas cultivadas e utilizadas que são identificadas como as espécies *B. caapi* e *P. viridis*. Porém, não existe uma caracterização sistemática da espécie utilizada, o que pode levar a preparações com características diferentes, composição química variada e, conseqüentemente, efeitos biológicos diversos.

Os principais efeitos terapêuticos observados da ayahuasca e de seus componentes estão relacionados ao sistema nervoso central. Um dos grupos de células presentes no cérebro é a micróglia que consiste em células imunes específicas do sistema nervoso que funcionam como macrófagos tecido-residentes. Elas são peças-chave na patogênese neural e são encontradas em sua forma ativada em que produzem substâncias citotóxicas inflamatórias como citocinas em muitas doenças inflamatórias crônicas neurodegenerativas, incluindo Alzheimer e

Parkinson. A linhagem de células microgliais BV-2 derivada de camundongos é um modelo bastante utilizado para se avaliar atividade biológica de novos compostos *in vitro* (Galloway et al., 2019; Messeha et al., 2019; Henn et al., 2009).

O projeto tem como objetivo geral caracterizar o perfil químico de indivíduos da espécie *Banisteriopsis caapi* utilizados na preparação do chá da ayahuasca e do chá preparado em amostras coletadas de diversas regiões do país e avaliar a atividade biológica do extrato de *B. caapi* e seus componentes em células BV-2.



## II. REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Ayahuasca, uso tradicional e uso urbano

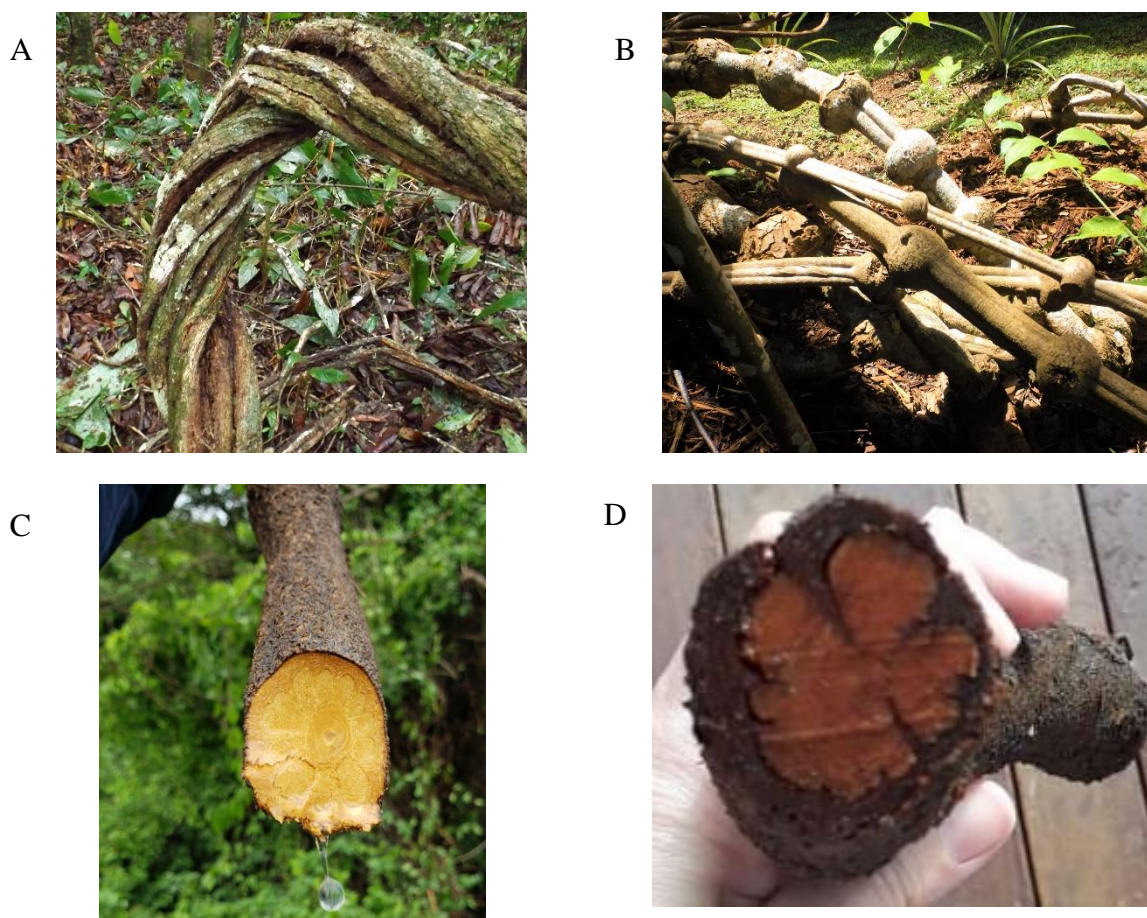
Ayahuasca é o nome dado a uma bebida com propriedades psicotrópicas tradicionalmente utilizada em rituais religiosos de comunidades indígenas da região amazônica. O termo é uma palavra composta do idioma Quechua que significa “cipó da alma”, onde “aya” significa alma, ancestrais ou pessoa morta, e “wasca” (huasca) significa cipó, corda (Schultes, 1957; Rivier & Lindgren, 1972).

A bebida de gosto amargo e cor escura é comumente preparada por meio da decocção do cipó de *B. caapi* em combinação com outras plantas, como folhas do arbusto *Psychotria viridis*, *Psychotria carthagenensis* e *Diplopterys cabrerana* (Luna, 1984; McKenna et al., 1984; Pinkley, 1969). Tradicionalmente, a ayahuasca pode ser preparada sem a adição de outras plantas, utilizando-se somente a *B. caapi* (Callaway, 2005), mas a preparação mais comumente utilizada é a decocção de *B. caapi* juntamente com as folhas de *P. viridis* (Tupper, 2008). A bebida é também conhecida por outros nomes como hoasca, daime, yajé, natema, vegetal ou simplesmente chá (Schultes, 1963; Pinkley, 1969; McKenna et al., 1984; McKenna, 2006). Na década de 80, o antropologista Luna relatou mais de 70 diferentes nomes indígenas para preparações da ayahuasca, o que demonstra a difusão de seu uso por grupos geograficamente não vinculados (Luna, 1984).

A espécie *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C. V. Morton é um cipó gigante da família Malpighiaceae nativa da região amazônica, com folhas de formato oval e pontiagudo na extremidade. Tribos indígenas da Amazônia ocidental do Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela preparam decocções ou infusões dessa planta e outras do gênero *Banisteriopsis* com a casca do seu cipó (Schultes, 1969; McKenna et al., 1984; Schultes & Hofman, 1980). Entre os feitores da ayahuasca existe o reconhecimento de “tipos” do cipó (Teixeira et al., 2008) e Langdon (1986) documentou o reconhecimento de pelo menos 18 tipos de *B. caapi* pelos índios Siona, que destacam características como o comprimento e largura do caule, o tamanho e forma das folhas e a presença ou ausência de flores. Schultes et al. (1980) afirmam que nativos da Amazônia reconhecem pelo menos 30 diferentes tipos de cipó *B. caapi* com diferentes usos na medicina tradicional e ayahuasqueiros peruanos distinguem até 10 tipos (Langdon, 1986)

No ritual da União do Vegetal, uma das principais religiões ayahuasqueiras urbanas, são utilizados dois tipos do cipó: o caupuri, que possui nós caulinares inflados (Figura 1B) e o

Tucunacá, que não apresenta nós inflados em sua morfologia (Figura 1A). Ayahuasqueiros do Santo Daime utilizam principalmente o cipó do tipo ourinho, que é caracterizado por uma coloração amarelada (Figuras 1C e 1D).



**Figura 1.** Diferentes tipos de cipó *B. caapi* utilizados no preparo da ayahuasca: (A) tucunacá; (B) caupuri; (C) ourinho fresco; (D) ourinho alguns dias após coleta. Imagens da autora e de colaboradores.

A *Psychotria viridis* é um arbusto nativo da Amazônia (Porto et al., 2009) morfologicamente similar a outras espécies do gênero popularmente conhecido como chacrona ou rainha (Blackledge & Taylor, 2003). O gênero *Psychotria* pertence à família Rubiaceae e foi descrito por Linneaus em 1759, como um dos maiores gêneros de plantas com flores, com cerca de 1000 espécies (Soares, 2015). É representado por arbustos e cresce naturalmente em áreas florestais planas e úmidas da América Central e da América do Sul, principalmente na Amazônia peruana e boliviana (Blackledge & Taylor, 2003). Devido à pequena quantidade de características morfológicas diferenciadoras, o gênero *Psychotria* é de taxonomia complexa e de difícil identificação (Porto et al., 2009).

Várias populações indígenas e mestiças das regiões amazônicas utilizam a ayahuasca em rituais mágicos e religiosos, e a bebida ocupa uma posição central na etnomedicina desses povos. Está presente nos momentos mais importantes das comunidades, como nascimento, passagem à vida adulta, doença e morte (Luna, 1984; Santos, 2010). Sua utilização acontece há séculos, tendo sido descrita pela primeira vez por Villavicencio em 1858. O autor relatou o uso da bebida por tribos indígenas da Amazônia equatoriana para feitiçaria, profecia e adivinhação (Schultes, 1957). A ayahuasca no contexto da medicina tradicional indígena e uso xamânico é usada para cura, adivinhação, diagnóstico e um condutor mágico ao reino supernatural, o que contrasta com o uso contemporâneo no contexto das religiões sincréticas brasileiras (McKenna et al., 1998).

No Brasil, o uso da ayahuasca passou por transformações culturais radicais, o que resultou na associação da preparação a crenças religiosas cristãs e afro-brasileiras para dar origem a igrejas como o Santo daime, a União do Vegetal (UDV), a Barquinha e outros movimentos espirituais (Domínguez-Clavé et al., 2016). Desde a década de 1930, seu uso é feito durante cultos dessas religiões criadas na Amazônia brasileira, mais especificamente no estado do Acre. A criação dessas novas igrejas e a forma de uso da ayahuasca têm contribuído para a expansão recente do uso da ayahuasca para outros países, estando atualmente presente em todos os continentes (Tupper, 2008; Labate & Feeney, 2012; Motta et al., 2018). O uso ritualístico da ayahuasca é autorizado no Brasil desde 1987, quando foi publicado o relatório final de atividades designado pela resolução nº 07 de 1986 do Conselho Federal de Entorpecentes (Labate & Feeney, 2012). Desde então, houve vários debates de grupos multidisciplinares para estabelecer normas de uso da ayahuasca, o que culminou na publicação da resolução nº 01 de 2010 pelo Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas (CONAD). A norma legitima e regulamenta a pesquisa científica e o uso do chá de ayahuasca no contexto religioso, mesmo por mulheres grávidas e menores de idade, desde que haja pleno consentimento e consenso dos pais (Brasil, 2010).

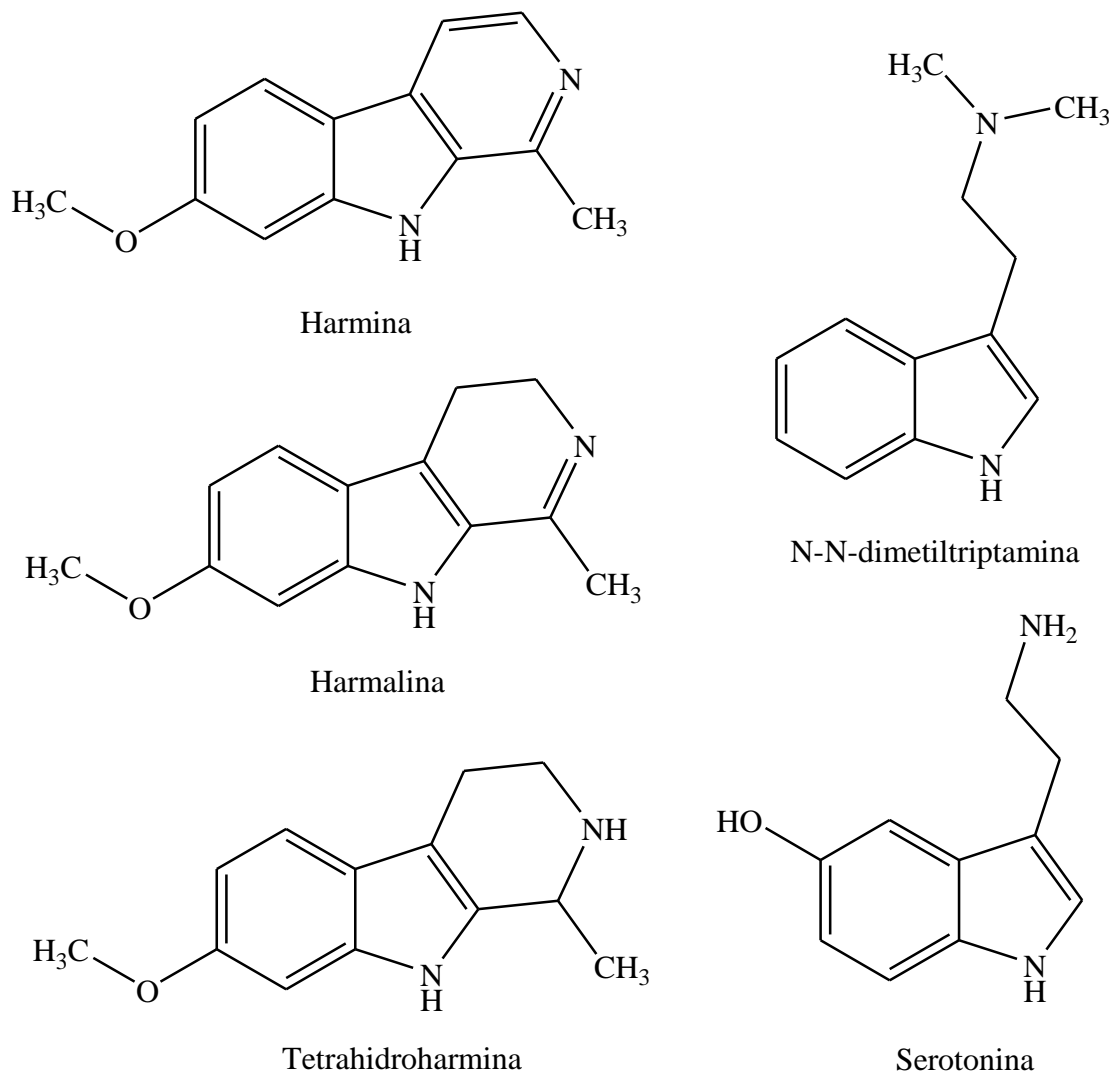
## **2. Propriedades psicotrópicas e composição da ayahuasca**

As propriedades psicotrópicas da ayahuasca são atribuídas principalmente à presença da triptamina alucinógena N,N-dimetiltriptamina (DMT; Figura 2), composto encontrado nas folhas do arbusto *P. viridis* capaz de produzir alucinações visuais e de levar a um estado de dissociação (McKenna et al., 1984; Smith et al., 1998). As triptaminas têm um papel fundamental no organismo humano. A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT; Figura 2)

é uma triptamina endógena envolvida na regulação e modulação de múltiplos processos do sistema nervoso central como sono, cognição, regulação de temperatura e comportamento (Tittarelli et al., 2015). O DMT interage com a neurotransmissão serotoninérgica agindo como agonista parcial em receptores serotoninérgicos, principalmente o 5-HT<sub>2A</sub> (Deliganis et al., 1991; Smith et al., 1998; Keiser et al., 2009). Esse receptor parece ser necessário para efeitos típicos de drogas clássicas alucinógenas, porém não é o único responsável, uma vez que a serotonina por si só, além de outros agonistas desse receptor, não são alucinógenos (Frecska et al., 2016). Sabe-se que o DMT interage também com receptores glutamato ionotrópicos e metabotrópicos, receptores de dopamina, acetilcolina, receptores associados a aminas-traço (relacionado a efeitos psicodélicos de drogas) e sigma-1 (associado a dependência, depressão, amnésia, dor e câncer) (Carbonaro & Gatch, 2017).

O DMT é um indol alcaloide largamente encontrado na natureza. É um composto endógeno encontrado em animais, inclusive no homem, e em uma grande variedade de plantas ao redor do mundo (Carbonaro & Gatch, 2017). É controlado internacionalmente pela Convenção de Substâncias psicotrópicas das Nações Unidas de 1971 (Labate & Feeney, 2012) e no Brasil, figurando na lista de substâncias de uso proscrito (Portaria nº 344/1998 da Anvisa).

Essa substância é conhecida por causar intensas modificações cognitivas e perceptivas quando administrado parenteralmente (Strassman & Qualls, 1994), mas é destituída de atividade psicotrópica após ingestão devido à extensa degradação enzimática de primeira passagem pela enzima monoamina oxidase A (MAO-A) (Riba et al., 2012) presente no intestino e no fígado (Araújo et al., 2015). Entretanto, o cipó de *B. caapi* contém alcaloides do grupo das  $\beta$ -carbolinas, principalmente harmina, harmalina e tetrahydroharmina (Figura 2) (Hashimoto, 1975), potentes inibidores reversíveis da MAO, em especial da MAO-A (Riba et al., 2012; Santillo et al., 2014). A ação de tais substâncias na inibição da MAO possibilita que o DMT não seja oxidado e seja absorvido após administração oral e alcance seu sítio de ação no sistema nervoso central (Ott, 1999). O DMT oral consumido na ayahuasca tem cinética lenta chegando a sua concentração sérica máxima após 107 minutos e seu tempo de meia vida é de 259 minutos (Callaway et al., 1999).



**Figura 2.** Estruturas químicas dos principais alcaloides presentes na ayahuasca e da serotonina.

As  $\beta$ -carbolidinas representam um grande grupo de alcaloides naturais ou sintéticos que possuem em comum uma estrutura tricíclica pirido[3,4-b]indol (Figura 2). São encontradas em alimentos, plantas, animais marinhos, insetos, mamíferos assim como em tecidos humanos. Esses compostos exercem diversas atividades farmacológicas e têm efeitos sedativo, hipnótico, ansiolítico, anticonvulsivante, antitumoral, antitrombótico, antiparasitário, antimicrobiano e antiviral (Cao et al., 2007). Harmina e harmalina têm efeitos alucinógenos em humanos, provavelmente devido a sua interação com receptores de serotonina, dopamina, benzodiazepínicos, imidazolina e opioides (Glennon et al., 2000; Cao et al., 2007; Brierley and Davidson, 2013).

### 3. Análise fitoquímica da ayahuasca, *B. caapi* e *P. viridis*

#### 3.1. Métodos analíticos

A análise e determinação da composição de plantas é baseada na aplicação consecutiva de várias técnicas para o preparo do material examinado preliminar à separação cromatográfica. O material é seco ou liofilizado e homogeneizado antes de se prosseguir com a extração. Esta última etapa é feita em geral por uma mistura de solventes seguida de purificação por filtração ou centrifugação e enfim chegar à etapa de separação e detecção (Romanik et al., 2017).

A adequabilidade de um método analítico para a análise de produtos naturais de origem vegetal depende de alguns fatores fundamentais, como eficiência de separação, seletividade e sensibilidade. Além da alta complexidade das matrizes, compostos relevantes podem estar presentes em concentrações mínimas e ainda acompanhados de muitas outras substâncias de estrutura similar (Ganzera & Sturm, 2018; Steinmann & Ganzera, 2011). Devido à sua versatilidade, elevada sensibilidade e especificidade, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada a espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS) é considerada o método ideal para análises fitoquímicas. A espectrometria de massas pode ser usada em análises quantitativas e qualitativas, e o uso de MS/MS oferece alta especificidade, além de fornecer características estruturais dos analitos e possibilitar a detecção de estruturas conhecidas e desconhecidas com uma alta sensibilidade (Ganzera & Sturm, 2018; Stylos et al., 2016).

Embora seja umas das técnicas analíticas mais sensíveis e seletivas, a LC-MS/MS frequentemente sofre com efeito matriz, especialmente quando é utilizada ionização por eletrospray (ESI) para a análise de matrizes complexas. Efeitos matriz são geralmente causados pela alteração da eficiência de ionização dos analitos de interesse na presença de compostos que coeluem durante a separação. Pode ser observado como perda de resposta (supressão de sinal) ou aumento de resposta (aumento de sinal), e ambos podem afetar o desempenho de um método (Gosetti et al., 2010; Zhou et al., 2017).

Algumas estratégias podem ajudar a minimizar ou compensar o efeito matriz observado na análise por LC-MS/MS, como extração seletiva, *clean-up* ou mudanças na composição da fase móvel (Lien et al., 2009). No caso em que os analitos de interesse são compostos majoritários e estão presentes no extrato em concentrações altas, a maneira mais simples de se reduzir o efeito matriz eficientemente é reduzir o volume de injeção e fazer uma

diluição da amostra. Dessa forma, a quantidade de componentes que coeluem com as substâncias alvo é reduzida (Zhou et al., 2017)

A cromatografia líquida semipreparativa é uma técnica rápida e eficiente de separação para o isolamento de compostos de plantas. É comumente acoplada a um detector de ultravioleta (UV) para guiar a coleta das frações baseando-se nos picos do cromatograma obtido (Dong et al., 2010). É um método robusto, versátil e superior aos métodos convencionais, como cromatografia em coluna e em camada delgada, que possibilita a purificação de compostos a partir de misturas complexas (Li et al., 2014).

A caracterização de moléculas isoladas é um processo fundamental na identificação de novos compostos de origem vegetal. A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica de grande importância na identificação e quantificação de metabólitos em células, órgãos, tecidos e extratos vegetais (Halabalaki et al., 2014). Os experimentos de RMN utilizam, mais comumente, os núcleos de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ), além de outros como fósforo 31, nitrogênio 15, flúor 19, cálcio 43 e cádmio 113 para a análise de amostras de diversas origens. É uma técnica não-destrutiva que fornece uma grande riqueza de informações por meio de experimentos bidimensionais que possibilitam a elucidação de moléculas puras e a identificação de metabólitos em estudos de perfil químico de plantas (Kumar, 2015). A espectrometria de massas (MS) também é uma grande aliada na identificação de moléculas por fornecer dados parciais de estrutura molecular a partir da fragmentação de massas. De posse desses dados fornecidos pela MS, a estrutura pode ser confirmada pelos experimentos de RMN (Kind & Fiehn, 2010). Existem bibliotecas espectrais disponíveis para equipamentos de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) de baixa resolução que auxiliam na identificação de moléculas, porém, os espectrômetros com analisadores de massas de alta resolução, como o tempo de voo (TOF), estão se tornando mais populares na pesquisa de plantas medicinais devido à identificação de moléculas com elevada confiança (Zhu et al., 2018; Dong et al., 2015).

### 3.2. Análise qualitativa dos principais alcaloides presentes na ayahuasca

Apesar da grande variedade de tipos de cipó existentes na natureza e utilizadas no preparo da ayahuasca (Langdon, 1986), da dificuldade de identificação correta da *P. viridis* (Kowalczyk, et al., 2015) e o grande interesse despertado por essas plantas e seus alcaloides, existem poucos estudos que fazem uma caracterização química abrangente dessas espécies vegetais. Rivier e Lindgren (1970) detectaram harmina, harmalina, tetrahydroharmina, harmol e 6-metoxitriptamina em amostras de *B. caapi* (Rivier & Lindgren, 1972). Hashimoto e

Kawanishi (1975; 1976) reportaram o isolamento de seis novos derivados de  $\beta$ -carbolinas: amida hármica, acetil norharmina, cetotetrahidronorharmina, N-óxido de harmina, éster metílico do ácido hármico e ácido harmalínico, e Kawanishi et al. (1982) identificaram a presença de dois novos alcaloides pirrolidina: dihidroshihunia e shihunina em amostras de *B. caapi* (Kawanishi et al., 1982).

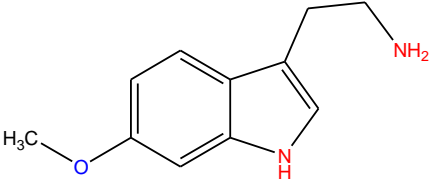
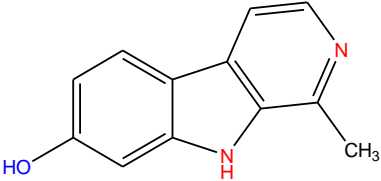
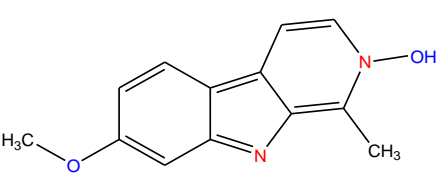
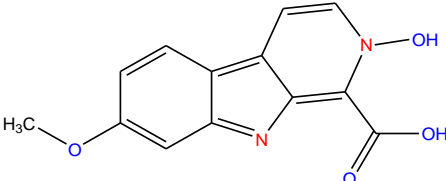
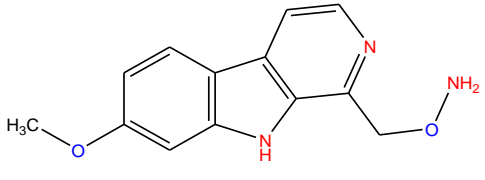
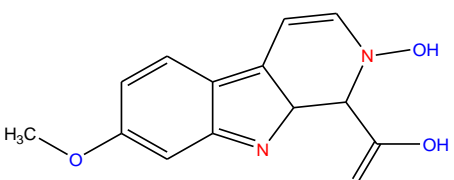
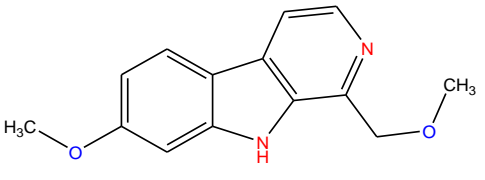
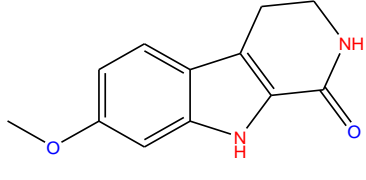
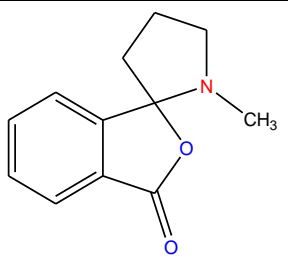
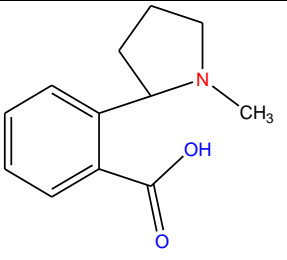
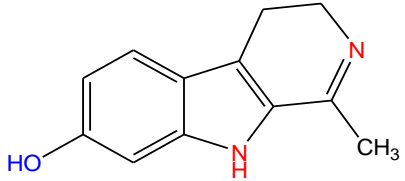
Samoylenko et al. (2010) analisaram extratos aquosos de *B. caapi* e identificaram uma nova tetrahidronorharmina, dois novos glicosídeos alcaloides denominados banistenosideo A e B, duas proantocianidinas conhecidas: epicatequina e procianidina B2, e um novo dissacarídeo. As técnicas de isolamento dos compostos utilizadas foram cromatografia preparativa em coluna e em camada delgada (Samoylenko et al., 2010). As moléculas isoladas até então da espécie *B. caapi* estão mostradas no Quadro 1.

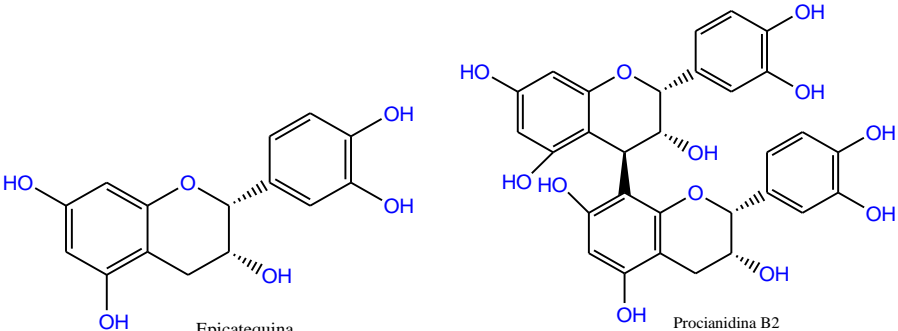
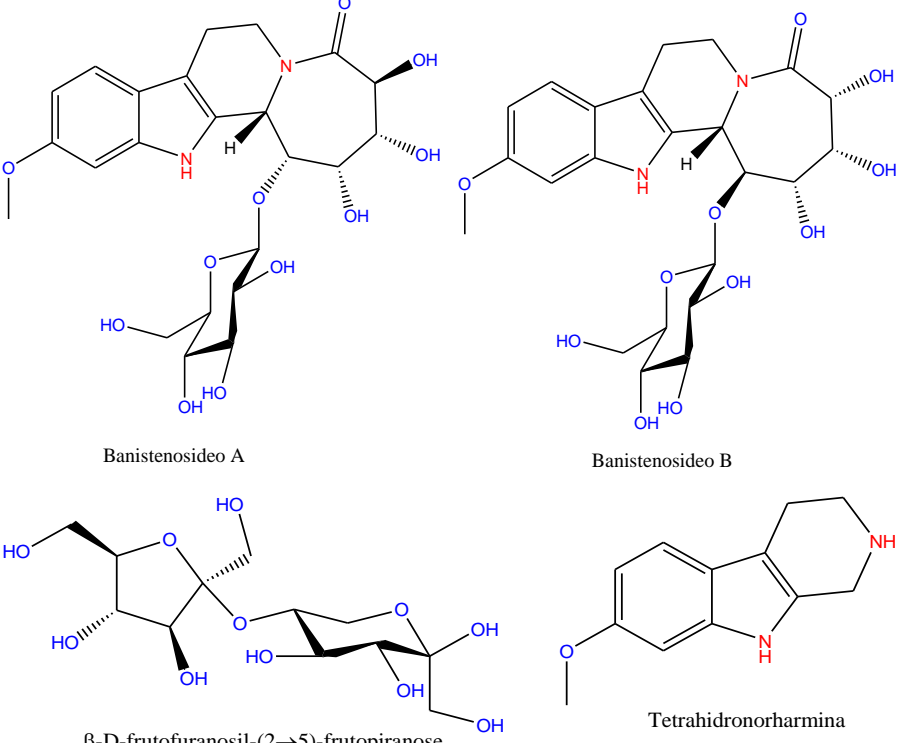
Em um estudo publicado em 2015 (Kowalczyk et al., 2015), os autores analisaram qualitativamente sete amostras de *P. viridis* (originadas do Brasil, Peru e Havaí) adquiridas comercialmente por um website de vendas. Os métodos utilizados foram cromatografia líquida com detecção no ultravioleta (HPLC-UV-VIS) e cromatografia em camada delgada (CCD) após extração sólido-líquido com metanol. Os resultados qualitativos mostraram que três amostras não continham DMT, o que, de acordo com os autores, demonstra as dificuldades encontradas na identificação apropriada das espécies do gênero *Psychotria*.

Uma caracterização química da *P. viridis* feita a partir do isolamento de compostos por cromatografia em coluna e CCD mostrou que, além da presença dos alcaloides indólicos DMT e N-metiltriptamina, essa espécie é rica em substâncias graxas como os ácidos henatriacontanoico e hexadecanoico (Soares, 2015).



**Quadro 1.** Moléculas isoladas e identificadas em extratos de *B. caapi*

Molécula	Referência
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>6-metoxitriptamina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Harmol</p> </div> </div>	<p>Rivier &amp; Lindgren, 1970</p>
<div style="display: grid; grid-template-columns: 1fr 1fr; gap: 10px;"> <div style="text-align: center;">  <p>N-óxido de harmina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Éster metílico do ácido hármico</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Amida hármica</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Éster metílico do ácido harmalínico</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Acetil norharmina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Cetotetrahidronorharmina</p> </div> </div>	<p>Hashimoto e Kawanishi, 1975; 1976</p>
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Shihunina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Dihidroshihunina</p> </div> </div>	<p>Kawanishi et al., 1982</p>
 <p>Harmalol</p>	<p>Mckenna et al, 1984</p>

Molécula	Referência
 <p data-bbox="454 577 558 604">Epicatequina</p> <p data-bbox="933 577 1045 604">Procianidina B2</p>	<p data-bbox="1244 392 1444 481">Samoylenko et al., 2010</p>
 <p data-bbox="359 1097 510 1124">Banistenosideo A</p> <p data-bbox="853 1097 1005 1124">Banistenosideo B</p> <p data-bbox="343 1377 710 1404"><math>\beta</math>-D-frutofuranosil-(2→5)-frutopiranoze</p> <p data-bbox="909 1355 1117 1382">Tetrahidronorharmina</p>	<p data-bbox="1244 974 1444 1064">Samoylenko et al., 2010</p>

### 3.3. Análise quantitativa de alcaloides presentes na ayahuasca

Os primeiros estudos que investigaram as concentrações de  $\beta$ -carbolinas em extratos de *B. caapi* foram realizados entre as décadas de 60 e 80. Schultes et al. (1969) analisaram o material original coletado por Richard Spruce na Amazônia brasileira mais de um século antes, em 1852, utilizando GC-MS e a única  $\beta$ -carbolina detectada foi a harmina em uma concentração de 4 mg/g. Rivier e Lindgren (1972) analisaram sete amostras de *B. caapi* e nove de ayahuasca coletadas no Peru e no Equador por GC-FID e GC-MS e detectaram harmina, harmalina, THH e harmol. McKenna et al. (1984) analisaram cinco amostras de ayahuasca e seis de *B. caapi* por HPLC-UV e GC-MS. Os métodos de preparo de amostras envolveram simples dissolução da ayahuasca em metanol e extração sólido-líquido das amostras de *B. caapi* com metanol.

As análises quantitativas mostram o quão variável pode ser a composição química da bebida, principalmente quando se trata dos compostos mais abundantes: DMT e harmina. A concentração dos alcaloides também é bastante variável nos extratos de *B. caapi* e *P. viridis*, como é evidenciado por Callaway et al. (2005). Os autores quantificaram DMT, harmina, harmalina e THH em 22 amostras de *B. caapi* e *P. viridis* coletadas no mesmo dia e horário em diferentes regiões no Brasil e encontraram acentuadas variações de até duas ordens de grandeza. O método utilizado para extração dos compostos foi extração sólido-líquido em metanol assistida por ultrassom para a *B. caapi*, e extração sólido-líquido em uma solução alcalina para *P. viridis*. Os extratos foram analisados por HPLC-fluorescência em coluna C-8 (Callaway et al., 2005). Os autores analisaram ainda folhas de *P. viridis* de um mesmo arbusto coletadas ao longo de 24h a fim de se avaliar variações circadianas na quantidade de DMT detectada. Os resultados mostram uma variação entre 5 mg/g no início do dia e quase 10 mg/g perto do final do dia, voltando ao nível basal próximo de 5 mg/g no final do período. Em outra publicação, Callaway (2005) analisou 29 amostras de ayahuasca utilizando o mesmo método descrito anteriormente confirmando a grande faixa de variação dos componentes.

Pires et al. (2009) utilizaram cartuchos de C18 para extrair as principais  $\beta$ -carbolinas e o DMT de amostras de ayahuasca: tampão borato, metanol e água para condicionamento do cartucho, acetonitrila e água para a lavagem, e metanol para eluição dos compostos. Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a um detector de nitrogênio-fósforo (GC-NPD). Os autores analisaram 8 amostras de ayahuasca preparadas por um grupo religioso de Araçoiaba da Serra no estado de São Paulo. Utilizando o mesmo método de extração e análise, Castro Neto et al. (2013) e Oliveira et al. (2010) analisaram amostras de ayahuasca originárias de Campo Grande (MS) e Araçoiaba da Serra (SP) (Pires et al., 2009;

Oliveira, et al., 2010; Castro-Neto et al., 2013). Em outra publicação, Gaujac et al. (2013) desenvolveram e validaram um método de preparo de amostras por microextração em fase sólida (SPME) e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas do tipo ion trap (GC-IT-MS) para a detecção e quantificação de DMT em amostras de ayahuasca e vinho da jurema (Gaujac et al., 2013). Gambelunghe et al. (2008) analisaram uma amostra de ayahuasca apreendida em um aeroporto por GC-MS, após extração com éter dietílico. McIlhenny et al. (2009) desenvolveram e validaram um método multicomponente para análise de ayahuasca por LC-MS/MS com ionização por eletrospray, após diluição da bebida em acetonitrila:água (1:9). Lanaro et al. (2015) analisaram por HPLC-DAD nove amostras de ayahuasca preparadas por um grupo religioso e três amostras de um produto em pó apreendidas pela polícia civil de São Paulo após diluição ou extração com metanol. Duas das amostras sólidas continham DMT em concentrações de 820 e 20,1 mg/g enquanto a terceira continha 160 mg/g de harmalina e 120 mg/g de harmina. Em um estudo mais recente, 38 amostras de ayahuasca fornecidas pela UDV foram analisadas por HPLC-MS/MS após diluição em metanol:água 1:1 (Souza et al., 2019).

Silveira et al. (2020) avaliaram a estabilidade do DMT e das três principais  $\beta$ -carbolinas em amostras de ayahuasca armazenadas em frasco de vidro ou plástico, submetidas a altas temperaturas e três ciclos de congelamento e descongelamento. Os resultados mostraram que o DMT se manteve estável em todas as condições testadas, enquanto as  $\beta$ -carbolinas sofreram intensa degradação ou incremento após armazenamento longo e em altas temperaturas.

A Tabela 1 mostra as concentrações dos compostos encontrados nas amostras de *B. caapi*, *P. viridis* e ayahuasca nos diversos estudos citados, bem como os métodos analíticos utilizados.

**Tabela 1.** Concentrações de alcaloides na ayahuasca, em *B. caapi* e *P. viridis* reportados na literatura e métodos de extração e quantificação utilizados. As faixas de concentrações e as médias obtidas são expressas em mg/g para *B. caapi* em mg/mL para ayahuasca.

Referência	Material (n)	Origem	Método	DMT	Harmina	Harmalina	THH
(Rivier & Lindgren, 1972)	Ayahuasca (6)	Peru e Equador	Extração sólido-líquido com metanol; GC-MS	0,05-0,16 (0,12); 32,8	0,07-0,19 (3,11); 234,3	0,003-0,02 (0,01); 104,6	0,01-0,1 (0,05); 65,4
	<i>B. caapi</i> (7)			-	1,0-5,20 (2,32); 67,2	0-0,58 (0,18); 115,5	0,01 a 1,99 (0,76); 106,4
McKenna et al., 1984	Ayahuasca (5)	Peru	Diluição em metanol ou extração sólido-líquido com metanol; HPLC-UV	0,51-0,7 (0,60); 11,1	3,4 a 5,51 (4,54); 20,0	0,3 a 0,51 (0,40); 20,9	1,06 a 1,94 (1,63); 20,6
	<i>B. caapi</i> (6)			-	0,57 a 6,35 (3,92); 64,2	0,5 a 3,8 (1,90); 71,5	0,25 a 3,3 (1,54); 67,2
Callaway et al., 2005	<i>B. caapi</i> (22)	Brasil	Extração sólido-líquido com metanol ou metanol:ACN: acetato de amônio; HPLC-FD	-	0,31-8,43 (4,83); 42,0	0,03-0,83 (0,46); 41,3	0,05-2,94 (1,0); 79,0
Callaway, 2005	Ayahuasca (29)	Brasil (UDV, Barquinha, Santo Daime e Shuar)	Diluição em fase móvel (10x); HPLC-FD	<0,01-14,15 (2,09); 164	0,45 – 22,85 (4,95); 128	<0,01-0,9 (0,23); 117	0,48-23,8 (4,71); 127
Gambelunghe et al., 2008	Ayahuasca (1)	Brasil (Santo Daime)	Extração líquido-líquido com éter dietílico; GC-MS	0,24	0,34	0,06	-
Pires et al., 2009	Ayahuasca (8)	Brasil	Extração em fase sólida (C <sub>18</sub> ); GC-NPD	0,31-0,73 (0,53); 23,8	0,37-0,83 (0,54); 27,2	0,64-1,72 (1,01); 37,2	0,21-0,67 (0,36); 39,2

Referência	Material (n)	Origem	Método	DMT	Harmina	Harmalina	THH
Oliveira et al., 2010	Ayahuasca (1)	Brasil	Extração em fase sólida (C <sub>18</sub> ); GC-NPD	0,42	1,37	0,62	0,35
Wang et al., 2010	<i>B. caapi</i> (4)	EUA – Havai	Maceração em água; HPLC-DAD		0,43-3,50 (1,89); 69,7	0,32-0,46 (0,32); 43,3	1,03-2,07 (1,54); 27,7
Gaujac et al., 2013	Ayahuasca (7)	Brasil	Microextração em fase sólida (PDMS/PDV 65 µm) por headspace; GC-MS	0,17-1,14 (0,558); 56,7	-	-	-
Castro-Neto et al., 2013	Ayahuasca (1)	Brasil (UDV)	Extração em fase sólida (C <sub>18</sub> ); GC-NPD	0,59	5,09	0,19	0,99
Lanaro et al., 2015	Ayahuasca (9)	Brasil (CDI)	Dil. MeOH/water; HPLC-DAD	0,402-2,07 (0,823); 61,0	0,295-2,894 (0,928); 79,7	0,028-0,181 (0,121); 37,4	0,850-2,053 (1,54); 24,9
Souza et al., 2019	Ayahuasca (38)	Brasil (UDV)	Dil. MeOH/water; LC-MS/MS	0,062-0,340 (0,146); 50,6	0,415-1,816 (1,02); 33,8	0,044-0,392 (0,09); 62,9	0,403-3,309 (0,947); 49,8
Kaasik et al., 2021	Ayahuasca (99)	Brasil, EUA e Europa.	Dil. MeOH/water; LC-MS/MS	0,088-2,687 (0,764)	0,141-4,44 (1,318)	0,004-0,387 (0,085)	0,032-3,875 (0,995)

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência; UV: Ultravioleta; GC: cromatografia gasosa; MS: espectrometria de massas; NPD: detector de nitrogênio-fósforo; FD: detector de fluorescência; UDV: união do vegetal; PDMS/PDV: polimetilsiloxano/divinilbenzeno; ESI: eletrospray; CDI: Centro de Desenvolvimento Integral Luz do Vegetal

#### 4. Toxicidade da ayahuasca

A globalização da ayahuasca pode levar ao seu uso indiscriminado, com outros fins e fora do ambiente ritualístico, onde o consumo da ayahuasca é seguro em doses usuais (Santos, 2013). A dose considerada usual é em média 150 mL e baseia-se na quantidade ingerida nos rituais tradicionais (Riba, 2003; Gable, 2007; Motta et al., 2018). Gable (2007) calculou a dose letal aguda de ayahuasca como sendo 20x a dose usual, e de acordo com o autor, estimativas anteriores da dose letal mediana de DMT foram tão altas como 40 ou 50 vezes a dose usual. Pic-Taylor et al. (2015) avaliaram a toxicidade aguda da ayahuasca em ratos Wistar fêmeas com doses 30x e 50x a dose usual para humanos e observaram que a dose letal foi maior do que 50x. O estudo evidenciou ainda que, embora tenha sido observada certa neurodegeneração nas ratas, nenhum dano permanente foi detectado (Pic-Taylor et al., 2015). Ao submeterem-se ratos Wistar a doses únicas de 1 e 5x a dose usual de ayahuasca, não houve genotoxicidade pelo teste do micronúcleo e citotoxicidade também não foi observada, com ausência ainda de alterações hematológicas ou bioquímicas que poderiam afetar funções fisiológicas dos animais (Melo Junior et al., 2016).

Em outro estudo conduzido pelo nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Toxicologia da Universidade de Brasília, o nível sem efeitos adversos observáveis (NOAEL) foi estabelecido para ratos machos tratados a cada dois dias por 70 dias como sendo 2x a dose usual (0,62 mg/kg de peso de DMT, 6,6 mg/kg de harmina, e 0,52 mg/kg de harmalina) (Santos et al., 2017). Esse estudo investigou os efeitos reprodutivos da ayahuasca em ratos Wistar adultos e foi observado um potencial efeito de toxicidade reprodutiva na dose de 4x, além de uma redução no consumo de ração e no ganho de peso nas doses de 4x e 8x.

Motta et al. (2018) avaliaram a toxicidade materna da ayahuasca e observaram que seu consumo diário foi letal para ratas prenhes em doses iguais ou maiores que 4x a dose usual. Em doses não letais, a ayahuasca causou um aumento da embriofetividade e na incidência de anomalias fetais. O NOAEL para toxicidade materna foi estabelecido como 1x a dose usual, correspondendo a 343 mg/kg de peso corpóreo por dia de ayahuasca, relacionado aos efeitos neurotóxicos vistos na dose de 2x (Motta et al., 2018). Um estudo anterior também demonstrou que a exposição a ayahuasca pode causar

toxicidade materna e efeitos teratogênicos dose-dependentes em ratos Wistar (Oliveira et al., 2010). Entretanto, no estudo de Oliveira et al. (2010), não foram observadas mortes dos animais testados nem embriofetividade. Essa diferença nos achados não está totalmente clara, mas pode estar relacionada à composição da ayahuasca utilizada em cada estudo, uma vez que as preparações são de diferentes origens e a concentração reportada dos alcaloides majoritários é distinta (Motta et al., 2018).

O uso da ayahuasca na infância e na adolescência promoveu ansiedade e prejuízo da memória em camundongos, embora essas mudanças comportamentais não tenham sido duradouras (Correa-Netto et al., 2017). Um estudo de neurotoxicidade mostrou que ratos Wistar tratados com metade da dose usual de ayahuasca por três semanas apresentaram aumento significativo nos níveis de ureia urinária, o que pode ser indicativo de dano renal (Figueroa, 2012).

Gable (2007) afirma que nenhum perigo agudo à saúde pelo uso da ayahuasca foi documentado, porém o uso excessivo pode levar a potenciais reações serotoninérgicas que são caracterizadas pela euforia, náusea e confusão seguido por tremores, vômito, convulsões e perda de consciência (Gable, 2007; Sternbach, 1991). Callaway & Grob (1998) reportam um caso de síndrome serotoninérgica de um indivíduo que participou de uma cerimônia e ingeriu ayahuasca estando por vários meses sob tratamento de depressão com fluoxetina, um inibidor seletivo de recaptção de serotonina (Callaway & Grob, 1998).

## **5. Efeitos terapêuticos da ayahuasca e seus componentes**

### *5.1 Estudos em humanos*

Vários estudos têm investigado o potencial terapêutico da ayahuasca e seus componentes. Bogenschutz e Johnson (2016) defendem a tese do uso de alucinógenos no tratamento de dependência química e afirmam que as evidências disponíveis até então sugerem que os alucinógenos são promissores para esse fim. Embora a ayahuasca não tenha sido submetida a testes clínicos mais elaborados, ela tem sido usada fora da pesquisa clínica no tratamento da dependência química. Atualmente está sendo utilizada em centros de tratamento em contextos shamânicos e não-shamânicos, inclusive para o tratamento de transtorno pós-traumático (Bogenschutz & Johnson, 2015).



Fábregas et al. (2010) encontraram menor consumo de álcool entre 56 membros da UDV e Santo Daime quando comparados com não-membros, além da ausência de uso de outras drogas como barbitúricos, sedativos, cocaína e anfetaminas. Um estudo observacional avaliou fatores comportamentais e psicológicos relacionados a uso problemático de drogas de 12 participantes de um retiro com administração de ayahuasca (Thomas et al., 2013). Melhoras estatisticamente significativas foram demonstradas em várias escalas psicométricas avaliadas, além de redução no uso de álcool, tabaco e cocaína. Um estudo transversal recente avaliou o padrão de uso de drogas por meio de questionários aplicados a uma amostra populacional de 1.974 membros da União do Vegetal. Os resultados evidenciaram que os níveis de dependência ao álcool e tabaco foram menores nos usuários de ayahuasca em comparação com a população geral, mesmo quando o uso prévio de drogas era maior entre o grupo antes de se tornarem membros da UDV. Além disso, os autores conseguiram determinar a relação causal entre o comparecimento nas sessões com consumo de ayahuasca e os resultados observados (Barbosa et al., 2018). É importante apontar a existência de um viés nesses estudos, uma vez que os efeitos positivos observados também poderiam estar relacionados à participação dos indivíduos ao sistema de apoio social que as religiões oferecem. Esse fator impossibilita a separação entre os efeitos advindos da prática religiosa e os efeitos farmacológicos da ayahuasca.

Palhano-Fontes et al. (2018) avaliaram os efeitos antidepressivos da ayahuasca por meio de um ensaio duplo-cego randomizado controlado, onde 29 pacientes com depressão resistente a tratamento receberam uma dose de ayahuasca ou placebo. Os resultados mostraram efeitos antidepressivos significativos nos pacientes tratados com a preparação quando comparados com os pacientes que receberam placebo. Outro estudo demonstrou que a ayahuasca tem propriedade moduladora do cortisol em pacientes depressivos ou saudáveis. O cortisol parece estar envolvido na etiologia da depressão e sua regulação é importante no tratamento e remissão da doença (Galvão et al., 2018). Além disso, o tratamento com ayahuasca reduziu a os níveis de proteína C reativa em pacientes depressivos, um biomarcador da inflamação relacionado à liberação de interleucina-6 (Galvão-Coelho et al., 2020). O potencial efeito antidepressivo também foi demonstrado em um ensaio aberto com pacientes com transtorno depressivo maior levando a efeitos antidepressivos bastante significativos (Osório et al., 2015).

Frecska et al (2016), em uma revisão sobre o potencial terapêutico da ayahuasca, concluíram que os efeitos observados são melhor entendidos a partir de um

modelo bio-psico-socio-espiritual e que, do ponto de vista biológico, suas extensas indicações terapêuticas devem-se à sua ação sobre a inflamação crônica de baixo grau e sobre o estresse oxidativo via receptor sigma-1, um receptor transmembrana com propriedades neuroprotetora, neurotrófica e imunomoduladora (Frecka et al., 2016). Inserra (2018) hipotetiza que a ayahuasca pode curar memórias traumáticas no transtorno de estresse pós-traumático através de processos também mediados via receptor sigma-1 e relacionados a sua interação com mecanismos epigenéticos (Inserra, 2018).

Por ser rica em alcaloides comprovadamente inibidores da MAO, a *B. caapi* é um promissor aliado ao tratamento do Parkinson, disfunção que está relacionada à enzima. O uso de extrato de *B. caapi* no tratamento da doença de Parkinson foi avaliado em um estudo duplo-cego randomizado controlado por placebo em pacientes recém-diagnosticados portadores da doença (Serrano-Dueñas et al., 2001). Foi observado que uma única dose do extrato resultou em uma melhora significativa na função motora dos pacientes, e os autores associaram os efeitos benéficos com a ação antagonista das  $\beta$ -carbolinas no receptor de glutamato, além de seus efeitos inibitórios sobre a MAO.

## 5.2 Estudos em modelo animal

Oliveira-Lima et al. (2015) avaliaram os potenciais efeitos da ayahuasca no tratamento de alcoolismo em camundongos utilizando um modelo de sensibilização comportamental baseado nos níveis de dopamina causados pelo consumo de álcool. Além de inibir comportamentos iniciais associados à dependência química, a ayahuasca reverteu a expressão do efeito da droga a longo prazo, inibindo a reintegração da sensibilização comportamental ao álcool. Entretanto, em um estudo mais recente conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, a ayahuasca não foi capaz de diminuir o consumo de álcool por ratos consumidores, mesmo resultado observado para a naltrexona, um fármaco utilizado na dependência de álcool (Nolli et al., 2020). Essa diferença encontrada entre esses dois estudos nos resultados obtidos pode estar relacionada à composição das preparações de ayahuasca utilizadas. Além disso, o primeiro estudo avaliou os efeitos do chá em camundongos, enquanto o segundo realizou essa pesquisa em ratos.

Um estudo realizado com ratas mostrou que a ayahuasca tem um potencial antidepressivo após exposição única, demonstrado pelo comportamento no teste de natação forçada (Pic Taylor et al., 2015).

Schwarz et al. (2003) demonstraram que o extrato de *B. caapi* levou a um aumento na liberação de dopamina de células nervosas em ratos, efeitos que, associados à ação já comprovada sobre outros alvos, seriam benéficos no alívio dos sintomas da doença de Parkinson. O extrato apresentou atividade muito maior do que a dose equivalente de harmina isolada, o que indica sinergismo com outros compostos, ou ainda a presença de um composto mais ativo ainda não isolado (Schwarz et al., 2003).

Além do uso da ayahuasca como potencial tratamento para algumas disfunções, existem várias pesquisas utilizando princípios isolados contidos na infusão para investigar seus mecanismos de ação, em especial a harmina, a  $\beta$ -carbolina mais abundante na ayahuasca (Wang et al., 2010).

Estudos mostram que a administração aguda ou crônica de harmina em ratos, além de exercer efeitos antidepressivos, causa um aumento nos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo, uma proteína que exerce um papel crítico na sobrevivência, manutenção e crescimento do cérebro e dos neurônios periféricos, além de atuar no estabelecimento de novas conexões neuronais (Fortunato et al., 2009, 2010). Colaço et al (2020) também observaram um aumento nos níveis de BDNF no hipocampo e de serotonina no cérebro de ratas após administração de uma dose de ayahuasca equivalente a duas vezes a dose ritualística diariamente por 28 dias.

A harmina e seu principal metabólito em humanos, harmol, inibem a enzima CYP1A1, responsável por metabolizar compostos pró-carcinogênicos para sua forma ativa carcinogênica (Gendy et al., 2012). A harmina efetivamente aumentou a atividade do transportador de glutamato em ratos, o que resultou em uma maior captação de glutamato evitando sua presença de maneira excessiva na região extracelular, condição associada a transtornos neurológicos (Li et al., 2011). Em um estudo com ratos portadores de lesão cerebral traumática, o tratamento com harmina reduziu de maneira significativa o edema cerebral e melhorou o aprendizado e memória. Além disso, aumentou a expressão do receptor de glutamato e reduziu os níveis de interleucina-1 $\beta$  e fator de necrose tumoral  $\alpha$  resultando em uma diminuição na apoptose neuronal no hipocampo e evidenciando os efeitos neuroprotetores da harmina (Zhong et al., 2015). O tratamento com a harmina resultou em discretos efeitos anti-Parkinson em um estudo que utilizou um modelo animal com saguis (Fisher et al., 2018). A harmina é ainda um inibidor da inflamação através da supressão do fator de transcrição pró-inflamatório NF- $\kappa$ B em ratos, o que torna a ayahuasca uma potencial ferramenta no tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias (Liu et al., 2017).

### 5.3. Ensaio *in vitro*

Os bioensaios *in vitro* são importantes ferramentas na avaliação e triagem de extratos vegetais. Essas técnicas simples e eficientes podem ser usadas na detecção de efeitos biológicos benéficos, como atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticolinesterase; e efeitos adversos, como citotoxicidade e genotoxicidade de preparações naturais, bem como de seus ingredientes ativos (Prinsloo et al., 2017).

A atividade biológica da ayahuasca e de seus componentes tem sido avaliada também por meio de ensaios *in vitro*. McKenna et al. (1984) avaliaram a atividade da ayahuasca e de várias  $\beta$ -carbolinas, isoladas ou associadas entre si, na inibição da MAO de fígados de ratos. Os resultados obtidos mostraram que a ayahuasca é um potente inibidor da MAO e que o efeito da combinação das substâncias nela contidas ocorre por adição, e não sinergismo. Schwarz et al. (2003) avaliaram a atividade do extrato de *B. caapi* e da harmina sobre as duas isoformas da MAO (A e B) também utilizando fígado de ratos. Os resultados mostram que tanto o extrato de *B. caapi* como a harmina são inibidores seletivos da MAO-A. Os autores também observaram que o extrato, a harmina e a harmalina aumentam a liberação de dopamina no tecido estriatal dos ratos. Drucker et al. (1990) avaliaram a capacidade inibitória de 30  $\beta$ -carbolinas e suas derivadas na captação de dopamina em tecido estriatal de ratos e observaram que harmalina e harmina foram as mais potentes inibidoras dentre os compostos testados.

Samoylenko et al. (2010) avaliaram a cinética de inibição da MAO utilizando MAO-A e MAO-B humanas recombinantes. Os autores avaliaram o extrato de *B. caapi* e nove compostos isolados do extrato, obtendo resultados similares a estudos anteriores com potente inibição da MAO-A e fraca inibição da MAO-B. Os efeitos antioxidantes dos compostos e do extrato também foram avaliados através do ensaio de geração de espécies reativas de oxigênio em células mielomonocíticas HL-60. O extrato mostrou forte atividade antioxidante, sendo epicatequina e procianidina B2 as espécies com atividade antioxidante mais potente, inclusive mais potente do que a vitamina C, usada como controle positivo.

Göckler et al. (2009) mostraram que a harmina tem efeito inibitório em culturas de neurônios sobre a proteína quinase DYRK1A, enzima que tem função no desenvolvimento neuronal e está envolvida na patologia de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, demência e Parkinson. Outro estudo mostra que não só a harmina, mas as  $\beta$ -carbolinas em geral inibem a atividade da DYRK1A e ainda reduzem os níveis de

formas fosforiladas da proteína tau, fatores que são importantes na progressão patológica da doença de Alzheimer (Frost et al., 2011)

Wang et al. (2010) concluíram que o extrato padronizado de *B. caapi* pode ser de grande valor no tratamento de doenças neurodegenerativas devido aos efeitos combinados de proantocianidinas e  $\beta$ -carbolicinas presentes na planta. Os experimentos *in vitro* mostraram que os extratos têm atividade antioxidante e inibitória da enzima MAO-A, sendo harmina e harmalina os compostos com maior poder de inibição (Samoylenko et al., 2010; Wang et al., 2010). As proantocianidinas, além de ter atividade antioxidante, também atuam como inibidoras da MAO-B (Hou et al., 2005) e apresentam efeitos anti-neurodegenerativos (Cho et al., 2008).

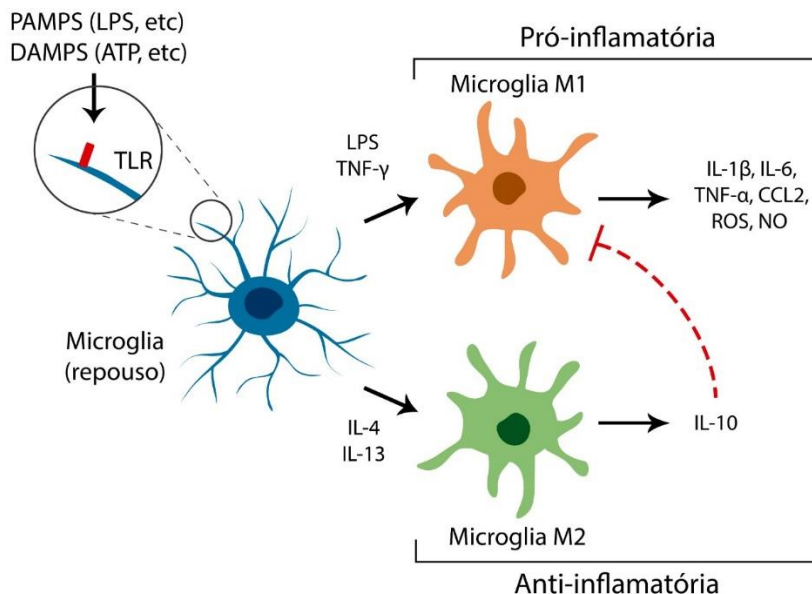
As  $\beta$ -carbolicinas também têm a capacidade de estimular a atividade de células tronco neurais adultas, obtidas de cérebros de camundongos, tratadas com harmina, tetrahydroharmina, harmalina e harmol (Morales-García et al., 2017). Os compostos estimularam a proliferação e migração de células progenitoras e promoveram sua diferenciação em neurônios.

## **6. Micróglia e inflamação**

A grande maioria dos estudos que avaliam a atividade terapêutica da ayahuasca e de seus componentes tem mostrado o seu grande potencial para tratar doenças do sistema nervoso central (SNC). Uma das populações de células presente no SNC são células imunes específicas do sistema nervoso conhecidas como micróglia, que funcionam como macrófagos tecido-residentes (Galloway et al., 2019). Elas estão presentes em todas as regiões do cérebro e medula espinhal, representando 12-15 % do total de células encontradas no SNC (Block & Hong, 2005; Carson et al., 2006). A micróglia é responsável por vários processos reguladores cruciais para o desenvolvimento tecidual e manutenção da homeostase. Elas funcionam respondendo a danos, promovendo reparo, desencadeando uma resposta imune a patógenos e ativamente desempenhando a fagocitose de detritos (Jolivel et al., 2021; Orihuela et al., 2016).

A micróglia em repouso executa uma espécie de supervisão imunológica e apresenta uma morfologia ramificada que muda rapidamente, em consequência de algum dano ou estímulo imunológico, para um formato ameboide (Figura 3) (Block & Hong, 2005). Células microgliais são peças-chave na patogênese neural e são encontradas em sua forma ativada em diversas condições em que produzem substâncias citotóxicas

inflamatórias como citocinas, quimiocinas, superóxido e óxido nítrico. Essas condições são comuns em muitas doenças inflamatórias crônicas neurodegenerativas, incluindo Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington (Messeha et al., 2019).



**Figura 3.** Esquema de “interruptor” fenotípico exibido pela micróglia (Braga et al. 2019)

A micróglia ativada é tradicionalmente categorizada em dois grupos, que são baseados no fenótipo exibido: fenótipo M1, de ativação clássica e fenótipo M2, de ativação alternativa. Esse “interruptor” fenotípico depende da natureza da causa da ativação (Figura 3). O fenótipo M1 é caracterizado por uma atividade pró-inflamatória devido à produção de mediadores como interleucina (IL)-6, IL-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ). A micróglia M2 é considerada anti-inflamatória com base na secreção de fatores anti-inflamatórios incluindo IL-4, IL-13, IL-10 e fator de crescimento transformador (TGF- $\beta$ ). Além disso, o fenótipo M2 contribui para a recuperação pós dano e suprime a resposta pró-inflamatória (He et al., 2020a; Rahimian et al., 2021). Alguns estudos demonstram que a fagocitose de bactérias pela micróglia é associada à liberação de fatores anti-inflamatórios (Smith et al., 2012).

De maneira geral, a micróglia residente é polarizada em direção ao fenótipo M1 devido à exposição de citocinas pró-inflamatórias circulantes e detritos celulares ou bacterianos pós dano ou infecção. Esse processo leva a uma produção adicional de citocinas pró-inflamatórias que resulta em níveis aumentados estimulando a micróglia,

que por sua vez secreta citocinas através de um mecanismo de feedback (Orihuela et al., 2016; Zhai et al., 2020). A ativação crônica da micróglia e a produção excessiva de moléculas neuroinflamatórias como citocinas são situações comuns em doenças neurodegenerativas e podem ser responsáveis pela progressão neuropatológica de transtornos (Van Eldik et al., 2007).

A micróglia derivada de modelos animais ou em culturas primárias tem sido usada em muitos estudos. Devido à sua capacidade de proliferação limitada, as células devem ser isoladas imediatamente antes da realização do experimento, o que envolve procedimentos técnicos difíceis e que consomem bastante tempo. Além disso, o número de animais necessários para um único experimento pode ser muito alto, entre 15 e 30, o que representa um enorme impacto no consumo de recursos de uma pesquisa (Henn et al., 2009). Com o objetivo de encontrar uma alternativa adequada para o uso de micróglia primária na pesquisa, Blasi et al. (1990) desenvolveram uma linhagem celular derivada de murinos que exibe propriedades morfológicas, fenotípicas e funcionais de células microgliais ativas, as células BV-2. Para desenvolver essa linhagem, os pesquisadores infectaram células microgliais primárias de culturas celulares de cérebro de camundongos C57BL/6 com o retrovírus J2, carreador do oncogene raf/v-myc, o que resultou na imortalização de células microgliais ativas. Células BV-2 são as mais frequentemente utilizadas como substitutas de micróglia primária e têm sido usadas em pesquisas farmacológicas, estudos de fagocitose e muitas importantes descobertas imunológicas (Henn et al., 2009)

### *6.1. Citocinas*

Citocinas são moléculas de baixo peso molecular secretadas por diferentes tipos de células que regulam inúmeros processos fisiológicos como crescimento celular e ativação, inflamação, imunidade e reparo tecidual (Packard & Khan, 2003). Esses mediadores são tipicamente classificados como pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios com base em sua atividade (Smith et al., 2012). Citocinas pró-inflamatórias são produzidas principalmente por macrófagos ativados e estão envolvidas na suprarregulação de reações inflamatórias. Alguns exemplos dessas moléculas são IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$ . Citocinas anti-inflamatórias atuam como imunorreguladores que controlam a resposta pró-inflamatória. Algumas das principais citocinas anti-

inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-11, e IL-13. Citocinas como IFN- $\alpha$  e TGF- $\beta$  podem atuar tanto como anti-inflamatórias quanto como pró-inflamatórias (Zhang & An, 2007).

A interleucina-10 é uma importante citocina com potentes propriedades anti-inflamatórias que atua de maneira central, limitando a resposta imune a patógenos e por conseguinte prevenindo danos ao hospedeiro (Iyer & Cheng, 2012). É um importante mediador que inibe a produção de fatores pró-inflamatórios pela micróglia e outras glias em culturas *in vitro* (Shemer et al., 2020). Essa citocina inibe a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 por macrófagos ativados e ainda suprarregula anti-citocinas endógenas e infrarregula receptores de citocinas pro-inflamatórias (Zhang & An, 2007).

Interleucina-4 é uma citocina que também apresenta atividade anti-inflamatória através da inibição da produção de TNF- $\alpha$ , IL-1, e IL-6 por macrófagos e aumentando a secreção de moléculas que neutralizam essas citocinas pró-inflamatórias. Essa molécula é capaz de induzir a ativação alternativa M2 da micróglia, o que resulta em um efeito neuroprotetor via redução de TNF e elevação de IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) (Fenn et al., 2012; Gadani, Sachin P; Cronk, 2013; He et al., 2020a).

Interleucina-6 é capaz de mediar tanto respostas pró-inflamatórias como anti-inflamatórias, o que tem sido associado à presença de seu receptor (IL-6R) na forma solúvel e também ligado à membrana. Neurônios e micróglia expressam essa citocina, bem como seu receptor (Szot et al., 2017). IL-6 exerce papel central na reação neuronal a dano ao nervo e está envolvida em ativação microglial e astrocítica, além de regular a expressão de neuropeptídeos (Zhang & An, 2007).

A citocina IL-2 regula a resposta celular do tipo Th1 (linfócito T auxiliar do tipo 1) do sistema imune através da proliferação de células T ativadas. Além de sua importante função imune periférica, tem se mostrado um poderoso fator neuromodulador. A comunicação sistema imune-SNC da IL-2 ainda não foi totalmente elucidada, mas sugere-se que a micróglia seja fonte e alvo de IL-2. Essa citocina influencia a liberação de dopamina, afeta a secreção de serotonina e acetilcolina no hipocampo e parece estar envolvida na esquizofrenia e na depressão (Schneider et al., 2012).

A interleucina-17A é um importante membro da família de citocinas pró-inflamatórias IL-17 que são produzidas por linfócitos Th-17 e por células da imunidade inata. É altamente produzida e regulada em pacientes com doenças crônicas de origem inflamatória (Iwakura et al., 2011). Essa citocina pode ser produzida pela micróglia em resposta a IL-23 e IL1 $\beta$  e estimula a produção de quimiocinas e outras citocinas pró-

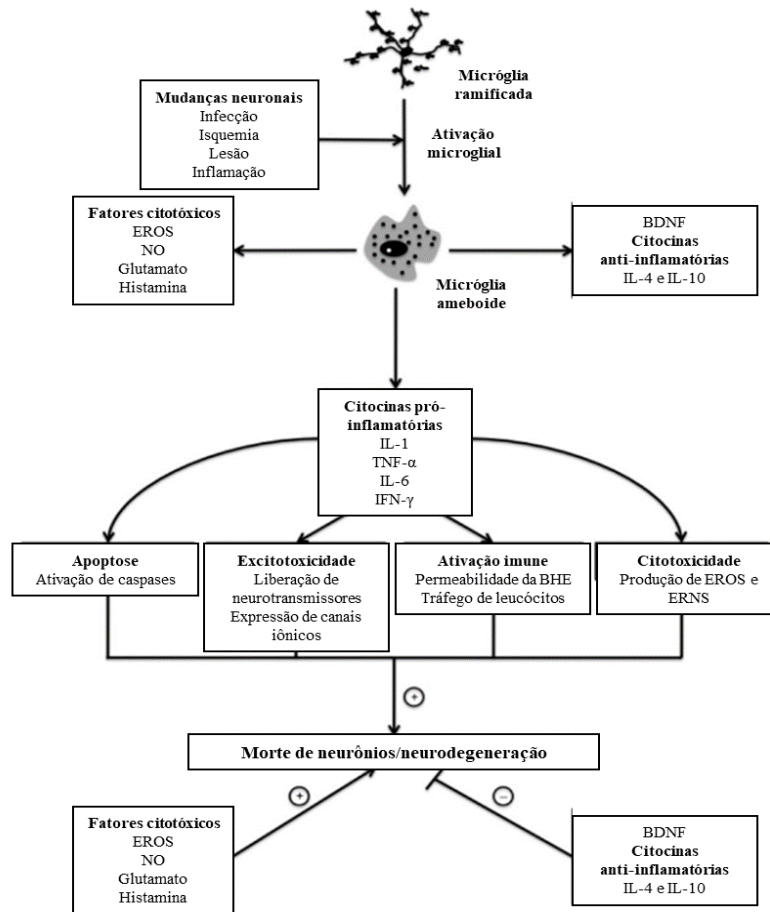


inflamatórias como IL-6 por células epiteliais, endoteliais e fibroblastos e (Kawanokuchi et al., 2008).

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma clássica citocina pró-inflamatória. É essencial na defesa do hospedeiro e em respostas inflamatórias, mas também pode induzir morte celular e degeneração tecidual em certas condições. Esse fator exibe efeitos pleiotrópicos que frequentemente ocasionam consequências opostas durante o desenvolvimento de doenças imuno-mediadas, especialmente aquelas envolvidas no SNC. Estímulos inflamatórios induzem a produção de TNF pela micróglia, que é uma fonte rica de TNF (Probert, 2015).

O interferon-gama é outra citocina pró-inflamatória clássica que é secretada por linfócitos Th1 ativados e células natural killer. É crucial para a imunidade celular inata contra bactérias, protozoários, vírus e fungos. IFN- $\gamma$  secretado ativa múltiplas moléculas envolvidas em rotas de sinalização na micróglia afetando suas atividades downstream (He et al., 2020b; Zhang et al., 2020). Esse fator ativa a função da micróglia de célula efetora na desmielinização inflamatória e degeneração neuronal. Ele aumenta a produção de TNF- $\alpha$ , óxido nítrico e superóxido pela micróglia e astrócitos. A micróglia ativada por IFN- $\gamma$  pode matar neurônios através da secreção desses produtos solúveis, o que faz do IFN- $\gamma$  uma citocina chave envolvida na indução de várias patologias do SNC (Kawanokuchi et al., 2006).

A Figura 4 ilustra os mecanismos de ativação da micróglia e sua consequente produção de fatores inflamatórios e anti-inflamatórios.



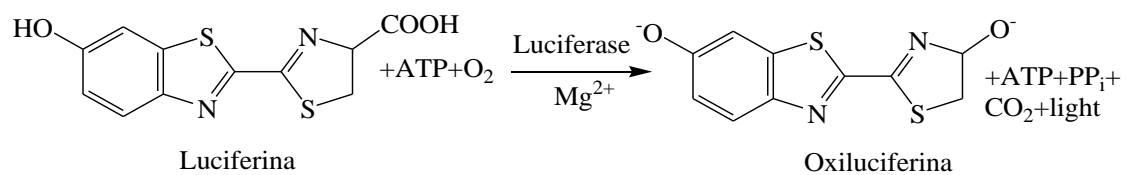
**Figura 4.** Mecanismos comuns de ativação da micróglia e produção de fatores envolvidos em doenças neurodegenerativas (adaptado de Smith et al., 2012)

## 7. Ensaios de atividade biológica em culturas de células

### 7.1. Viabilidade celular

Ao se trabalhar com culturas de células a fim de se avaliar os efeitos de um tratamento químico, físico ou biológico, é crucial se avaliar a viabilidade celular. O ensaio de viabilidade celular é feito levando-se em conta a razão entre células vivas e células mortas e, para tal, vários indicadores podem ser avaliados. Os ensaios de permeabilidade estimam a integridade da membrana e incluem testes de exclusão de corantes como *trypan blue* e liberação de lactato desidrogenase. Análises morfológicas avaliam mudanças em estruturas celulares; ensaios de reprodução calculam a capacidade de divisão celular; e ensaios funcionais avaliam função como capacidade energética celular (níveis de ADP, AMP e ATP) (Cook & Mitchell, 1989; Niles et al., 2007)

O nível de ATP intracelular tem sido utilizado como ferramenta de avaliação da integridade funcional de células vivas, uma vez que seu papel na respiração celular é crucial. Quando o processo de morte celular é iniciado, a membrana celular perde a integridade e a habilidade de sintetizar ATP, o que, somado à atividade de ATPases, resulta em uma rápida depleção de ATP do citoplasma (Freeberg et al., 2019). A quantidade de ATP presente é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas na cultura e pode ser medida pela lise direta das células seguida da reação luciferina-luciferase com ATP livre (Crouch et al., 1993). Esse método é bastante sensível e seletivo e é baseado na capacidade da luciferase de cataliticamente transferir a fração adenil do ATP para a luciferina produzindo adenilato de luciferina e pirofosfato. Na presença de O<sub>2</sub>, o adenilato de luciferina é oxidado gerando a oxiluciferina em um estado eletronicamente excitado (Figura 4). O retorno da oxiluciferina ao estado fundamental é seguido de liberação de fótons, que podem ser detectados por um luminômetro em uma faixa de fmol a pmol (Dubyak, 2019).



**Figura 4.** Reação luciferase-luciferina (adaptada de Crouch et al., 1993)

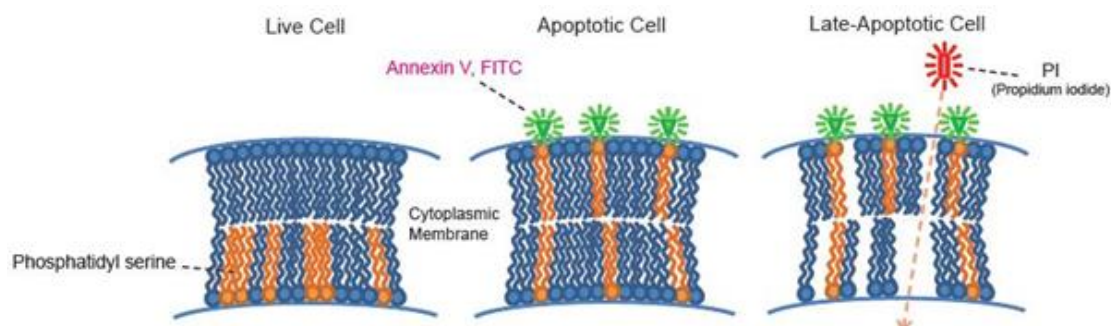
## 7.2 Apoptose e necrose

A morte celular programada é crucial para a manutenção da homeostase tecidual e a patogênese, sendo tão importante quanto divisão e migração celular (Hengartner, 2000; Yaron Fuchs and Hermann Steller, 2016). Os mecanismos de morte celular são induzidos durante o desenvolvimento a fim de se organizar as células quanto a espaço e conteúdo, e durante processos de doença para eliminação de células não saudáveis (Saleem, 2021). Apoptose é uma forma de morte celular altamente regulada que é responsável por ajustar o formato do tecido durante o desenvolvimento e manter a homeostase pela eliminação de células desnecessárias e prejudiciais (Yi & Yuan, 2009). Células que passam por apoptose exibem alguns sinais característicos como encolhimento, condensação de núcleo, integridade de membrana preservada, sendo rapidamente fagocitadas. Por outro lado, células que morrem por dano ou estresse

excessivo geralmente incham e se rompem, o que caracteriza o mecanismo de necrose (Yaron Fuchs and Hermann Steller, 2016).

Como a apoptose é um processo homeostático, sua ausência ou excesso são associados a transtornos. A deficiência na apoptose pode levar a doenças linfoproliferativas, leucemias ou doenças autoimunes, e um excesso pode causar deficiência imune e doenças degenerativas (Vermees et al., 2000). A progressão de transtornos neurodegenerativos, por exemplo, é predominantemente caracterizada por uma grande perda de neurônios e morte de células da glia (Saleem, 2021).

Durante o estágio inicial da apoptose, uma das alterações da membrana plasmática que ocorre na superfície da célula é a translocação da fosfatidilserina da camada interna da membrana para o lado externo, o que ocasiona sua exposição. A anexina V-FITC é uma proteína capaz de se ligar a fosfolipídios com uma alta afinidade pela fosfatidilserina e pode ser usada como uma sonda sensível para exposição desse fosfolipídio. Além disso, durante a apoptose inicial, células ainda são capazes de excluir corantes comumente usados nos ensaios, como o iodeto de propídio. Entretanto, a anexina V-FITC também é capaz de se ligar à camada mais interna da membrana plasmática que tenha perdido a integridade durante o último estágio da apoptose, também conhecido como necrose secundária. Mas células nesse estágio não são capazes de eliminar o iodeto de propídio, dessa forma, células mortas/necróticas são marcadas tanto pela anexina como pelo iodeto de propídio, enquanto células em apoptose inicial são marcadas apenas pela anexina (Figura 5). Utilizando citometria de fluxo, é possível diferenciar células vivas sem marcação de células em apoptose inicial e de células mortas/necróticas com base em uma dupla marcação com anexina e iodeto de propídio (Chen et al., 2008).



**Figura 5.** Esquema de dupla marcação com anexina V FITC e iodeto de propídio (<https://lifebiolab.com/wp-content/uploads/2019/03/Life-biolab-Annexin-V-Kit-FITC-Pi.pdf>)

### 7.3 Estresse oxidativo – espécies reativas de oxigênio

Organismos multicelulares dependem de um complexo sistema de sinalização intra e extracelular com a finalidade de comunicação e execução de processos fisiológicos. A sinalização extracelular geralmente inclui hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento e citocinas que se ligam a receptores celulares desencadeando sinais intracelulares (Thannickal & Fanburg, 2000). Espécies reativas de oxigênio (EROS) são moléculas que têm um importante papel na sinalização em vários sistemas biológicos como indução de morte celular, regulação de expressão genica e ativação de cascatas de sinalização celular (Hancock et al., 2001).

O termo EROS dá nome a um grupo de espécies altamente reativas de oxigênio que se encontram em um estado mais reativo do que o oxigênio molecular. O grupo inclui espécies não radicais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso (HOCl), ozônio ( $O_3$ ) e oxigênio singlete; e radicais livres como superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), óxido nítrico (NO), hidroperóxil ( $HO_2^{\bullet}$ ), peróxil ( $RO_2^{\bullet}$ ) e hidroxil ( $\bullet OH$ ) (Bayir, 2005; Taverne et al., 2018).

O principal atributo que todas as EROS compartilham é ter elétrons desemparelhados na camada de valência ou ligações instáveis. Em altas concentrações, esses agentes prontamente reagem com proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, frequentemente estimulando alterações funcionais irreversíveis ou ainda destruição completa (Brieger et al., 2012). Essa reatividade extremamente alta dos radicais livres explica sua habilidade de danificar células, mas também oferece a eles o poder de atuar como mensageiros em diversos sistemas metabólicos (Taverne et al., 2018). A produção de EROS pode ser estimulada por exposição à luz UV, radiação, quimioterápicos ou agentes infecciosos. Além disso, podem também ser produzidas como um subproduto da respiração metabólica assistida pelas cadeias mitocondriais de transporte de elétrons, NADPH oxidase, citocromo P450 redutase, xantina oxidase e óxido nítrico sintase. A produção e eliminação de EROS são mediadas por moléculas com forte poder redutor e o equilíbrio entre esses dois processos é chamado de estado redox celular. O estresse oxidativo ocorre quando há uma alteração nesse equilíbrio. A detecção de EROS é geralmente usada para se avaliar o mecanismo de ação de drogas e outros compostos (Figuroa et al., 2018).

Existem alguns procedimentos experimentais para quantificar a produção de EROS. Um dos ensaios mais utilizados é baseado na oxidação da 2'-7'

diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF) a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF). A forma diacetato do composto, H<sub>2</sub>DCFDA e seu acetometil ester H<sub>2</sub>DCFDA-AM são permeáveis às células e são hidrolisados por esterases celulares não específicas que removem os grupos lipofílicos, resultando em um composto carregado que fica preso dentro da célula. A oxidação da H<sub>2</sub>DCF pelas EROS converte a molécula em DCF que é altamente fluorescente e pode ser monitorada por citometria de fluxo (Kalyanaraman et al., 2012).

### III. OBJETIVOS

#### Geral

Caracterizar o perfil químico de indivíduos da espécie *Banisteriopsis caapi* utilizados na preparação do chá da ayahuasca e do chá preparado em amostras coletadas de diversas regiões do país e avaliar a atividade biológica do extrato de *B. caapi* e seus componentes em células de micróglia BV-2.

#### Específicos

1. Sintetizar o DMT e a  $\beta$ -carbolina tetrahydroharmina, não disponíveis comercialmente;
2. Coletar amostras da espécie vegetal *B. caapi* cultivadas ou nativas utilizadas no preparo do chá de ayahuasca em diferentes regiões do país;
3. Coletar amostras de chá de ayahuasca preparados em diferentes centros religiosos e xamânicos no país
4. Otimizar e validar um método de análise de DMT e  $\beta$ -carbolinas em extratos de *B. caapi* e ayahuasca por LC-MS/MS
5. Caracterizar quantitativamente a composição química ( $\beta$ -carbolinas) das amostras de *B. caapi*;
6. Caracterizar quantitativamente a composição química ( $\beta$ -carbolinas e DMT) de preparações do chá de ayahuasca feitas em diferentes centros religiosos no país
7. Isolar e realizar uma caracterização inicial de outras moléculas do extrato de *B. caapi*
8. Investigar a atividade biológica do extrato de *B. caapi*, das  $\beta$ -carbolinas e das moléculas isoladas em células da micróglia BV2 (impacto na viabilidade celular, apoptose/necrose, produção de EROS e citocinas).

#### IV. ESTRUTURA DA TESE

Os métodos e resultados do trabalho foram divididos em dois capítulos, redigidos na língua inglesa em formato de artigo científico:

O Capítulo 1, intitulado “Biodiversity of  $\beta$ -carboline profile of *Banisteriopsis caapi* and ayahuasca, a plant and a brew with neuropharmacological potential” foi publicado na revista *Plants*, e contempla os seis primeiros objetivos específicos do trabalho

O Capítulo 2, intitulado “Phytochemical analysis of potentially new components from *B. caapi* extracts and biological activity assays.” contempla os dois últimos objetivos do trabalho.



## 1. Biodiversity of $\beta$ -Carboline Profile of *Banisteriopsis caapi* and Ayahuasca, a Plant and a Brew with Neuropharmacological Potential

Publicado na revista *Plants*, 2020. 9:870 (Anexo 1).

**Abstract:** Ayahuasca is a psychoactive infusion with a large pharmacological application normally prepared with *Banisteriopsis caapi*, which contains the monoamine oxidase inhibitors  $\beta$ -carbolines, and *Psychotria viridis*, which contains the serotonin receptor agonist N,N dimethyltryptamine (DMT). The objectives of this study were to investigate the chemical profile of *B. caapi* and of ayahuasca collected in various Brazilian regions. In total, 176 plant lianas, of which 159 *B. caapi* and 33 ayahuasca samples were analyzed. Dried liana samples were powdered, extracted with methanol, diluted, and analyzed by LC-MS/MS. Ayahuasca samples were diluted and analyzed. Mean concentrations in *B. caapi* were 4.79 mg/g harmine, 0.451 mg/g harmaline, and 2.18 mg/g tetrahydroharmine (THH), with a high variability among the samples (RSD from 78.9 to 170%). Native *B. caapi* samples showed significantly higher harmine concentrations than cultivated ones, and samples from the Federal District/Goiás had higher THH content than those collected in the State of Acre. The other Malpighiaceae samples did not contain  $\beta$ -carbolines, except for one *D. pubipetala* sample. Concentrations in ayahuasca samples ranged from 0.109 to 7.11 mg/mL harmine, 0.012 to 0.945 mg/mL harmaline, 0.09 to 3.05 mg/mL THH, and 0.10 to 3.12 mg/mL DMT. The analysis of paired ayahuasca/*B. caapi* confirmed that harmine is reduced to harmaline and to THH during the brew preparation. This is the largest study conducted with Malpighiaceae samples and showed a large variability in the main  $\beta$ -carbolines present in *B. caapi*. This biodiversity is a challenge for standardization of the material used in ethnopharmacological studies of *B. caapi* and ayahuasca.

**Keywords:**  $\beta$ -carbolines; DMT; *Banisteriopsis caapi*; ayahuasca; Brazil

## 2. Anti-inflammatory potential of *Banisteriopsis caapi* and its components in microglial cells

### Abstract

*Banisteriopsis caapi* is used in the preparation of the psychoactive beverage ayahuasca, and both have therapeutic potential for the treatment of many central nervous system (CNS) conditions. Microglia are the CNS specific immune cells that work as macrophages and are responsible for several regulatory processes. Their activated form, which produces proinflammatory cytokines, is found in many chronic inflammatory neurodegenerative diseases. This study aimed at isolating bioactive compounds from *B. caapi* extract and evaluating their biological activity, as well of the  $\beta$ -carboline components of *B. caapi*, in BV-2 microglial cells. A *B. caapi* sample of “ourinho” type was submitted to semipreparative chromatography (HPLC-DAD) for isolation of potentially new compounds. Isolated samples were analyzed by high resolution LC-MS/MS TOF for exact mass determination: F1 – 174.0918 e 233.1289; F2 – 353.1722; F3 – 304.3001; F4 – 188.1081; F5 – 205.0785. Biological activity of the fractions, *B. caapi* extract and  $\beta$ -carbolines harmine, harmaline and THH was evaluated by cellular viability, apoptosis/necrosis, ROS and cytokines production by BV-2 microglial cells. Most of the treatments resulted in anti-inflammatory effects with the reduction of proinflammatory cytokines production, especially fractions F4 and F5 and the  $\beta$ -carbolines. The results suggest that the compounds that are present in *B. caapi* extract have the potential to treat neurodegenerative diseases, as the excess of proinflammatory microglial activation is involved in the neuropathology of CNS diseases.

**Keywords:** ayahuasca; *Banisteriopsis caapi*; microglia; cytokines.

## 2.1. Introduction

In the past few years, ayahuasca and *Banisteriopsis caapi* therapeutic potential for central nervous system (CNS) adverse conditions have been widely explored due to their chemical composition, mainly the  $\beta$ -carbolines. The effects of the plant extracts and the isolated compounds in a variety of neurological disorders such as depression and posttraumatic stress disorder (Inserra, 2018; Osório et al., 2015; Palhano-Fontes et al., 2017; Pic-Taylor et al., 2015), drug addiction (Cesar et al., 2018; Fábregas et al., 2010; Oliveira-Lima et al., 2015; Thomas et al., 2013; Nolli et al., 2020); Parkinson's disease (Samoylenko et al., 2010; Schwarz et al., 2003; Wang et al., 2010) and Alzheimer's (Göckler et al. 2009; Frost et al., 2011). Furthermore, harmine and/or other  $\beta$ -carbolines found in *B. caapi* have been proven to inhibit DYRK1A (dual specificity tyrosine-phosphorylationregulated kinase 1A) in cultured neurons, an enzyme that is involved in neurodegenerative diseases (Göckler et al. 2009; Frost et al., 2011); increase BDNF levels in the hippocampus of rats (Fortunato et al., 2009, 2010; Colaço et al., 2020) and stimulate adult neurogenesis *in vitro* (Morales-García et al., 2017).

One of the many cell populations present in the brain are the nervous system-specific immune cells known as microglia, which work as tissue-resident macrophages (Galloway et al., 2019). They are present in all regions of the brain and spinal cord, accounting for 12-15% of the total cells found in the CNS (Block & Hong, 2005; Carson et al., 2006). Microglia are responsible for several regulatory processes that are crucial for tissue development and homeostasis, responding to injury and promoting repair, triggering immune responses to pathogens and actively performing debris phagocytosis (Jolivel et al., 2021; Orihuela et al., 2016). Resting microglia execute immune surveillance and display a ramified morphology that changes promptly, upon activation via injury or immunological stimuli, to an ameboid shape (Block & Hong, 2005). Microglial cells are key players in neural pathogenesis and are found in their activated form in several conditions where they produce cytotoxic inflammatory substances such as cytokines, chemokines, superoxide and nitric oxide. These conditions are common in many chronic inflammatory neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis and Huntington's disease and can be responsible for neuropathological progression of disease (Van Eldik et al., 2007; Messeha et al., 2019).

Activated microglia are traditionally categorized into two groups, based on the displayed phenotype: classically activated M1 and alternatively activated M2. This phenotypic switch depends on the nature of what caused the activation. Phenotype M1 is characterized by a proinflammatory activity, due to the production of mediators such as interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). M2 microglia are regarded as anti-inflammatory, based on the secretion of anti-inflammatory factors, including IL-4, IL-13, IL-10 and transforming growth factor (TGF)- $\beta$ . Furthermore, they contribute to recovery after injury and suppress pro-inflammatory response (He et al., 2020a; Rahimian et al., 2021).

Even though the many neuromodulator properties of *B. caapi* and its components have been demonstrated, more studies that elucidate mechanisms in which the effects act are necessary. In this study, the anti-inflammatory activity of *B. caapi*, the known  $\beta$ -carbolines (harmine, harmaline and tetrahydroharmine) and new components were investigated using BV-2 microglial cells.

## 2.2. Materials and methods

### 2.2.1. Chemicals and standards

Analytical standards of harmine (98% purity) and harmaline (95% purity) were obtained from Sigma-Aldrich (San Luis, USA) and tetrahydroharmine (THH; 95% purity) from LGC Standards (Teddington, UK). Methanol, acetonitrile and acetic acid, all HPLC grade, were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), ammonium acetate, analytical grade, was from Neon (Suzano, Brazil) and formic acid was from Sigma-Aldrich (San Luis, USA).

### 2.2.2 Plant extraction and spectrometric analysis

A *Banisteriopsis caapi* sample (type ourinho, containing 6.917 mg/g harmine, 1.583 mg/g harmaline and 3.084 mg/g THH), collected in Goiás, Brazil in 2018, was dried at room temperature for seven days, powdered by a Wiley mill (Macro Star FT-60, Fortinox, São Paulo, Brazil), sieved through a 500  $\mu$ m screen and kept in a plastic bag at room temperature until analysis. Next, 2 g of each sample were sonicated in 40 mL of methanol and macerated for 24 h at room temperature. The extract was filtered in a 0.45  $\mu$ m syringe filter and diluted 5-fold in purified water prior to the chromatographic separation. The separation was carried out in a semi-preparative 150 x 10 mm Gemini 5u C18 110A column (Phenomenex, Torrance, USA) in a HPLC system coupled with a

Shimadzu SPD-M20A Diode Array Detector (DAD). The mobile phase consisted of 50 mmol/L ammonium acetate buffer (pH 4.2) (A) and acetonitrile added of 0.1% acetic acid (B) and the gradient was applied as follows: 14 to 22% B 0-15 min; 22 to 25% B 15-20 min; 25 to 100% B 20-21 min; 100 to 14% B 21-26 min; 14%B 26-40 min at a flow rate of 4 mL/min. Injection volume was 1000 uL and detection was performed at 230 nm, selected based on the highest absorption showed by all peaks of interest. Peak fractions were collected in test tubes using a Gilson (FC-203B) fraction collector.

Collected fractions were evaporated in a concentrator (Centrivap Vacuum Concentrator System, Labconco, Kansas City, USA) for organic solvents removal and then lyophilized (Lyophilizer L101, Liobras, São Paulo, Brazil). The dry fractions were resuspended in methanol with 0.1 formic acid and subsequently analyzed by high resolution mass spectrometry (UHPLC Ekspert ultra LC 110-XL; Eksigent/Sciex, Washington, USA) coupled with a TripleTOF 5600+ (Sciex, Washington, USA) for exact mass and fragmentation pattern determination.

### 2.2.2 Cell culture

Biological activity of the *B. caapi* isolated fractions and of the  $\beta$ -carbolines were evaluated using BV-2 cells from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ 0356). Cells were cultured in 50 mL cell culture flasks (Kasvi, São José dos Pinhais, Brazil) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% antibiotics (10,000 units/mL penicillin and 10,000  $\mu$ g/mL streptomycin) (all from Gibco, Waltham, USA) and 1% non-essential aminoacids (Sigma-Aldrich, MO, USA) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere (incubator MCO-18AC, Sanyo, Osaka, Japan). Cells were then detached with trypsin (Gibco/ThermoFisher, Waltham, USA), transferred to a sterile conical tube, centrifuged at 200 g for 10 minutes and resuspended in prepared medium at an appropriate density for each experiment. Cell viability as assessed with trypan blue.

### 2.2.3 Preparation of cell treatments

The *B. caapi* methanolic extract and its isolated fractions were lyophilized for complete solvent removal. Stock solutions of isolated fractions and dry *B. caapi* extract at 10.24 mg/mL were prepared by resuspension in ultrapure water. Stock solutions of standards of harmine, harmaline and THH were prepared in MilliQ<sup>®</sup> water at 5.12

mg/mL. All stock solutions were then diluted in cell culture medium in serial dilutions to be used as cell treatment.

#### 2.2.4 Viability assay

Viability of the BV-2 cells after treatment was assayed by CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, WI, USA) that determines the number of viable cells in culture based on quantitation of the ATP present. Cells were transferred to 96 well cell culture plates (Greiner bio-one, SP, Brazil) at a density of 50,000 cells/well and treated with *B. caapi* extract or fractions F1, F2, F3, F4 and F5 at concentrations ranging from 4 to 512 µg/mL. Harmine, harmaline and THH were tested at concentrations from 2 to 64 µg/mL. Plates were incubated for 2 hours with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C, left for 30 minutes at room temperature prior to the addition of 50 µL of the reagent from the CellTiter-Glo® kit. Plate content was mixed in an orbital shaker for 2 minutes to induce cellular lysis and then let to stabilize for 10 minutes at room temperature before luminescence reading in a Spectra Max® Plus 384 luminometer from Molecular Devices (San José, USA).

#### 2.2.5 Apoptosis/necrosis assay

Apoptosis/necrosis detection was carried out using a FITC Annexin V/PI kit from BD Biosciences (San José, CA, USA). Cells were plated at a density of 100,000 cells/well in DMEM (Gibco/ThermoFisher, Waltham, USA), incubated for 2 h at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>, and the plates washed with phosphate buffered saline pH of 7.2 (PBS) at 37 °C. Cells were treated or not with harmine at concentrations from 0.5 to 16 µg/mL or F2 or F4 from 2 to 256 µg/mL. Dimethyl sulfoxide (DMSO) 10% was used as positive control. Plates were incubated for 24 h at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere and then washed with PBS prior to the addition of FITC annexin V and PI. Cell suspension was analyzed by flow cytometry (LSR II Fortessa™, BD, USA) with a total of 10,000 events per sample, using FACSDiva software v 7.0 (BD Biosciences, USA). Mean fluorescence intensity (MFI) was obtained by processing data in FlowJo™ software v 10.6.1.

#### 2.2.6 ROS detection

Reactive oxygen species were assessed using 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA) from Invitrogen (Waltham,

USA). Cells were plated as described for apoptosis, and then incubated or not with harmine, F2 and F4 at the same concentrations and the same conditions as used for the apoptosis/necrosis assay. The fluorescence intensity of carboxy-H2DFCDA was assessed by flow cytometry as described in 2.2.5.

### 2.2.7 Cytokine production

Cytokine production was assessed using a Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit from BD Biosciences (San José, USA). Cells were plated as described for viability and incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> with or without the treatments: *B. caapi* extract, fractions F1 to F5 at 0.5-64 µg/mL, harmine, harmaline and THH at 0.5-16 µg/mL. The test assay was performed according to the manufacturer's specifications. Briefly, samples were incubated for two hours with antibody-coated beads (capture beads) and detection antibody (detection reagent). After incubation, plate was washed one time and the complex (capture beads-cytokine-detection antibody) were suspended with kit buffer assay. Flow cytometry was used to evaluate 2,500 events/sample using FACSDiva software v7.0 and data was processed by FCAP Array software V. 3.0. A standard curve was performed to generate a standard curve and subsequent quantitative analysis expressed as pg/mL.

### 2.2.8 Statistical analyses

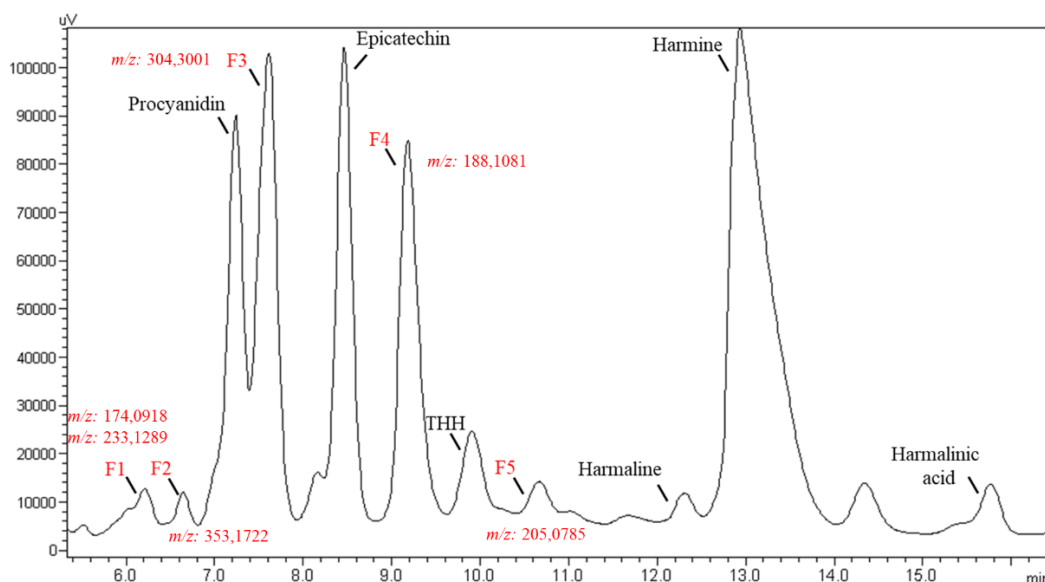
The data was reported as the mean and standard error of the mean (SEM) of at least 3 and maximum 6 independent experiments. Experimental differences were tested for statistical significance using one-way analysis of variance (ANOVA) using GraphPad Prism 5 software. A p-value of <0.05 was deemed as statistically significant and is indicated in the figures by an asterisk. P-values of <0.01 and <0.001 are indicated by 2 and 3 asterisks, respectively.

## 2.3. Results

### 2.3.1 Preliminary phytochemical analyses

Collected fractions were analyzed and their spectrometric data were compared with the literature. Procyanidin ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> = 579.2425), epicatechin ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> = 291.0868) and harmalinic acid ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> = 245.0923) fractions were putatively identified based on their exact mass and fragment pattern. Harmine, harmaline

and THH fractions were also compared with the literature and then confirmed against their analytical standards. The identification of each isolated fraction is shown in the chromatogram in Figure 2.1. Spectrometric data of all fractions are shown in supplementary material Figure S1.



**Figure 2.1.** HPLC-DAD chromatogram of a *Banisteriopsis caapi* methanolic extract, at 230 nm

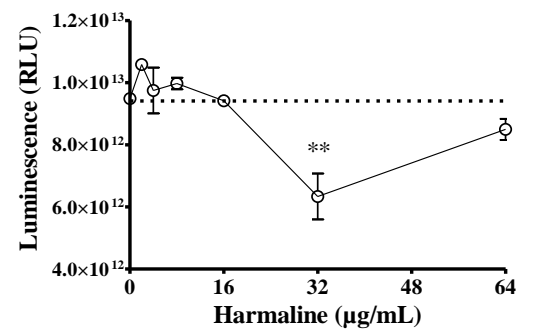
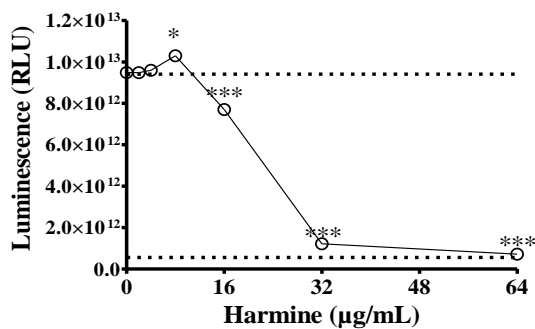
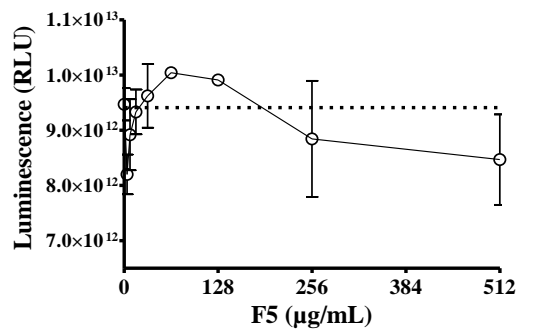
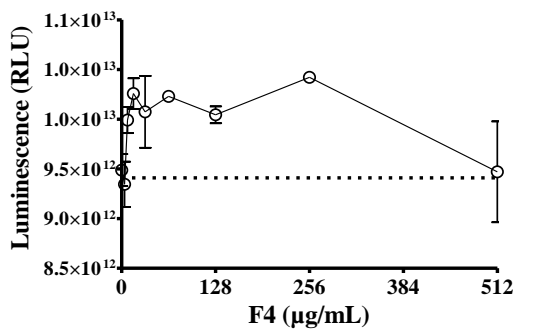
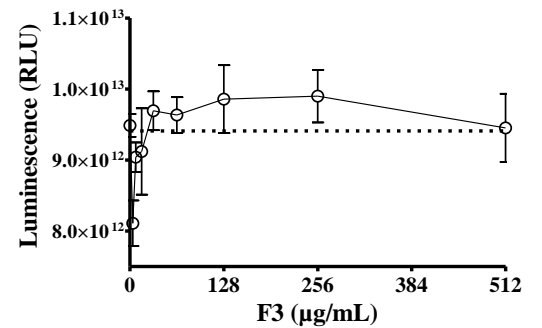
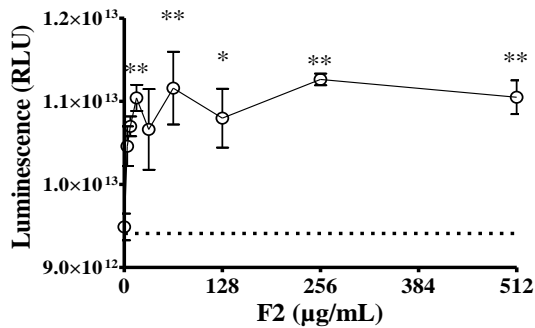
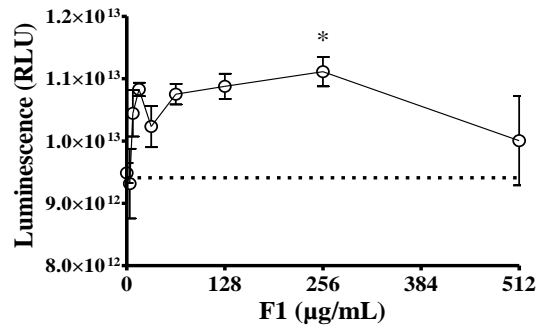
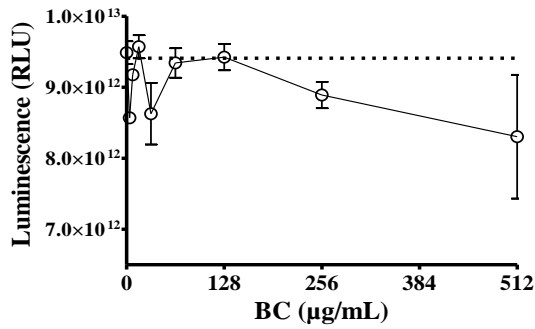
All identified compounds have already been described previously by other authors as present in *B. caapi* extracts (Hashimoto, 1975; Samoylenko et al., 2010). Compounds found in fractions F1, F2, F3, F4 and F5 have not been previously described in *B. caapi* samples, to the best of our knowledge. Exact mass ( $m/z$ ) of the substances  $[M+H]^+$  found in each fraction were as follows: F1 – 174.0918 and 233.1289; F2 – 353.1722; F3 – 304.3001; F4 – 188.1081; F5 – 205.0785.

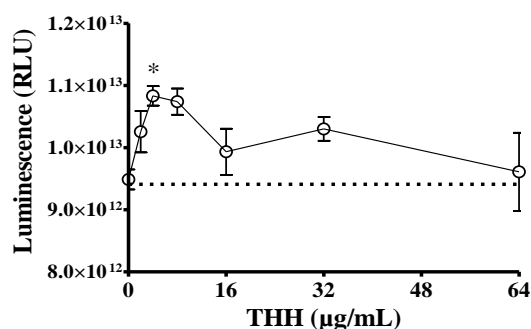
### 2.3.2 Viability assay

Figure 2.2 shows the results of the viability assay (ATP quantitation) for the *B. caapi* extract, the isolated fractions F1 to F5 and the  $\beta$ -carbolines. Treatment with *B. caapi* extract led to a progressive decrease in cell viability, although not significant, at the two highest concentrations. Treatment with the isolated fractions normally increased cell viability, with a significant increase observed with F2 at all concentrations tested. Although not significant, F4 also induced cell activity up to 384  $\mu\text{g/mL}$ . Among the  $\beta$ -carbolines, harmine had the highest impact, increasing the cell activity at 8  $\mu\text{g/mL}$



( $p < 0.05$ ) and then decreasing it drastically from 16 to 64  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.001$ ). Harmaline also reduced cell activity at 32  $\mu\text{g/mL}$  whereas THH significantly increased it at 4  $\mu\text{g/mL}$ .

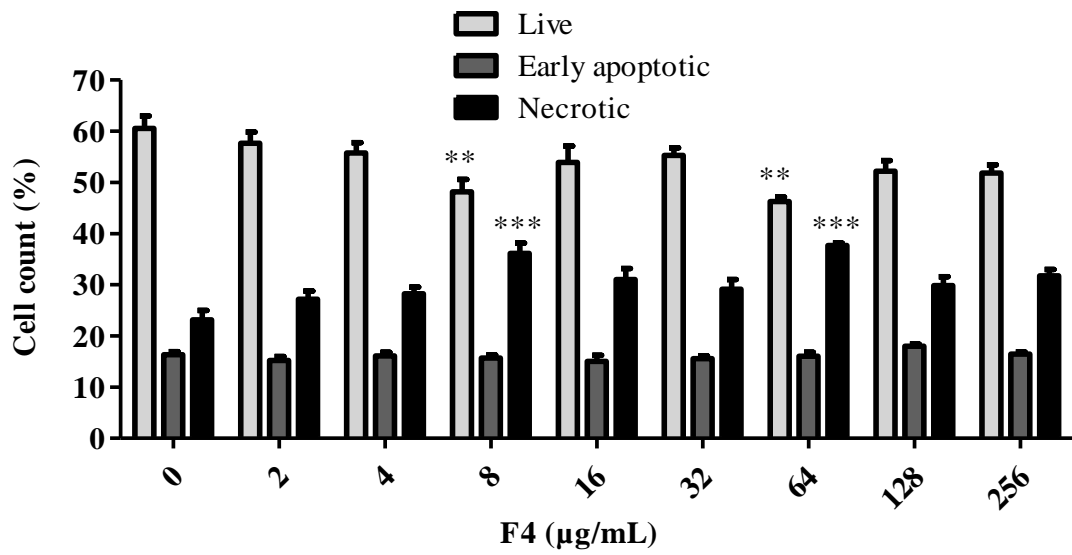
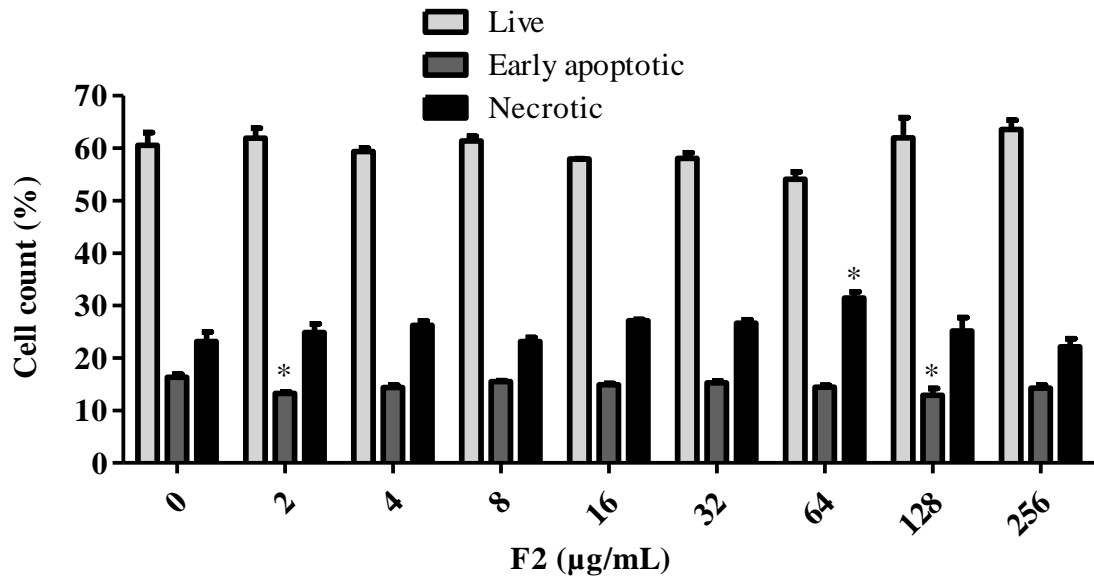


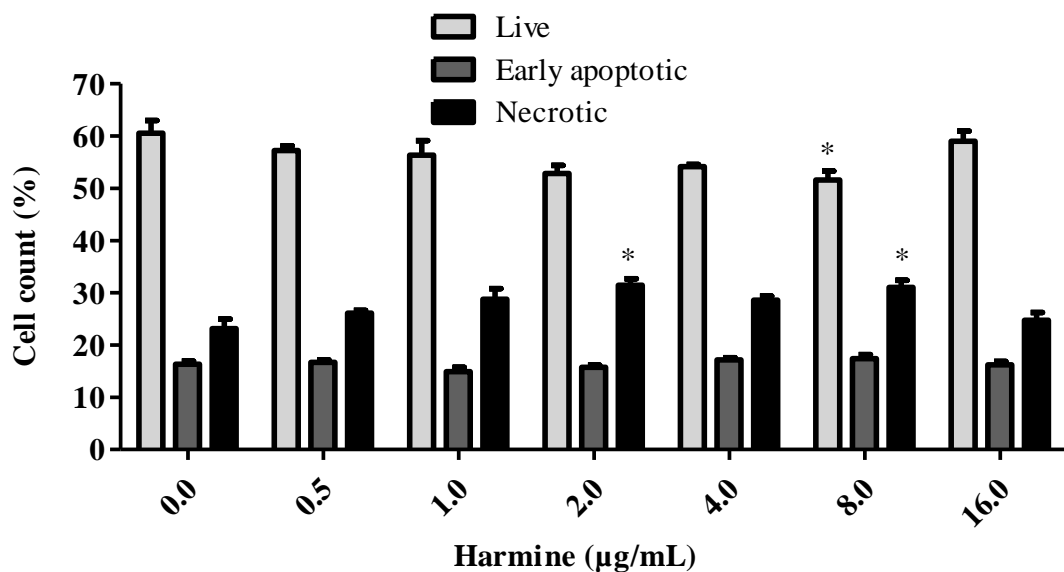


**Figure 2.2.** Viability of BV-2 cells treated at different concentrations for 2 hours with *B. caapi* extract (BC), the isolated fractions F1 to F5 and the  $\beta$ -carbolines. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. RLU: relative light units; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to cells with no treatment (0  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 2.3.3 Apoptosis/necrosis assay

The apoptosis assay was conducted with F2, F4 and harmine, and the results are shown in Figure 2.3. Treatments with F2 and F4 were selected based on the amount of the fraction that was obtained during the isolation process and harmine was selected because it is the most abundant  $\beta$ -carboline in *B. caapi*. When compared to controls, F2 reduced the proportion of cells going through early apoptosis at 2 and 128  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.05$ ) and increased the number of necrotic cells at 64  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.05$ ). Treatment with F4 significantly reduced the number of live cells proportionally at 8 and 64  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.01$ ), while simultaneously increasing the number of necrotic cells ( $p < 0.001$ ). The results of harmine treated cells show that there is also a slight reduction in the number of live cells with concomitant rise in necrotic cells with statistical significance at 2  $\mu\text{g/mL}$  (necrotic) and 8  $\mu\text{g/mL}$  (necrotic and live) ( $p < 0.05$ ). Cells were also treated with DMSO 10% as a positive control for necrosis (data not shown).

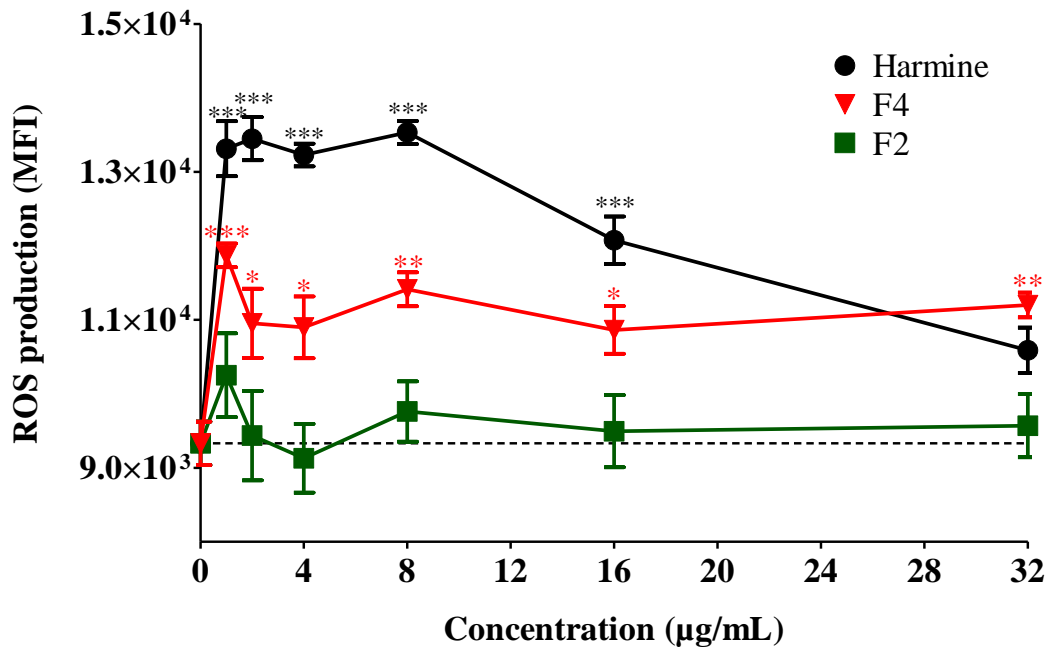




**Figure 2.3.** Results from flow cytometric analysis for apoptosis detection of 24 h treated BV-2 cells. Representation of different cell populations based on FITC Annexin V/PI staining. Mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to control cells (0  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 2.3.4 ROS production

This assay has a limitation on the number of treatments that can be tested at once. Treatments with F2 and F4 were selected as they were isolated at the highest amount and harmine for being the most abundant  $\beta$ -carboline in *B. caapi*. Reactive oxygen species production by BV-2 cells treated with F2 was not significant at any concentration when compared with no treatment (Figure 2.4). Fraction F4 significantly increased ROS production at all concentrations, with a higher effect at the lowest concentration tested (1  $\mu\text{g/mL}$ ;  $p < 0.001$ ). Harmine was the treatment that most affected ROS production with high significance at all concentrations tested ( $p < 0.001$ ). But rather than displaying a seemingly linear relation as viability and necrosis, ROS production was maintained in a similar level in all concentrations tested.

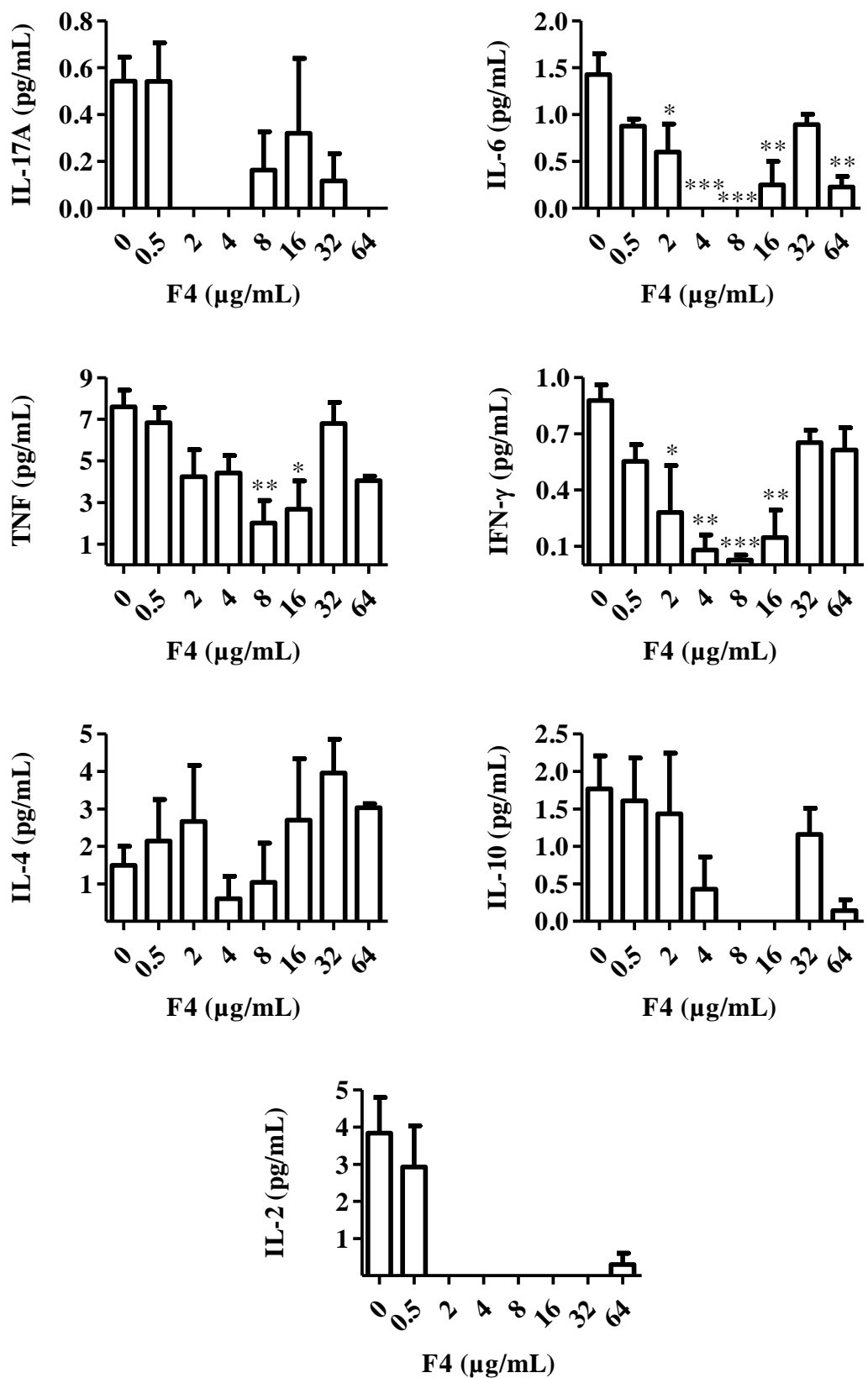


**Figure 2.4.** ROS production of 24 h treated BV-2 cells. MFI: mean fluorescence intensity; Mean  $\pm$  SEM; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ < 0.01, \*\*\* $p$ <0.001 compared to control (0  $\mu$ g/mL).

### 2.3.5 Cytokine production

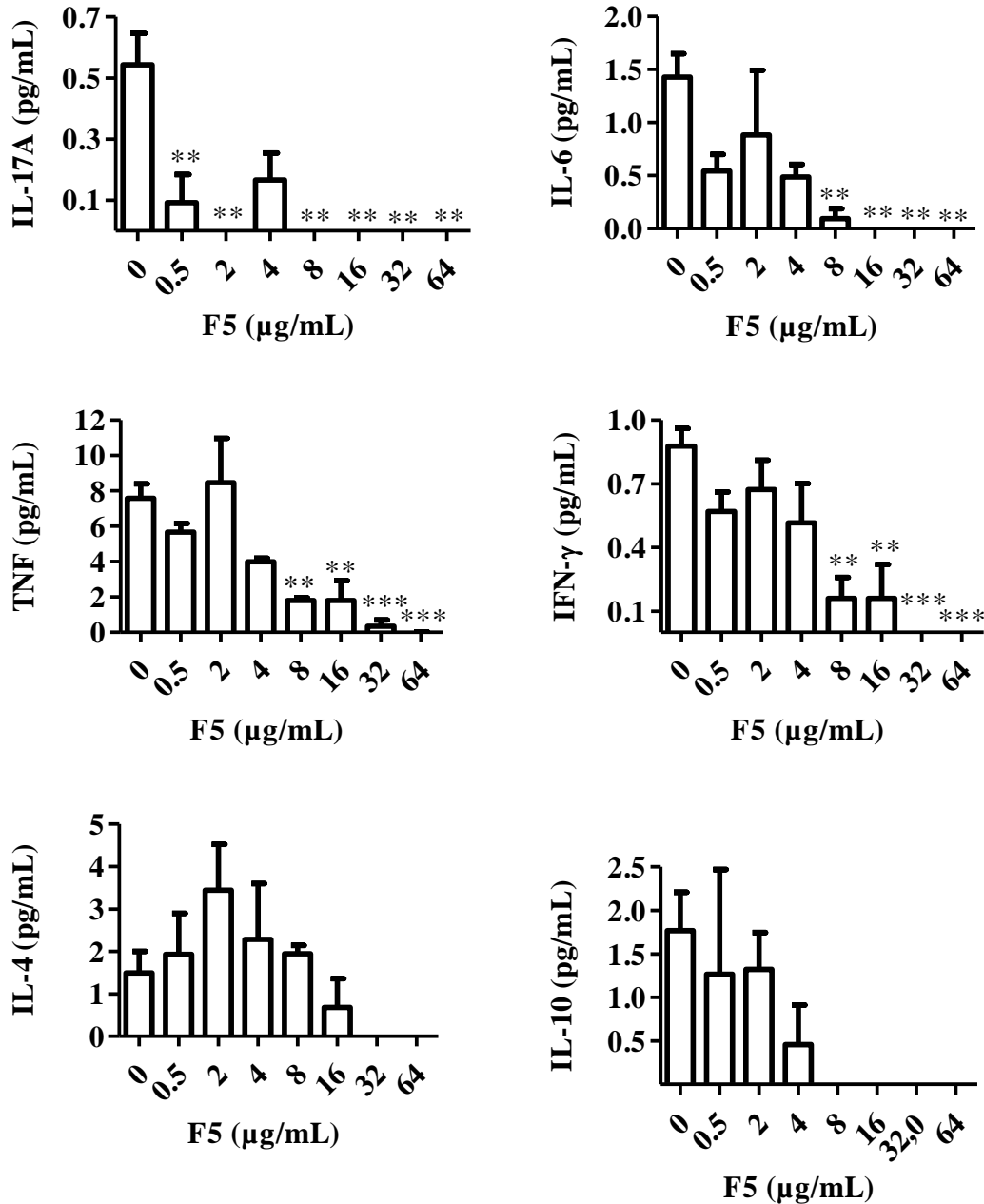
Cytokine production was tested for *B. caapi* extract, fractions F1 to F5 (0.5-64  $\mu$ g/mL), and  $\beta$ -carbolines (0.5-16  $\mu$ g/mL). The main significant changes were found for F4, F5 and for the  $\beta$ -carbolines (Figures 5 to 9).

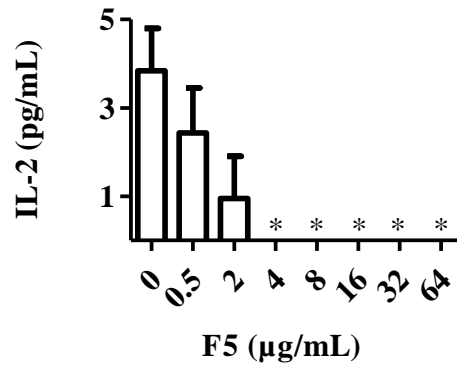
Treatment with F4 induced a pattern of decrease followed by increase in most of the quantified cytokines, which resulted in U-shaped graphs (Figure 2.5). IL-6 and IFN- $\gamma$  were significantly reduced at all concentrations ranging from 2 to 16  $\mu$ g/mL, with IL-6 also reducing at 64  $\mu$ g/mL. TNF production was significantly decreased at 8 and 16  $\mu$ g/mL. IL-2 decreased at all treated levels compared to control, although not significant.



**Figure 2.5.** Cytokine production by BV-2 cells after treatment with F4 for 2 h. Mean  $\pm$  SEM \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 compared to control cells (0  $\mu\text{g/mL}$ ).

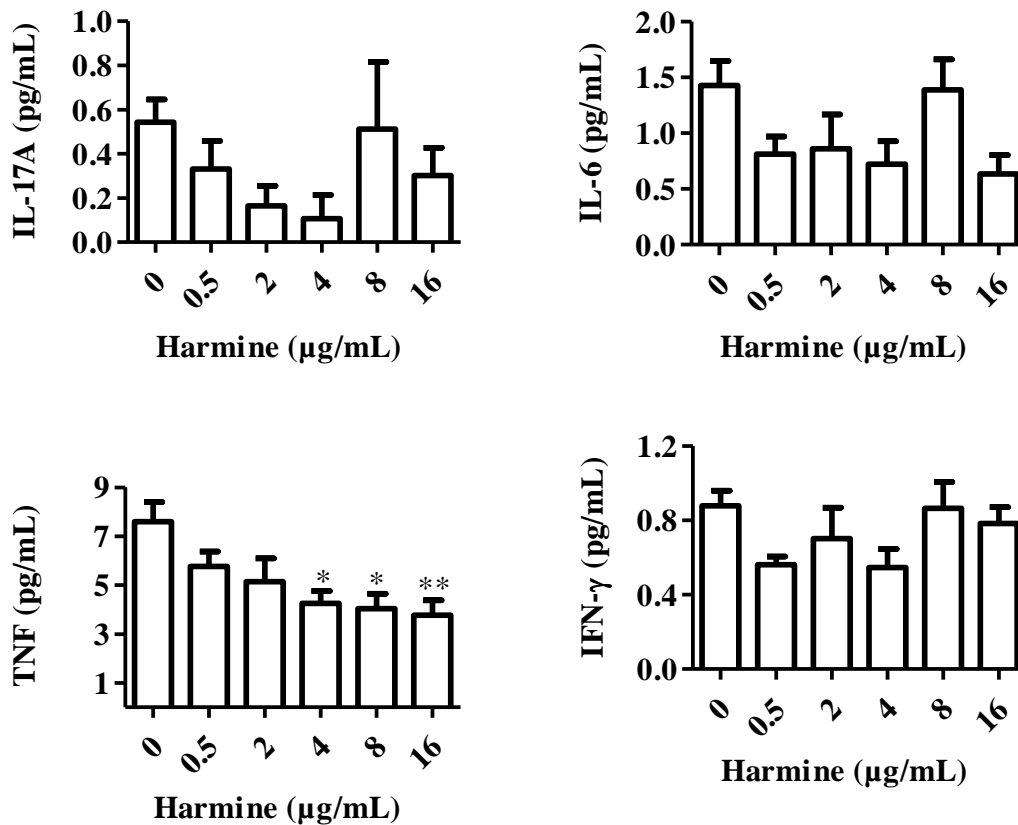
Fraction F5 had a strong impact on the production of 4 out of 7 cytokines (Figure 2.6). The treatment significantly reduced IL-17A production ( $p < 0.01$ ) at all concentrations, except for 4  $\mu\text{g/mL}$ . It also reduced IL-6, TNF and IFN- $\gamma$  starting at 8  $\mu\text{g/mL}$ , with higher significant increase for TNF and IFN- $\gamma$  ( $p < 0.001$ ). IL-2 was also completely inhibited starting at 4  $\mu\text{g/mL}$ .



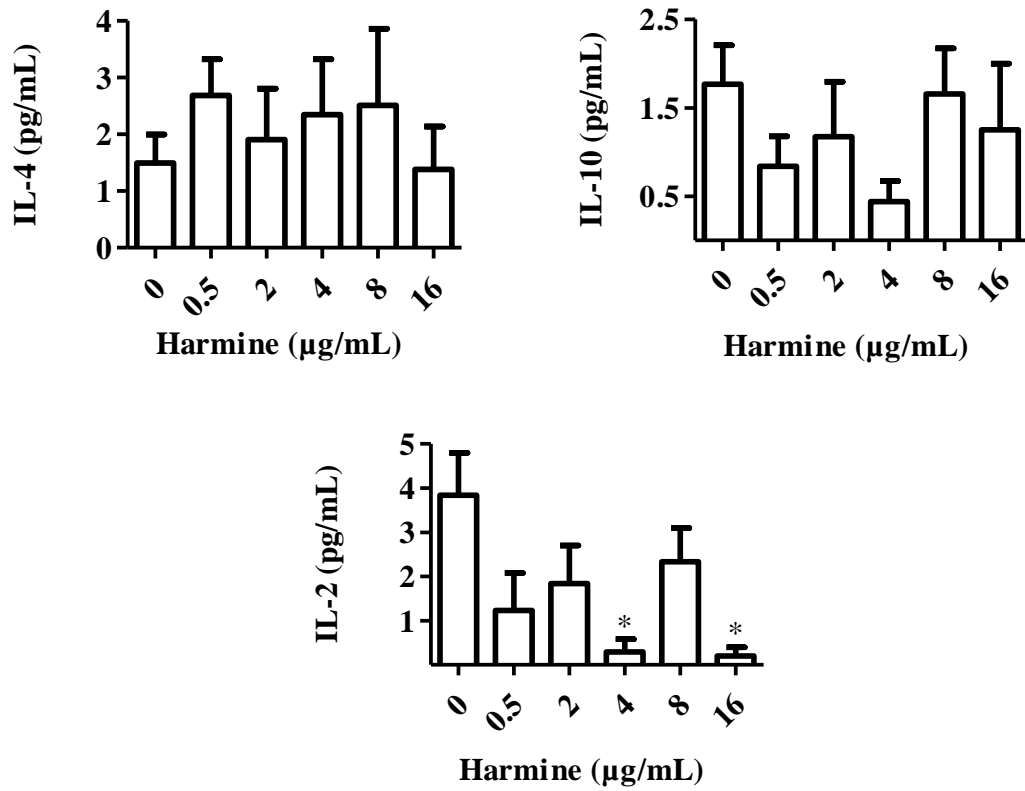


**Figure 2.6.** Cytokine production by BV-2 cells after treatment with F5 for 2 h. Mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  compared to cells with no treatment (0  $\mu\text{g/mL}$ ).

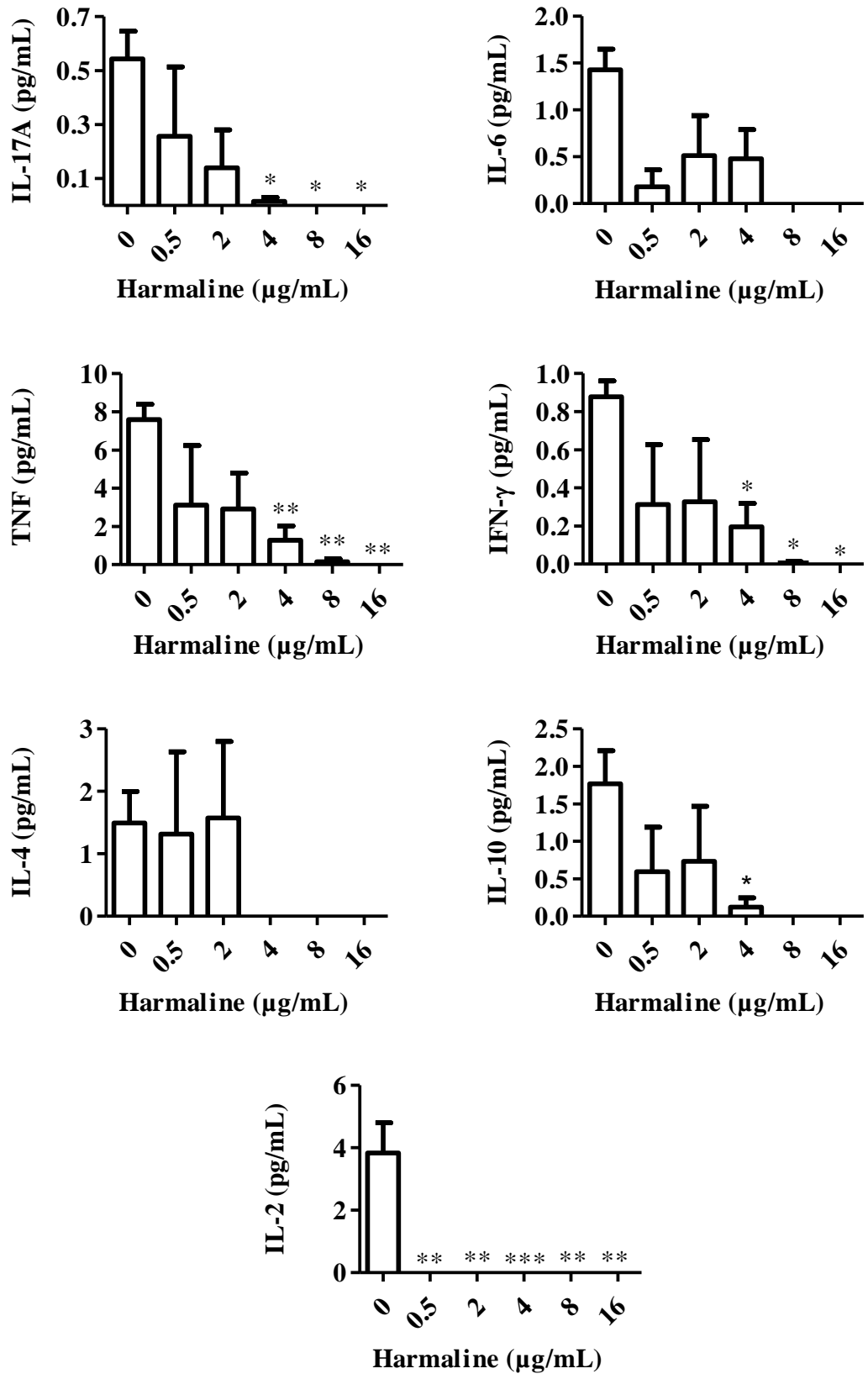
Harmine did not exert much of an effect in most cytokines at tested concentrations (Figure 2.7), except for TNF, with a gradual significant decrease from 4 to 16  $\mu\text{g/mL}$  and IL-2 at 4 and 16  $\mu\text{g/mL}$ . Harmaline, however, significantly reduce the release of IL-17A, TNF, IFN- $\gamma$  and IL-2. It was also the only treatment that induced a decrease in IL-10 production (Figure 2.8).





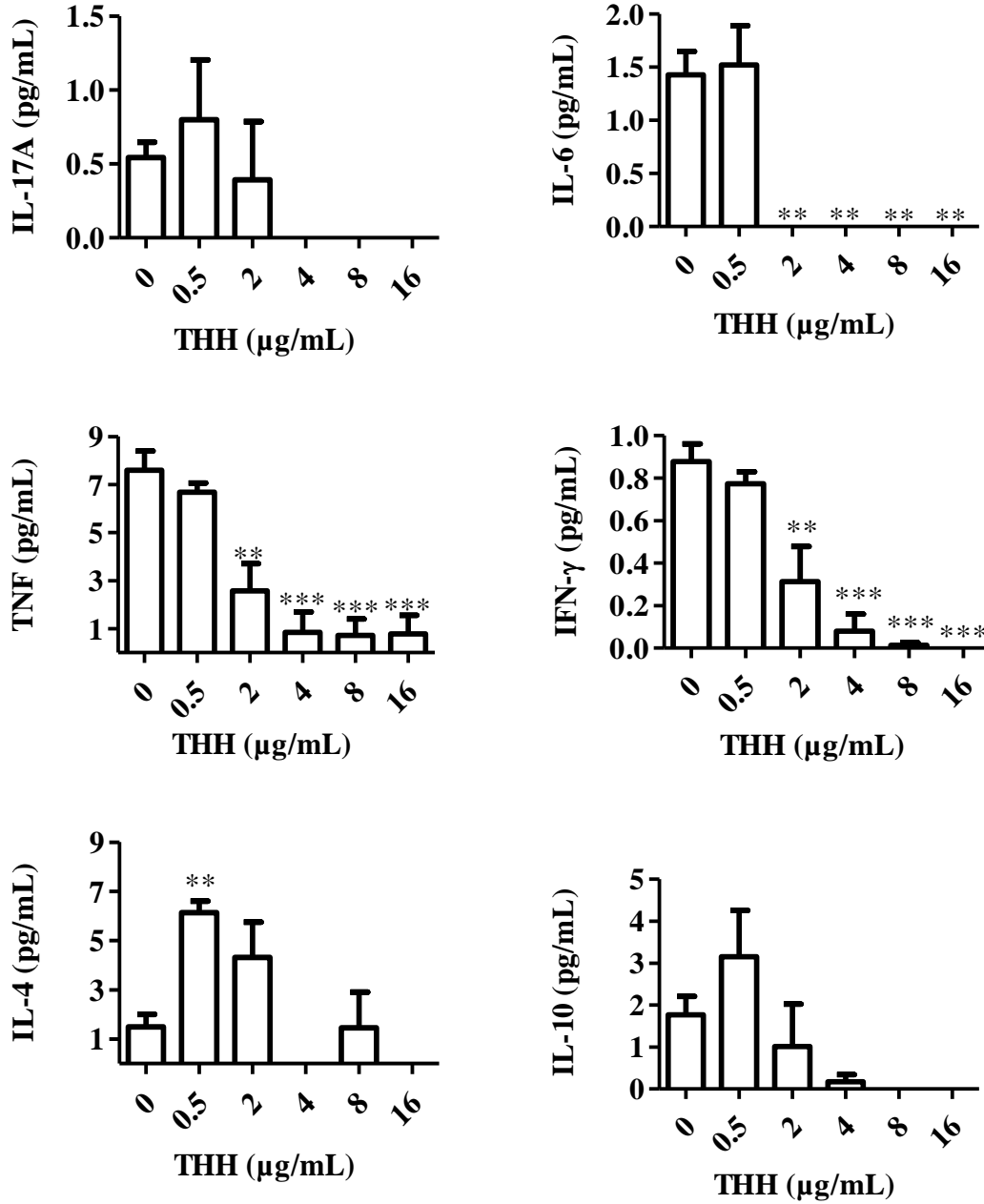


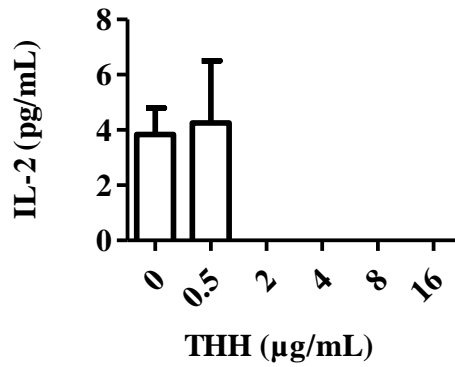
**Figure 2.7.** Cytokine production by BV-2 cells after treatment with harmine for 2 h. Mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  compared to cells with no treatment (0  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figure 2.8.** Cytokine production by BV-2 cells after treatment with harmaline for 2 h. Mean ± SEM; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 compared to cells with no treatment (0 μg/mL).

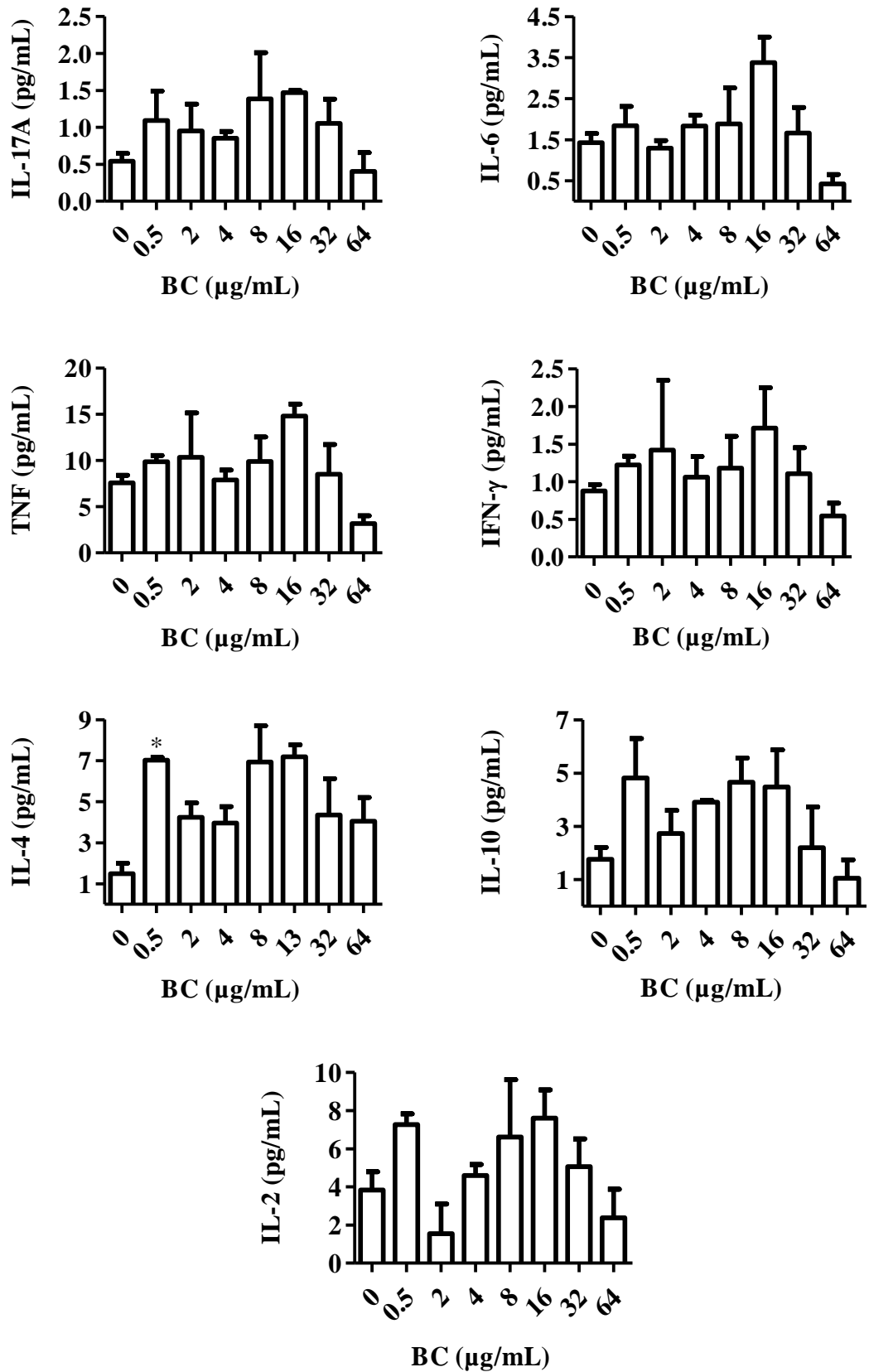
THH, as harmaline, led to significant alterations in most of the evaluated cytokines (Figure 2.9), significantly decreasing IL-6, TNF and IFN $\gamma$ , while simultaneously increasing IL-4 at 0.5  $\mu\text{g/mL}$ .



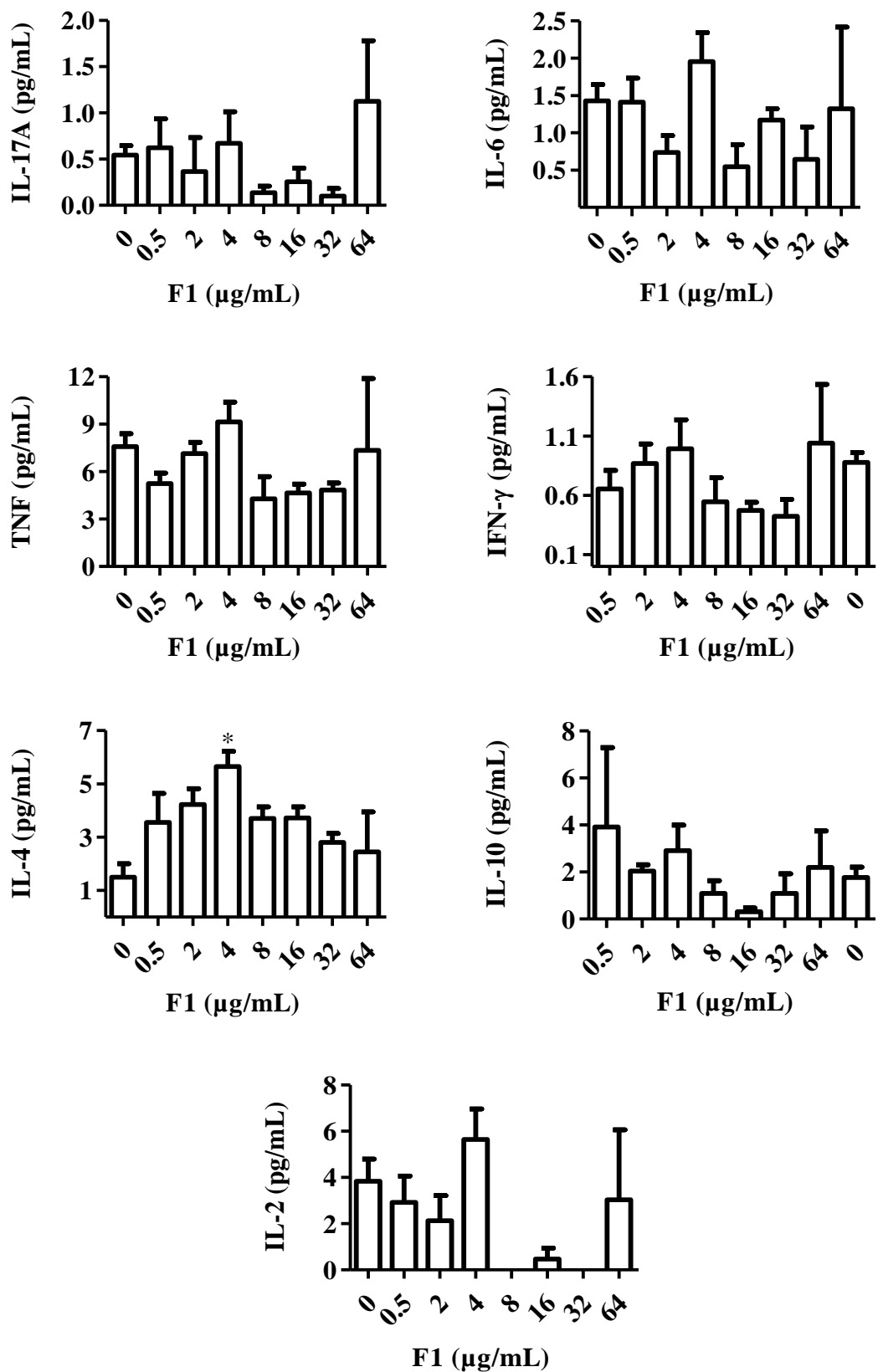


**Figure 2.9.** Cytokine production by BV-2 cells after treatment with THH for 2 h. Mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  compared to cells with no treatment (0  $\mu\text{g/mL}$ ).

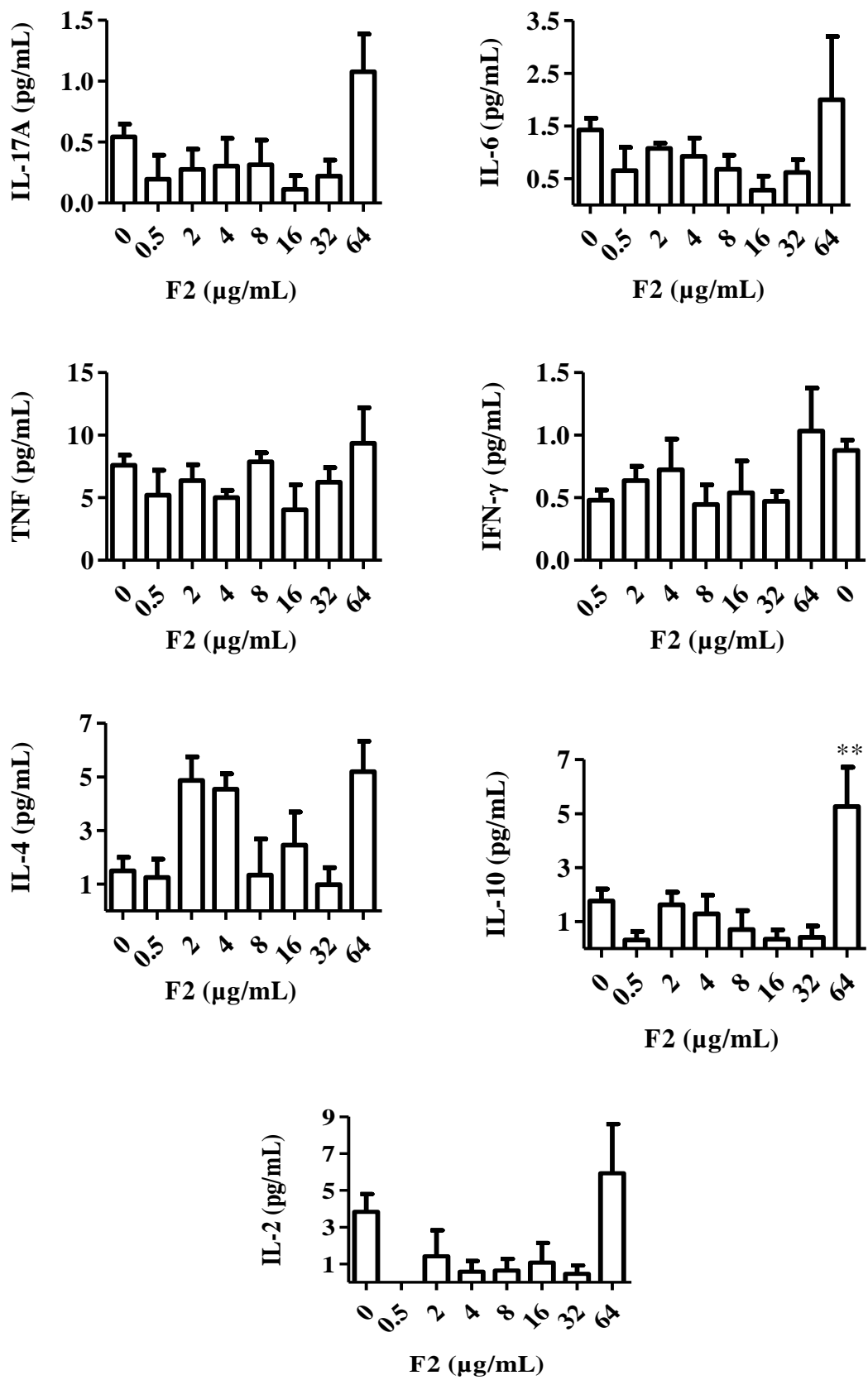
Cells treated with *B. caapi* extract did not result in many significant effects, except for IL-4, that displayed a significant increase at 0.5  $\mu\text{g/mL}$  (Figure 10). It is possible to observe that the lowest concentration of *B. caapi*, although not significantly, also increased both IL-10 and IL-2. Fraction F1, just as *B. caapi* extract, also increased IL-4 production significantly (Figure 11), while F2 significantly increased IL-10 secretion at the highest concentration (Figure 12). F2 also increased IL-17, IL-6, IL-4 and IL-2, but not significantly and F3 significantly reduced IL-2 and IL-6 (Figure 13) at the highest concentration (64  $\mu\text{g/mL}$ ).



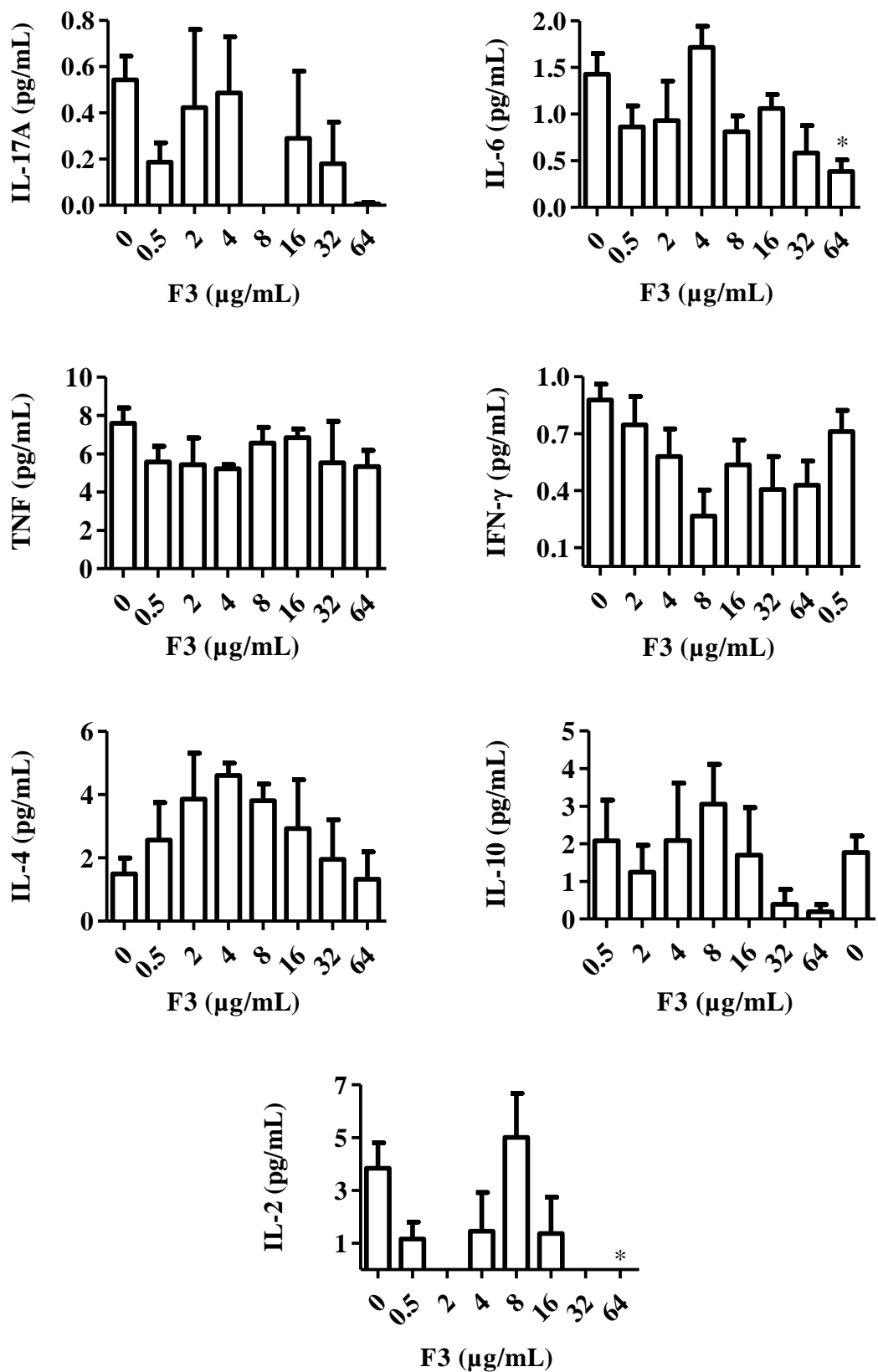
**Figure 2.10.** Cytokine production by BV-2 cells after treatment with *B. caapi* for 2 h. Mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to cells with no treatment (0  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figure 2.11.** Cytokine production by BV-2 cells after treatment with F1 for 2 h. Mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$  compared to cells with no treatment (0  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figure 2.12.** Cytokine production by BV-2 cells after treatment with F2 for 2 h. Mean  $\pm$  SEM; Mean  $\pm$  SEM; \*\*p < 0.01 compared to cells with no treatment (0  $\mu$ g/mL).



**Figure 2.13.** Cytokine production by BV-2 cells after treatment with F3 for 2 h. Mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$  compared to cells with no treatment (0  $\mu\text{g/mL}$ ).



## 2.4. Discussion

In the past few years, the potential of ayahuasca and *B. caapi* for the treatment of several CNS conditions have been consistently demonstrated in the literature, and one of the several markers for neurodegeneration is exacerbated inflammation in the brain (Van Eldik et al., 2007). Microglia exerts a key role in homeostasis maintenance (Jolivel et al., 2021; Orihuela et al., 2016) and evaluating the effects of potential treatments on these cells is an interesting and important approach in order to help underline mechanisms of action.

A few active substances present in *B. caapi* have already been described, the most abundant being the  $\beta$ -carboline alkaloids harmine, harmaline and THH. Other molecules from this same class have also been detected such as harmol, harmalinic acid and other derivatives (Hashimoto, 1975), harmalol (McKenna et al., 1984) and tetrahydronorharmine, as well as substances from different groups as epicatechin and procyanidin B2 (Samoylenko et al., 2010). Since 2010, very few studies concerning the elucidation of *B. caapi* chemical composition have been published, and more research on this plant that is very rich in bioactive compounds is still needed. *Peganum harmala*, another plant that is also rich in  $\beta$ -carboline and is largely used in traditional medicine in many countries, have been thoroughly researched and over 308 substances and trace elements had already been isolated (Li et al., 2017).

The HPLC-DAD analysis of the *B. caapi* methanolic extract yielded several peaks with high absorbance at 230 nm that were collected and analyzed. All fractions demonstrated chromatographic pureness with the presence of one peak of high intensity and only traces of other masses, except for fraction F1 that clearly displayed the presence of two intense masses (174.0918 and 233.1289) in the TripleTOF 5600+ instrument. Semi-preparative HPLC allows a more efficient separation than conventional column chromatography and the use of this technique enables compound purification from complex mixtures (Li et al., 2014).

Fractions F1, F2, F3 and F4 appeared to have a somewhat protective effect on BV-2 cells, after a 2 h period of incubation, since cell activity, evaluated via ATP production, was enhanced after treatment, especially for F2. After 24 h of incubation, however, F2 induced a significant increase in the proportion of necrotic cells at 64  $\mu\text{g/mL}$ . This is probably due to the presence of proliferative cells, which are common after a longer period of incubation. Similarly, F4 increased cell activity after 2 h but significantly

increased the number of necrotic cells at 8 and 64  $\mu\text{g/mL}$  after 24 h, in addition to significantly induce a higher production of ROS at all concentrations tested (0.5 to 64  $\mu\text{g/mL}$ ). It is known that ROS are involved in several important signaling systems (Hancock et al., 2001; Taverne et al., 2018) and that balance between production and scavenging of ROS is crucial for homeostasis. Therefore, it may be possible to infer that the high levels of ROS observed after treatment with F4 are not related to increased necrotic cell death. This is even better demonstrated after treatment with harmine, in which lowest concentrations (0.5 to 8  $\mu\text{g/mL}$ ) led to the highest levels of ROS and were then followed by a progressive reduction until 32  $\mu\text{g/mL}$ , while increased necrotic death was only observed at 2 and 8  $\mu\text{g/mL}$ . Since harmine showed to be highly cytotoxic at concentrations of 16  $\mu\text{g/mL}$  or higher, it is possible to suggest that ROS' production started to decrease at 16  $\mu\text{g/mL}$  because, at this concentration, most of the cells were probably unable to function correctly.

Intracellular ROS can influence the cell cycle and whether they promote or inhibit the process depends on their level, type of cell, extracellular stimuli and the duration of exposure (Figuerola et al., 2018), which might explain the contradictory effects observed here.

Harmaline also had a significant cytotoxic effect at 32  $\mu\text{g/mL}$ , whereas THH induced an overall enhanced activity, with significance at 4  $\mu\text{g/mL}$ . Simão et al (2020) evaluated the cytotoxicity of harmine, harmaline, THH and *B. caapi* in immortalized rat mesencephalic dopaminergic neurons and observed significant reduced cell viability after treatment with harmine and THH at 10  $\mu\text{mol/L}$ , which is equivalent to 2.12  $\mu\text{g/mL}$ ; and with harmaline at 80  $\mu\text{mol/L}$  (17.12  $\mu\text{g/mL}$ ) (Simão et al., 2020). This difference in outcomes is probably due to the fact that the authors assessed viability after 24 h incubation, whereas we incubated cells with treatments for 2 h, in addition to the fact that different cell types might respond differently to the same stimulus. But it is interesting that harmine and harmaline exerted a pronounced acute effect observed in the present study.

Overall, most of the treatments displayed an anti-inflammatory pattern with reduction of proinflammatory cytokines and discrete increase in IL-4, an anti-inflammatory factor. Fractions F4 and F5, as well as THH and harmaline, were the treatments that most affected cytokine production. The cytotoxicity of harmine at concentrations of 16  $\mu\text{g/mL}$  or higher was used as parameter to the selection of concentrations to test cytokine production, since the main goal was to assess therapeutic

potential of the *B. caapi* extract, fractions, and the known  $\beta$ -carbolines. Harmine significantly reduced cell production of TNF, which is consistent with the study conducted by Liu et al. (2017) in RAW 264.7 macrophages. The authors demonstrated that harmine suppresses the expression of TNF- $\alpha$  (at 5  $\mu$ mol/L or 1.06  $\mu$ g/mL), IL-6 and IL-1 $\beta$  (at 1  $\mu$ mol/L or 0.212  $\mu$ g/mL) and is an inhibitor of inflammation through the suppression of NF- $\kappa$ B signaling, which is a crucial proinflammatory transcription factor. THH was a noteworthy treatment, since, along with F4 and F5, one of the stimuli that most significantly inhibited TNF and IFN- $\gamma$  while simultaneously upregulating IL-4. Contrary to the other two  $\beta$ -carbolines that were cytotoxic, THH also increased cell activity at a lower concentration (4  $\mu$ g/mL). It appears that most of the treatments stimulated a M2 phenotype in the cells which is characterized by the inhibition of pro-inflammatory cytokines and the release of anti-inflammatory cytokines (He et al., 2020a; Rahimian et al., 2021).

It is interesting to note that isolated fractions F4 and F5 exerted a more prominent anti-inflammatory effect than harmine or the *B. caapi* extract. These components might help to explain the anti-inflammatory effects of ayahuasca or *B. caapi* that has already been described in animal models *in vivo* and *in vitro* (Galvão-Coelho et al., 2020; Gonçalves et al., 2020; da Silva et al., 2021).

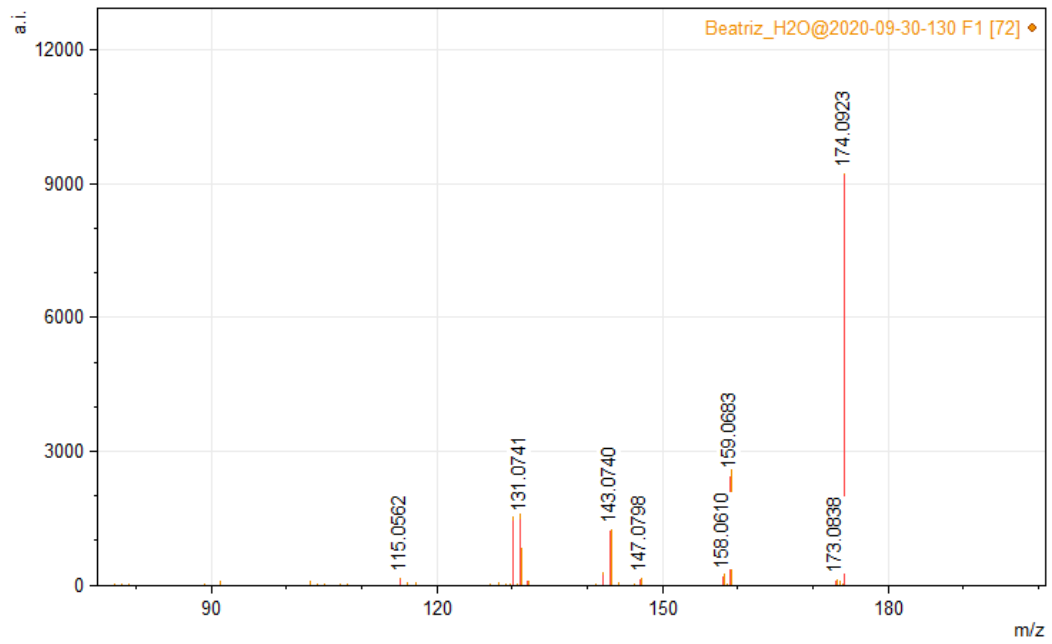
As it has been systematically documented (Messeha et al., 2019; Van Eldik et al., 2007; Rahimian et al., 2021; Smith et al., 2012), excessive microglial activation and the chronic release of cytokines and other cytotoxic factors are present in many neurodegenerative diseases. Therapeutically blocking these cytokines could be an effective way to treat and prevent neurodegenerative conditions and using natural products derivatives is a cost-effective, accessible, and safe therapeutic alternative.

## 2.5. Conclusion

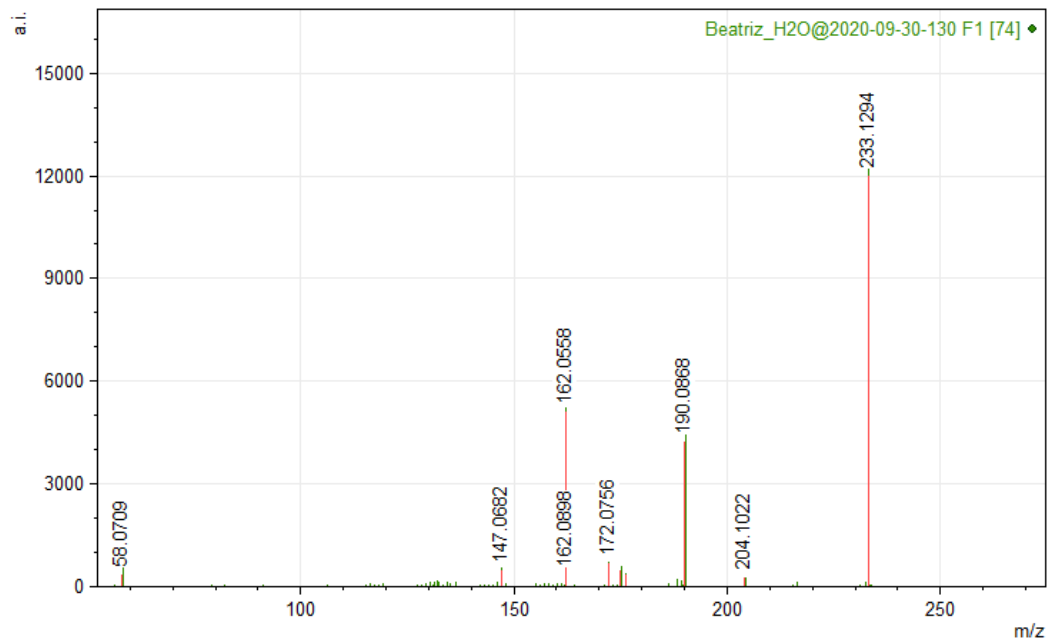
In summary, the results from this study suggest that the isolated components of *B. caapi*, a plant used in ayahuasca preparations, have an important anti-inflammatory effect in microglial BV-2 cells by decreasing pro-inflammatory cytokines levels, especially TNF. Results also showed that the isolated new compounds are more effective reducing cytokine levels than the *B. caapi* extract or the already known  $\beta$ -carbolines, which might help elucidating the anti-inflammatory effects of ayahuasca and *B. caapi* observed in other studies. This anti-inflammatory activity in BV-2 cells should be further

investigated in other cell lines, as the compounds isolated here might protect the brain against neurodegeneration caused by excessive microglial activation.

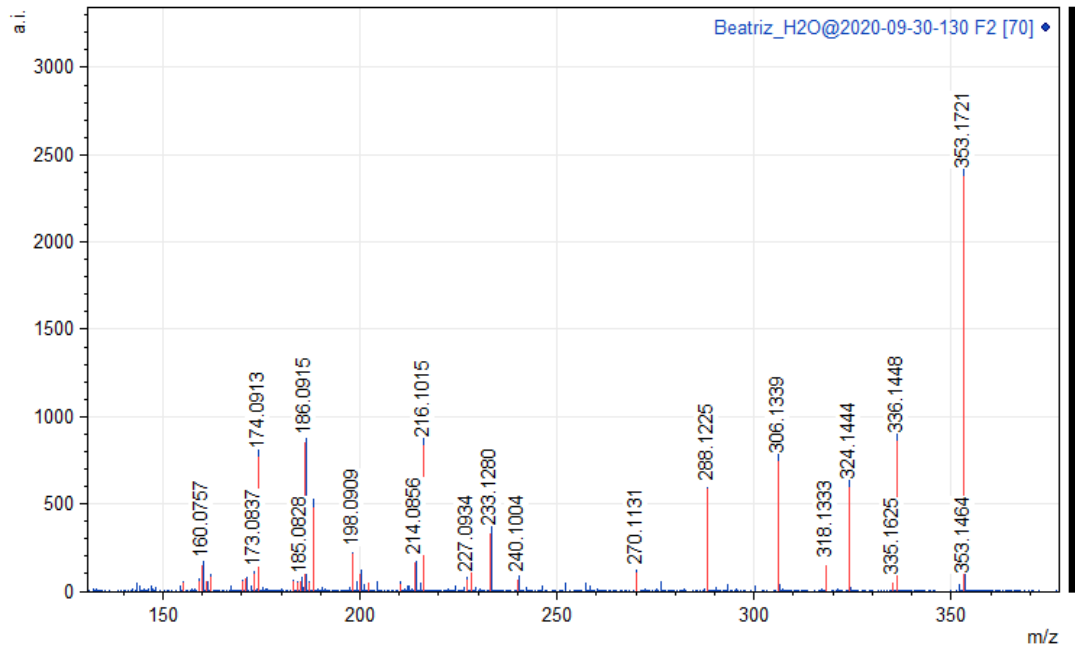
## Supplementary material



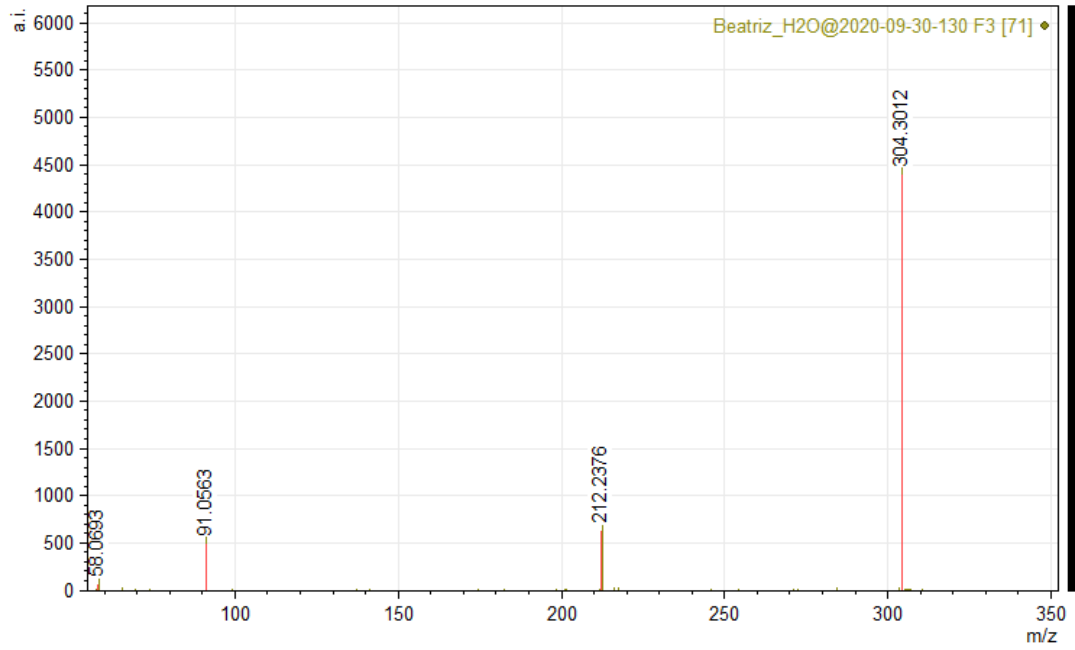
**F1: [M+H]<sup>+</sup> = 174,0923**



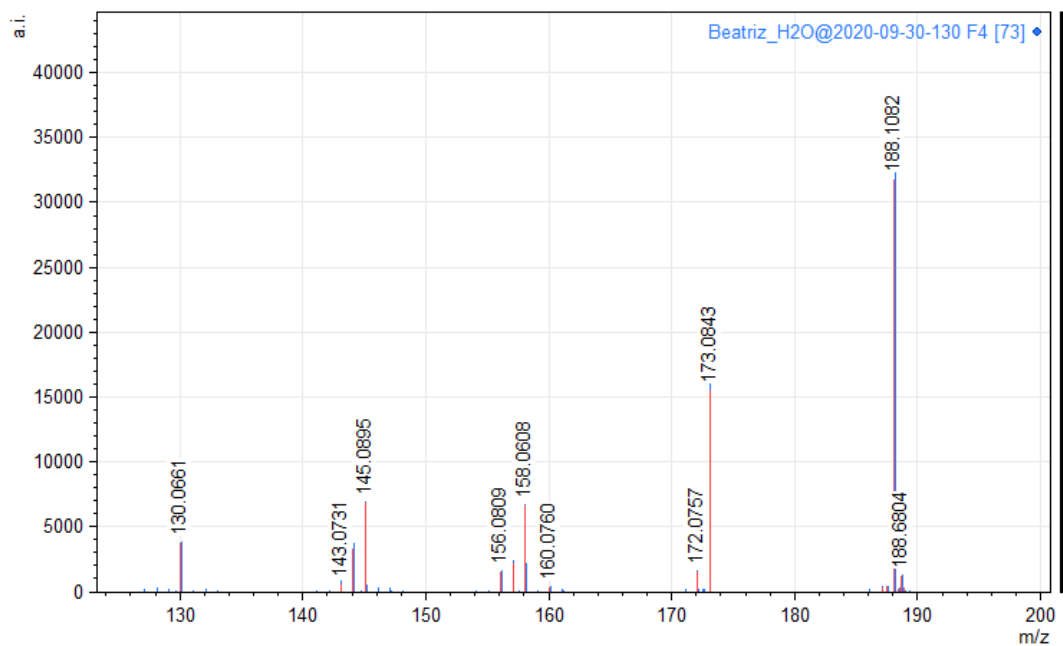
**F1: [M+H]<sup>+</sup> = 233,1294**



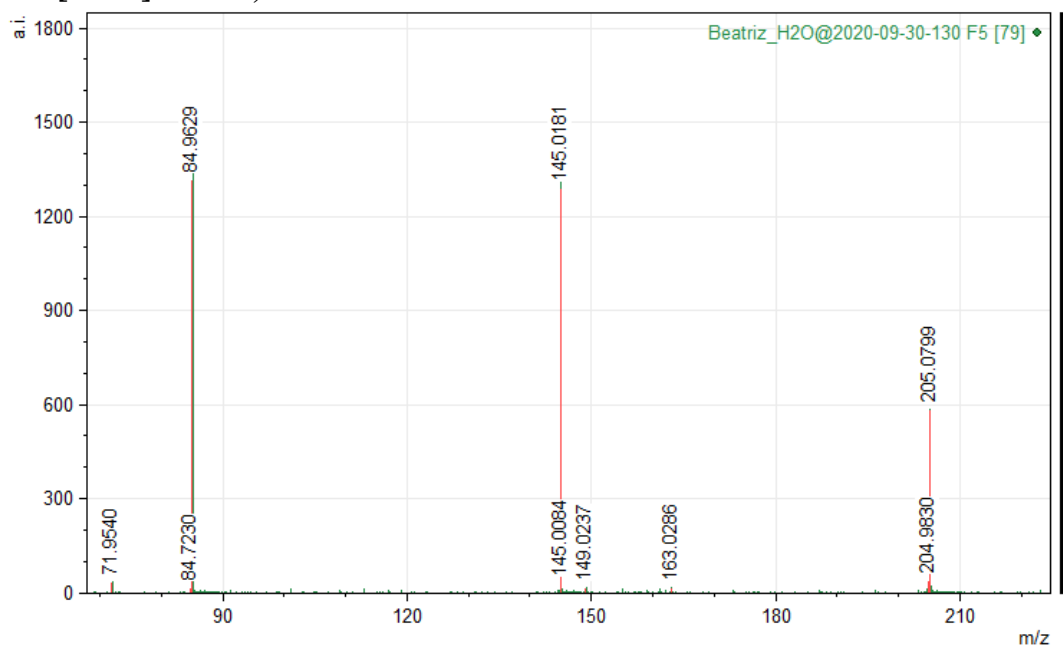
**F2: [M+H]<sup>+</sup> = 353,1721**



**F3: [M+H]<sup>+</sup> = 304,3012**



**F4: [M+H]<sup>+</sup> = 188,1062**



**F5: [M+H]<sup>+</sup> = 250,0799**

**Figure S1:** MS/MS spectra of fractions F1, F2, F3, F4 and F5 isolated from a *B. caapi* methanolic extract. Spectra were acquired by a QTOF spectrometer with ESI ionization  
 QTOF: Quadrupole Time of Flight. ESI: Electrospray

## V. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A fim de se caracterizar o perfil químico da ayahuasca e da espécie *B. caapi*, foi necessário realizar a síntese dos padrões de DMT e THH, não disponíveis comercialmente no início do desenvolvimento do trabalho. As sínteses foram bem sucedidas com a obtenção de produtos de alta pureza e úteis para o uso como padrões analíticos para quantificação em amostras reais.

O método de quantificação de DMT, harmina, harmalina e THH por LC-MS/MS desenvolvido para análise de extratos de *B. caapi* e da ayahuasca foi satisfatoriamente validado, com alta precisão, especificidade, sem efeito matriz e boa recuperação.

Foi possível realizar uma coleta bastante representativa de amostras de *B. caapi* de diferentes regiões do Brasil e com condições ambientais diversas, o que possibilitou a verificação de diferenças significativas na composição química das plantas, possivelmente ocasionadas pelo clima e solo característicos das regiões. A coleta de amostras de ayahuasca também foi realizada em diferentes pontos do país e grupos religiosos e xamânicos, refletindo diferentes formas de preparo do chá.

A alta variabilidade encontrada na concentração dos alcaloides entre as amostras de *B. caapi* e de ayahuasca indica a importância de se considerar essas diferenças nos estudos para se avaliar o potencial terapêutico destes materiais. A quantificação dos compostos de interesse na planta e na preparação feita por decocção permitiu a comprovação da hipótese de conversão entre as  $\beta$ -carbolidinas durante o preparo.

O isolamento de compostos bioativos potencialmente novos em extrato de *B. caapi* por cromatografia semipreparativa resultou em frações relativamente puras sem necessidade de muitas etapas de purificação. A caracterização inicial foi realizada com a determinação da massa exata dos compostos isolados. É de grande relevância dar seguimento a uma identificação mais aprofundada dos compostos isolados, a fim de se conhecer sua identidade definitiva. Para isso, é necessário isolar uma grande quantidade de cada fração, uma vez que os métodos de elucidação de estruturas químicas, como RMN, demandam quantidades elevadas das substâncias para a realização dos ensaios.

Mesmo sem a elucidação estrutural dos compostos isolados, foi possível demonstrar sua importante ação anti-inflamatória, em especial das frações F4 e F5, em células da micróglia. Esse é um achado de grande relevância, uma vez que o excesso de atividade pró-inflamatória dessas células é um aspecto central em diversas condições



neuropatológicas. E o fato de que essas frações, até então não relatadas em extratos de *B. caapi*, tenham exercido efeito superior ao do extrato total da planta e similar ou superior ao efeito das conhecidas  $\beta$ -carbolinas, é de grande interesse, pois pode ajudar a elucidar os efeitos já relatados da ayahuasca no SNC.

Estudos futuros devem incluir a caracterização estrutural dos compostos presentes nas frações de *B. caapi* isoladas nesse estudo, e o avanço da investigação da atividade biológica desses compostos, como o uso de novas linhagem celulares e a inclusão de novos ensaios, incluindo novas citocinas envolvidas nos processos inflamatórios.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, A.M., Carvalho, F., Bastos, M.L., Pinho, P.G., Carvalho, M., 2015. The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. *Arch. Toxicol.* 89, 1151–1173.
- Barth, E.F., Pinto, L.S., Dileli, P., Biavatti D.C., Silva, Y.L., Bortolucci, W, Gazim, ZC, Takemura, O.S., Romagnolo, M.B., & Laverde-Junior, A., 2018). Biological screening of extracts from leaf and stem bark of *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). *Brazilian J. Biol.* 78:601–608.
- Bayir H., 2005. Reactive oxygen species. *Crit. Care Med.* 33 (12):S498-S501
- Blackledge, R.D. and Taylor C.M., 2003. *Psychotria Viridis* - A Botanical Source of Dimethyltryptamine (DMT). *Microgram J.* 1, 18–22.
- Blasi E., Barluzzi R., Bocchini V., Mazzolla R., Bistoni F., 1990. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf / v-myc carrying retrovirus. *J. Neuroimmunol.* 27, 229–237.
- Block M.L., Hong J.S., 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Prog. Neurobiol.* 76, 77–98.
- Bogenschutz M.P., Johnson M.W., 2015. Classic hallucinogens in the treatment of addictions. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 64, 250–258.
- Braga C.I.S., Cardoso, D.S., Takada, S.H., 2019. Quem é a micróglia e como ela defende o cérebro? *Nanocell News.* 6(7). Disponível em <https://www.nanocell.org.br/quem-e-a-microglia-e-como-ela-defende-o-cerebro/>. Acesso em: 21/11/2021
- Brasil, 2010. Resolução nº1 de 25 de janeiro de 2010. Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas. *Diário Oficial da União.* Imprensa Nacional. Ed. 17 de 26/01/2010. Disponível em: <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/1574499/pg-57-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-26-01-2010>. Acesso em: 21/11/2021.
- Brieger K., Schiavone S., Miller F.J., Krause K.H., 2012. Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Med. Wkly.* 142, 1–14.
- Callaway J.C., 2005. Various Alkaloid Profiles in Decoctions of *Banisteriopsis Caapi*. *Callaw. Var. Alkaloid Profiles J. Psychoact. Drugs.* 37(2), 1-5.
- Callaway J.C., Grob C.S., 1998. Ayahuasca preparations and serotonin reuptake inhibitors: a potential combination for severe adverse interactions. *J. Psychoactive Drugs* 30, 367–369.
- 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. *J. Ethnopharmacol.* 65, 243–256.
- Callaway J.C., Brito G.S., Neves E.S., 2005. Phytochemical Analyses of *Banisteriopsis Caapi* and *Psychotria Viridis*. *Neves Phytochem. Anal. J. Psychoact. Drugs.* 37(2), 145-150.
- Cao R., Peng W., Wang Z., Xu A., 2007.  $\beta$ -Carboline Alkaloids: Biochemical and Pharmacological Functions. *Curr. Med. Chem.* 14, 479–500.
- Carbonaro T.M., Gatch M.B., 2017. Neuropharmacology of N,N-Dimethyltryptamine. *Brain Res. Bull.* 126, 74–88.

- Carson M.J., Doose J.M., Melchior B., Schmid C.D., Ploix C.C., 2006. CNS immune privilege: Hiding in plain sight. *Immunol. Rev.* 213, 48–65.
- de Castro-Neto E.F., da Cunha R.H., da Silveira D.X., Yonamine M., Gouveia T.L.F., Cavalheiro E.A., Amado D., Naffah-Mazzacoratti M.D.G., 2013. Changes in aminoacidergic and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus and amygdala of rats after ayahuasca ingestion. *World J. Biol. Chem.* 4, 141–147.
- Cesar P., Barbosa R., Tófoli L.F., Bogenschutz M.P., Hoy R., Berro L.F., Marinho E.A. V., Areco K.N., Winkelman M.J., 2018. Assessment of Alcohol and Tobacco Use Disorders Among Religious Users of Ayahuasca. 9, 1–12.
- Chen S., Cheng A.C., Wang M.S., Peng X., 2008. Detection of apoptosis induced by new type gosling viral enteritis virus in vitro through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling. *World J. Gastroenterol.* 14, 2174–2178.
- Cho E.S., Lee K.W., Lee H.J., 2008. Cocoa procyanidins protect PC12 cells from hydrogen-peroxide-induced apoptosis by inhibiting activation of p38 MAPK and JNK. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 640, 123–130.
- Colaço, C.S., Alves, S.S., Nolli, L.M., Pinheiro, W.O., Oliveira, D.G.R., Santos, B.W.L., Pic-Taylor, A., Mortari, M.R., Caldas, E.D., 2020. Toxicity of ayahuasca after 28 days daily exposure and effects on monoamines and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in brain of Wistar rats. *Metab. Brain Dis.* 35(5), 739-751.
- Cook J.A., Mitchell J.B., 1989. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal. Biochem.* 179, 1–7.
- Crouch, S.P.M., Kozlowski, R., Slater, K.J. & Fletcher J., 1993. Use of ATP as a measure of cell proliferation and cell toxicity. *J. Immunol. Methods* 160, 81–88.
- Deliganis A. V., Pierce P.A., Peroutka S.J., 1991. Differential interactions of dimethyltryptamine (DMT) with 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Biochem. Pharmacol.* 41, 1739–1744.
- Domínguez-Clavé E., Soler J., Elices M., Pascual J.C., Álvarez E., Revenga M.F., Friedlander P., Feilding A., Riba J., 2016. Ayahuasca: pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. *Brain Res. Bull.* 162(Pt 1), 89-101.
- Dubyak G.R., 2019. Luciferase-assisted detection of extracellular ATP and ATP metabolites during immunogenic death of cancer cells. *Methods Enzymol.* 629, 81-102.
- Van Eldik L.J., Thompson W.L., Ranaivo H.R., Behanna H.A., Martin Watterson D., 2007. Glia Proinflammatory Cytokine Upregulation as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Diseases: Function-Based and Target-Based Discovery Approaches. *Int. Rev. Neurobiol.* 82, 277–296.
- Fábregas J.M., González D., Fondevila S., Cutchet M., Fernández X., Barbosa P.C.R., Alcázar-Córcoles M.Á., Barbanoj M.J., Riba J., Bouso J.C., 2010. Assessment of addiction severity among ritual users of ayahuasca. *Drug Alcohol Depend.* 111(3), 257-261.
- Santos A.F.A., Vieira A.L.S., Pic-taylor A., Caldas, E.D., 2017. Reproductive effects of the psychoactive beverage ayahuasca in male Wistar rats after chronic exposure. *Rev. Bras. Farmacogn.* 27(3), 353–360.
- Fenn A.M., Henry C.J., Huang Y., Dugan A., Godbout J.P., 2012. Lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-4 receptor- $\alpha$  expression and corresponding sensitivity to the M2

promoting effects of IL-4 are impaired in microglia of aged mice. *Brain. Behav. Immun.* 26, 766–777.

Figuroa D., Asaduzzaman M., Young F., 2018. Real time monitoring and quantification of reactive oxygen species in breast cancer cell line MCF-7 by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 94, 26–33.

Fisher R., Lincoln L., Jackson M.J., Abbate V., Jenner P., Hider R., Lees A., Rose S., 2018. The effect of *Banisteriopsis caapi* (*B. caapi*) on the motor deficits in the MPTP-treated common marmoset model of Parkinson's disease. *Phyther. Res.* 32, 678–687.

Fortunato J.J., Réus G.Z., Kirsch T.R., Stringari R.B., Stertz L., Kapczinski F., Pinto J.P., Hallak J.E., Zuardi A.W., Crippa J.A., et al., 2009. Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 33, 1425–1430.

Fortunato J.J., Réus G.Z., Kirsch T.R., Stringari R.B., Fries G.R., Kapczinski F., Hallak J.E., Zuardi A.W., Crippa J.A., Quevedo J., 2010. Chronic administration of harmine elicits antidepressant-like effects and increases BDNF levels in rat hippocampus. *J. Neural Transm.* 117, 1131–1137.

Frecska E., Bokor P., Winkelman M., 2016. The Therapeutic Potentials of Ayahuasca: Possible Effects against Various Diseases of Civilization. *Front. Pharmacol.* 7, 1–17.

Frost D., Meechoovet B., Wang T., Gately S., Giorgetti M., Shcherbakova I., Dunckley T., 2011.  $\beta$ -carboline compounds, including Harmine, inhibit DYRK1A and Tau phosphorylation at multiple Alzheimer's disease-related sites. *PLoS ONE* 6(5), e19264.

Gable R.S., 2007. Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. *102(1)*, 24–34.

Gadani, Sachin P; Cronk J., 2013. Interleukin-4: A Cytokine to Remember. *J. Immunol.* 189, 4213–4219.

Galloway D.A., Phillips A.E.M., Owen D.R.J., Moore C.S., 2019. Phagocytosis in the brain: Homeostasis and disease. *Front. Immunol.* 10, 1–15.

Galvão-Coelho N.L., de Menezes Galvão A.C., de Almeida R.N., Palhano-Fontes F., Campos Braga I., Lobão Soares B., Maia-de-Oliveira J.P., Perkins D., Sarris J., de Araujo D.B., 2020. Changes in inflammatory biomarkers are related to the antidepressant effects of Ayahuasca. *J. Psychopharmacol.* 34, 1125–1133.

Galvão A.C.D.M., Almeida R.N. De., Erick A., Silva S., 2018. Cortisol Modulation by Ayahuasca in Patients With Treatment Resistant Depression and Healthy Controls. *Front. Psychiatry.* 9, 1–10.

Gambelunghe C., Aroni K., Rossi R., Moretti L., Bacci M., 2008. Identification of N,N-dimethyltryptamine and  $\beta$ -carbolines in psychotropic ayahuasca beverage. *Biomed. Chromatogr.*

Ganzera M., Sturm S., 2018. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Recent advances on HPLC / MS in medicinal plant analysis — An update covering 2011 – 2016. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147, 211–233.

Gaujac A., Navickiene S., Collins M.I., Brandt S.D., De Andrade J.B., 2012. Analytical techniques for the determination of tryptamines and  $\beta$ -carbolines in plant matrices and in psychoactive beverages consumed during religious ceremonies and neo-shamanic urban practices. *Drug Test. Anal.* 4(7-8), 636-648.

- Gaujac A., Dempster N., Navickiene S., Brandt S.D., de Andrade J.B., 2013. Determination of N,N-dimethyltryptamine in beverages consumed in religious practices by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography ion trap mass spectrometry. *Talanta* 106, 394–398.
- El Gendy M.A.M., Soshilov A.A., Denison M.S., El-Kadi A.O.S., 2012. Transcriptional and posttranslational inhibition of dioxin-mediated induction of CYP1A1 by harmine and harmol. *Toxicol. Lett.* 208, 51–61.
- Göckler N., Jofre G., Papadopoulos C., Soppa U., Tejedor F.J., Becker W., 2009. Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J.* 276, 6324–6337.
- Gosetti F., Mazzucco E., Zampieri D., Gennaro M.C., 2010. Signal suppression / enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 3929–3937.
- Hancock J.T., Desikan R., Neill S.J., 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 345–350.
- Hashimoto Y., 1975. New organic bases from Amazonian Banisteriopsis. *Phytochem.* 14, 1633–1635.
- He Y., Gao Y., Zhang Q., Zhou G., Cao F., Yao S., 2020a. IL-4 Switches Microglia/macrophage M1/M2 Polarization and Alleviates Neurological Damage by Modulating the JAK1/STAT6 Pathway Following ICH. *Neuroscience* 437, 161–171.
- He Z., Yang Y., Xing Z., Zuo Z., Wang R., Gu H., Qi F., Yao Z., 2020b. Intraperitoneal injection of IFN- $\gamma$  restores microglial autophagy, promotes amyloid- $\beta$  clearance and improves cognition in APP/PS1 mice. *Cell Death Dis.* 11.
- Hengartner M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* *Nature* 407, 770–776.
- Hou W.C., Lin R.D., Chen C.T., Lee M.H., 2005. Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition by active principles from *Uncaria rhynchophylla*. *J. Ethnopharmacol.* 100, 216–220.
- Inserra A., 2018. Hypothesis : The Psychedelic Ayahuasca Heals Traumatic Memories via a Sigma 1 Epigenetic-Mnemonic Process. 9, 1–13.
- Iwakura Y., Ishigame H., Saijo S., Nakae S., 2011. Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. *Immunity* 34, 149–162.
- Iyer S.S., Cheng G., 2012. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit. Rev. Immunol.* 32, 23–63.
- Jolivel V., Brun S., Binamé F., Benyounes J., Taleb O., Bagnard D., De Sèze J., Patten-Mensah C., Mensah-Nyagan A.G., 2021. Microglial Cell Morphology and Phagocytic Activity Are Critically Regulated by the Neurosteroid Allopregnanolone: A Possible Role in Neuroprotection. *Cells* 10.
- Kaasik H., Souza, R.C.Z., Zandonadi, F.S., Tófoli, L.F., Sussulini, A., 2021. Chemical Composition of Traditional and Analog Ayahuasca. *J. Psych. Drugs.* 53(1), 65-75.
- Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K.J.A., Dennery P.A., Forman H.J., Grisham M.B., Mann G.E., Moore K., Roberts L.J., Ischiropoulos H., 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1–6.

- Kawanishi K., Uhara Y., Hashimoto Y., 1982. Shihunine and Dihydroshihunine From *Banisteriopsis caapi*. *J. Nat. Prod.* 45, 637–639.
- Kawanokuchi J., Mizuno T., Takeuchi H., Kato H., Wang J., Mitsuma N., Suzumura A., 2006. Production of interferon- $\gamma$  by microglia. *Mult. Scler.* 12, 558–564.
- Kawanokuchi J., Shimizu K., Nitta A., Yamada K., Mizuno T., Takeuchi H., Suzumura A., 2008. Production and functions of IL-17 in microglia. *J. Neuroimmunol.* 194, 54–61.
- Kowalczyk A.P., Łozak A., Bachliński R., Duszyńska A., Sakowska J., Zjawiony J.K., 2015. Identification challenges in examination of commercial plant material of *Psychotria viridis*. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 72, 747–755.
- Labate B.C., Feeney K., 2012. Ayahuasca and the process of regulation in Brazil and internationally: Implications and challenges. *Int. J. Drug Policy* 23, 154–161.
- Lanaro R., Calemi D.B.A., Togni L.R., Costa, J.L., Yonamine, M., Cazenave, S.O.S., Linardi, A. 2015. Ritualistic Use of Ayahuasca versus Street Use of Similar Substances Seized by the Police: A Key Factor Involved in the Potential for Intoxications and Overdose? *J. Psychoactive Drugs.* 47, 37–41.
- Li Y., Sattler R., Yang E.J., Nunes A., Ayukawa Y., Akhtar S., Ji G., Zhang P.W., Rothstein J.D., 2011. Harmine, a natural beta-carboline alkaloid, upregulates astroglial glutamate transporter expression. *Neuropharmacology* 60, 1168–1175.
- Lien G., Chen C., Wang G., 2009. Comparison of electrospray ionization , atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations. *J. Chromatogr. A.* 1216, 956–966.
- Liu X., Li M., Tan S., Wang C., Fan S., 2017. Harmine is an inflammatory inhibitor through the suppression of NF- $\kappa$ B signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 489, 332–338.
- Luna L.E., 1984. The healing practices of a peruvian shaman. *J. Ethnopharmacol.* 11, 123–133.
- Margarida A., Félix A., Maria C., Bastos D.L., 2015. The hallucinogenic world of tryptamines : an updated review. *Arch. Toxicol.* 1151–1173.
- Masukawa M.Y., Nishide F., Galfano G.S., Tamura F., Shimizo M.K., Marcato M.P., Linardi A., 2017. An ontogenic study of the behavioral effects of chronic intermittent exposure to ayahuasca in mice. 50, 1–11.
- Mckenna D.J., D P., Callaway J.C., D C.S.G.M., 1998. 10 . The Scientific Investigation of Ayahuasca : A Review of Past and Current Research. *Rev. Lit. Arts Am.* 1, 65–76.
- McKenna D.J., Towers G.H.N., Abbott F., 1984. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: Tryptamine and  $\beta$ -carboline constituents of Ayahuasca. *J. Ethnopharmacol.* 10, 195–223.
- Melo Junior W., Filho J.D.S., Grisolia C.K., Caldas E.D., Pic-taylor A., 2016. Genotoxic evaluations in Wistar rats of the hallucinogenic plant extract ayahuasca. *Int. J. Phytomed.* 8(2),
- Morales-García J.A., De La Fuente Revenga M., Alonso-Gil S., Rodríguez-Franco M.I., Feilding A., Perez-Castillo A., Riba J., 2017. The alkaloids of *Banisteriopsis caapi*, the plant source of the Amazonian hallucinogen Ayahuasca, stimulate adult neurogenesis in vitro. *Sci. Rep.* 7, 1–13.

- da Motta, L.G., Morais J.A., Tavares A.C.A.M., Vianna L.M.S., Mortari, R., Amorim R.F.B., Carvalho, R.R., Paumgarten, F.J.R., Pic-Taylor, A., Caldas, E.D. 2018. Maternal and developmental toxicity of the hallucinogenic plant-based beverage ayahuasca in rats. *Reprod. Toxicol.* 77, 143–153.
- Niles A.L., Moravec R.A., Eric Hesselberth P., Scurria M.A., Daily W.J., Riss T.L., 2007. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal. Biochem.* 366, 197–206.
- Oliveira-Lima A.J., Santos R., Hollais A.W., Gerardi-Junior C.A., Baldaia M.A., Wu-Silva R., Yokoyama T.S., Costa J.L., Malpezzi-Marinho E.L.A., Ribeiro-Barbosa P.C., et al., 2015. Effects of ayahuasca on the development of ethanol-induced behavioral sensitization and on a post-sensitization treatment in mice. *Physiol. Behav.* 142, 28–36.
- Oliveira C.D.R., Moreira C.Q., De Sá L.R.M., Spinosa H.D.S., Yonamine M., 2010. Maternal and developmental toxicity of ayahuasca in wistar rats. *Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.* 89, 207–212.
- Orihuela R., McPherson C.A., Harry G.J., 2016. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.* 173, 649–665.
- Osório F. de L., Sanches R.F., Macedo L.R., dos Santos R.G., Maia-de-Oliveira J.P., Wichert-Ana L., de Araujo D.B., Riba J., Crippa J.A., Hallak J.E., 2015. Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a preliminary report. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 37, 13–20.
- Ott J., 1999. Pharmahuasca: Human pharmacology of oral DMT plus harmine. *J. Psychoactive Drugs* 31, 171–177.
- Packard K.A., Khan M.M., 2003. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. *Int. Immunopharmacol.* 3, 909–920.
- Palhano-Fontes F., Barreto D., Onias H., Andrade K.C., Novaes M., Pessoa J., Mota-Rolim S., Osorio F.L., Sanches R., Santos R. dos., et al., 2017. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomised placebo-controlled trial. *BioRxiv* 103531.
- Pic-Taylor A., da Motta L.G., de Morais J.A., Junior W.M., Santos A. de F.A., Campos L.A., Mortari M.R., von Zuben M.V., Caldas E.D., 2015. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rat. *Behav. Processes* 118, 102–110.
- Pinkley H.V., 1969. Plant admixtures to Ayahuasca the South American hallucinogenic drink. *Lloydia* 32, 305–313.
- Pires A.P.S., De Oliveira C.D.R., Moura S., Dörr F.A., Silva W.A.E., Yonamine M., 2009. Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and  $\beta$ -carboline alkaloids in Ayahuasca, an amazonian psychoactive plant beverage. *Phytochem. Anal.* 20, 149–153.
- Porto D.D., Henriques A.T., Fett-neto A.G., 2009. Bioactive Alkaloids from South American *Psychotria* and Related Species. *Open Bioac. Compounds J.* 2, 29–36.
- Prinsloo G., Papadi G., Hiben M.G., de Haan L., Louisse J., Beekmann K., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M., 2017. In vitro bioassays to evaluate beneficial and adverse health effects of botanicals: promises and pitfalls. *Drug Discov. Today* 22, 1187–1200.
- Probert L., 2015. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience* 302, 2–22.

- Rahimian R., Wakid M., O’Leary L.A., Mechawar N., 2021. The emerging tale of microglia in psychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 131, 1–29.
- Riba J., McIlhenny E.H., Valle M., Bouso J.C., Barker S.A., 2012. Metabolism and disposition of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids after oral administration of ayahuasca. *Drug Test. Anal.* 4, 610–616.
- Rivier L., Lindgren J.E., 1972. “Ayahuasca,” the South American hallucinogenic drink: An ethnobotanical and chemical investigation. *Econ. Bot.* 26, 101–129.
- Saleem S., 2021. Apoptosis, Autophagy, Necrosis and Their Multi Galore Crosstalk in Neurodegeneration. *Neuroscience* 469, 162–174.
- Samoylenko V., Rahman M.M., Tekwani B.L., Tripathi L.M., Wang Y.H., Khan S.I., Khan I.A., Miller L.S., Joshi V.C., Muhammad I., 2010. Banisteriopsis caapi, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson’s disease. *J. Ethnopharmacol.* 127, 357–67.
- Santillo M.F., Liu Y., Ferguson M., Vohra S.N., Wiesenfeld P.L., 2014. Inhibition of monoamine oxidase (MAO) by  $\beta$ -carboline and their interactions in live neuronal (PC12) and liver (HuH-7 and MH1C1) cells. *Toxicol. Vit.* 28, 403–410.
- Santos R.G. dos., 2010. The pharmacology of ayahuasca: a review. *Brasília Méd.* 47, 188–195.
- Schneider P., Weber-Fahr W., Schweinfurth N., Ho Y.J., Sartorius A., Spanagel R., Pawlak C.R., 2012. Central metabolite changes and activation of microglia after peripheral interleukin-2 challenge. *Brain. Behav. Immun.* 26, 277–283.
- Schwarz M.J., Houghton P.J., Rose S., Jenner P., Lees A.D., 2003. Activities of extract and constituents of *Banisteriopsis caapi* relevant to parkinsonism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 627–633.
- Schultes R.E., 1969. Hallucinogens of Plant Origin. *Science.* 163, 245–254
- Serrano-dueñas M., Cardozo-pelaez F., Sánchez-ramos J.R., 2001. Effects of *Banisteriopsis Caapi* Extract on Parkinson’S Disease. *Sci. Rev. Altern. Med.* 5, 129–134.
- Shemer A., Scheyltjens I., Frumer G.R., Kim J.S., Grozovski J., Ayanaw S., Dassa B., Van Hove H., Chappell-Maor L., Boura-Halfon S., et al., 2020. Interleukin-10 Prevents Pathological Microglia Hyperactivation following Peripheral Endotoxin Challenge. *Immunity* 53, 1033–1049.e7.
- Da Silva F.S., Silva E.A.S., De Sousa G.M., Maia-De-oliveira J.P., De Soares-Rachetti V.P., De Araujo D.B., Sousa M.B.C., Lobão-Soares B., Hallak J., Galvão-Coelho N.L., 2019. Acute effects of ayahuasca in a juvenile non-human primate model of depression. *Brazilian J. Psychiatry* 41, 280–288.
- Smith J.A., Das A., Ray S.K., Banik N.L., 2012. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Bull.* 87, 10–20.
- Smith R.L., Canton H., Barrett R.J., Sanders-Bush E., 1998. Agonist properties of N,N-dimethyltryptamine at serotonin 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 61, 323–330.
- Souza R.C.Z., Zandonadi F.S., Freitas D.P., Tófoli L.F.F., 2019. Validation of an analytical method for the determination of the main ayahuasca active compounds and application to real ayahuasca samples from Brazil. *J. Chromatogr. B* 1124, 197–203.



- Steinmann D., Ganzera M., 2011. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Recent advances on HPLC / MS in medicinal plant analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. 55, 744–757.
- Sternbach H., 1991. The serotonin syndrome. Am. J. Psychiatry 148, 705–713.
- Strassman R.J., Qualls C.R., 1994. Dose-Response Study of N,N-Dimethyltryptamine in Humans I. Neuroendocrine, Autonomic, and Cardiovascular Effects. Arch. Gen. Psychiatry 51, 85–97.
- Stylos E., Chatziathanasiadou M.V., Syriopoulou A., Tzakos A.G., 2016. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based bioavailability determination of the major classes of phytochemicals. J. Chromatogr. B. 1047, 15-38.
- Szot P., Franklin A., Figlewicz D.P., Beuca T.P., Bullock K., Hansen K., Banks W.A., Raskind M.A., Peskind E.R., 2017. Multiple lipopolysaccharide (LPS) injections alter interleukin 6 (IL-6), IL-7, IL-10 and IL-6 and IL-7 receptor mRNA in CNS and spleen. Neuroscience 355, 9–21.
- Taverne Y.J., Merkus D., Bogers A.J., Halliwell B., Duncker D.J., Lyons T.W., 2018. Reactive Oxygen Species: Radical Factors in the Evolution of Animal Life: A molecular timescale from Earth's earliest history to the rise of complex life. BioEssays 40, 1–9.
- Teixeira D.C., Martins M., Costa D.A., Baptista A.A., Garcia J., Silva D.A., Teixeira R., C M.M., Uso J.G., 2008. Uso E Manejo De Plantas Ritualísticas Na Comunidade Do Santo Daime Em Galdinópolis , Nova Friburgo / RJ , BRASIL. Ver. Ciênc. da Vida. 63–74.
- Thannickal V.J., Fanburg B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. 279.
- Thomas G., Lucas P., Capler N.R., Tupper K.W., Martin G., 2013. Ayahuasca-assisted therapy for addiction: results from a preliminary observational study in Canada. Curr. Drug Abuse Rev. 6, 30–42.
- Tittarelli R., Mannocchi G., Pantano F., Romolo F.S., 2015. Recreational Use, Analysis and Toxicity of Tryptamines. Curr. Neuropharmacol. 13, 26–46.
- Tupper K.W., 2008. The globalization of ayahuasca: Harm reduction or benefit maximization? Int. J. Drug Policy. 19, 297–303.
- Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C., 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. J. Immunol. Methods 243, 167–190.
- 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., et al., 2010. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. J. Ethnopharmacol. 128, 662-671.
- Fuchs Y., Steller H. 2016. Live to die another way. Physiol. Behav. 176, 139–148.
- Zhai X., Liu J., Ni A., Ye J., 2020. MiR-497 promotes microglia activation and proinflammatory cytokines production in chronic unpredictable stress-induced depression via targeting FGF2. J. Chem. Neuroanat. 110, 101872.
- Zhang H., Zhang T., Wang D., Jiang Y., Guo T., Zhang Y., Zhu F., Han K., Mu L., Wang G., 2020. IFN- $\gamma$  regulates the transformation of microglia into dendritic-like cells via the

ERK/c-myc signaling pathway during cerebral ischemia/reperfusion in mice. *Neurochem. Int.* 141, 104860.

Zhong Z., Tao Y., Yang H., 2015. Treatment with harmine ameliorates functional impairment and neuronal death following traumatic brain injury. *Mol. Med. Rep.* 12, 7985–7991.


Zhou W., Yang S., Wang P.G., 2017. Matrix effects and application of matrix effect factor. 9, 1839–1844.

Zhu M.Z., Chen G.L., Wu J.L., Li N, Liu Z.H., Guo M.Q., 2018. Recent development in mass spectrometry and its hyphenated techniques for the analysis of medicinal plants. *Phytochem. Anal.* 29, 365–374.

## **ANEXO I**

Article

# Biodiversity of $\beta$ -Carboline Profile of *Banisteriopsis caapi* and Ayahuasca, a Plant and a Brew with Neuropharmacological Potential

Beatriz Werneck Lopes Santos <sup>1</sup>, Regina Célia de Oliveira <sup>2</sup>, Julia Sonsin-Oliveira <sup>2</sup>, Christopher William Fagg <sup>3</sup>, José Beethoven Figueiredo Barbosa <sup>4,5</sup> and Eloisa Dutra Caldas <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Toxicology, Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia-DF 70910-900, Brazil; beatrizwerneck.bia@hotmail.com

<sup>2</sup> Department of Botany, Institute of Biology, University of Brasilia, Brasilia-DF 70910-900, Brazil; reginacelia@unb.br (R.C.d.O.); jsonsin@yahoo.com.br (J.S.-O.)

<sup>3</sup> Faculty of Ceilândia, University of Brasilia, Brasilia-DF 72220-275, Brazil; acaciafagg@gmail.com

<sup>4</sup> Department of Phytotechnology, Federal University of Roraima, Boa Vista-Roraima 69310-000, Brazil; vdiretorplantio\_pesquisa.dg@udv.org.br

<sup>5</sup> Centro Espírita Beneficente União do Vegetal (UDV), Brasília-DF 70040-904, Brazil

\* Correspondence: eloisa@unb.br

Received: 29 May 2020; Accepted: 20 June 2020; Published: 9 July 2020



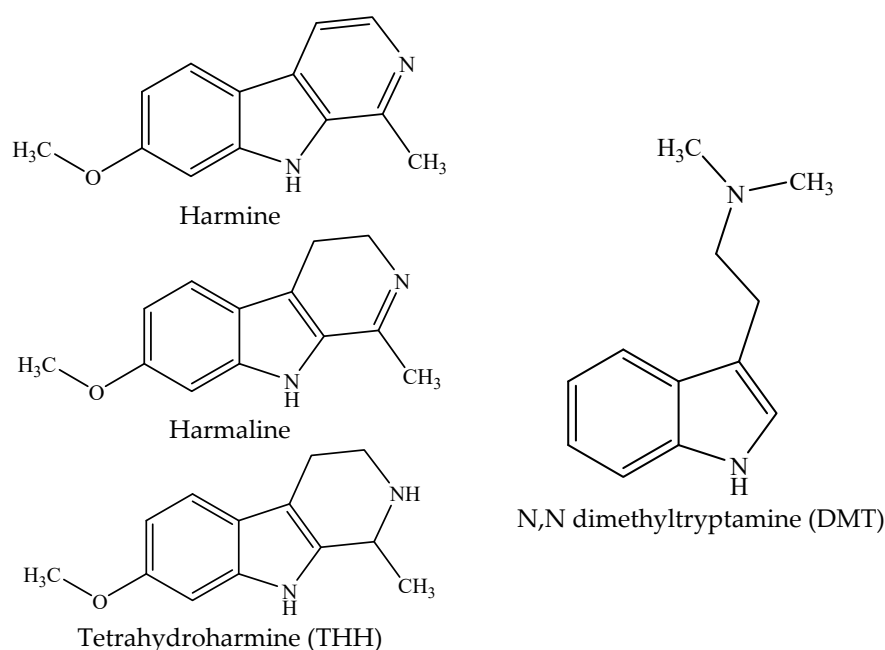
**Abstract:** Ayahuasca is a psychoactive infusion with a large pharmacological application normally prepared with *Banisteriopsis caapi*, which contains the monoamine oxidase inhibitors  $\beta$ -carbolines, and *Psychotria viridis*, which contains the serotonin receptor agonist N,N dimethyltryptamine (DMT). The objectives of this study were to investigate the chemical profile of *B. caapi* and of ayahuasca collected in various Brazilian regions. In total, 176 plant lianas, of which 159 *B. caapi* and 33 ayahuasca samples were analyzed. Dried liana samples were powdered, extracted with methanol, diluted, and analyzed by LC-MS/MS. Ayahuasca samples were diluted and analyzed. Mean concentrations in *B. caapi* were 4.79 mg/g harmine, 0.451 mg/g harmaline, and 2.18 mg/g tetrahydroharmine (THH), with a high variability among the samples (RSD from 78.9 to 170%). Native *B. caapi* samples showed significantly higher harmine concentrations than cultivated ones, and samples from the Federal District/Goiás had higher THH content than those collected in the State of Acre. The other Malpighiaceae samples did not contain  $\beta$ -carbolines, except for one *D. pubipetala* sample. Concentrations in ayahuasca samples ranged from 0.109 to 7.11 mg/mL harmine, 0.012 to 0.945 mg/mL harmaline, 0.09 to 3.05 mg/mL THH, and 0.10 to 3.12 mg/mL DMT. The analysis of paired ayahuasca/*B. caapi* confirmed that harmine is reduced to harmaline and to THH during the brew preparation. This is the largest study conducted with Malpighiaceae samples and showed a large variability in the main  $\beta$ -carbolines present in *B. caapi*. This biodiversity is a challenge for standardization of the material used in ethnopharmacological studies of *B. caapi* and ayahuasca.

**Keywords:**  $\beta$ -carbolines; DMT; *Banisteriopsis caapi*; ayahuasca; Brazil

## 1. Introduction

Ayahuasca is a psychotropic beverage traditionally used in religious rituals and as medicine among indigenous communities from the Amazonian region, a use that has expanded since the 1970s to all Brazilian regions and more recently to other countries [1,2]. The beverage is usually prepared by the decoction of the liana *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C.V. Morton and *Psychotria viridis* Ruiz & Pav [3,4] and may be called by other names, such as vegetal and Daimé [1].

*Banisteriopsis caapi* contains  $\beta$ -carboline alkaloids, mainly harmine, harmaline, and tetrahydroharmine (THH) (Figure 1), which are inhibitors of monoamine oxidases (MAO) [5,6]. *Psychotria viridis* has the hallucinogenic indole N,N-dimethyltryptamine (DMT; Figure 1), a serotonin agonist that causes intense cognitive and perceptive modifications when administered parenterally in humans [7]. When taken orally, DMT is oxidized by MAO, a process that is prevented by the presence of  $\beta$ -carbolines after ayahuasca ingestion, allowing the DMT to reach the serotonergic receptors in the nervous system causing the psychotropic effects of the beverage [4,5,8,9]. Harmine and harmaline are also shown to be hallucinogenic in humans, probably due to their interaction with serotonin, dopamine, benzodiazepine, imidazoline, and opiate receptors, acting as either agonists or antagonists [10–12]. The activity of THH in ayahuasca is apparently more a function of its inhibition of serotonin uptake than of its action as a MAO inhibitor [13].



**Figure 1.** Chemical structures of the  $\beta$ -carbolines harmine, harmaline, and tetrahydroharmine (THH) present in *Banisteriopsis caapi* and ayahuasca and of N,N-dimethyltryptamine (DMT), present in ayahuasca.

The therapeutic potential of ayahuasca, *B. caapi*, and its components, mainly harmine, was widely explored in the last 20 years [14]. The  $\beta$ -carbolines present in *B. caapi* were shown to stimulate neurogenesis in vitro and the modulation of brain plasticity could contribute to the antidepressant effects of ayahuasca [15] and harmine [16,17]. *B. caapi* extracts showed to act against neurodegenerative diseases, such as Parkinson’s disease [18–21]. Furthermore, various studies have investigated the therapeutic potential of ayahuasca for depression and addiction in experimental animals [22–25] and humans [26–28].

The species *B. caapi* is an Amazon native giant liana from the Malpighiaceae family [4,29,30], and ayahuasca brewers recognize different “types” of liana. Langdon [31] has documented at least 18 types of *B. caapi* by the Siona Indigenous people, highlighting features such as length and width of the stem, size and shape of the leaves, and the presence or absence of flowers. Schultes et al. [32] remarked that Amazonian natives acknowledged at least 30 different types of *B. caapi*, which all have different uses in their traditional medicine. Peruvian brewers (ayahuasqueros) claim to distinguish as many as 10 types of *B. caapi* lianas [4].

Some studies have investigated the phytochemistry of the species used in the preparation of the ayahuasca beverage; however, only few samples were analyzed [4,21,32–34], which limits the possibility to capture the diversity of the chemical profile of the plants. The aim of this study was to make

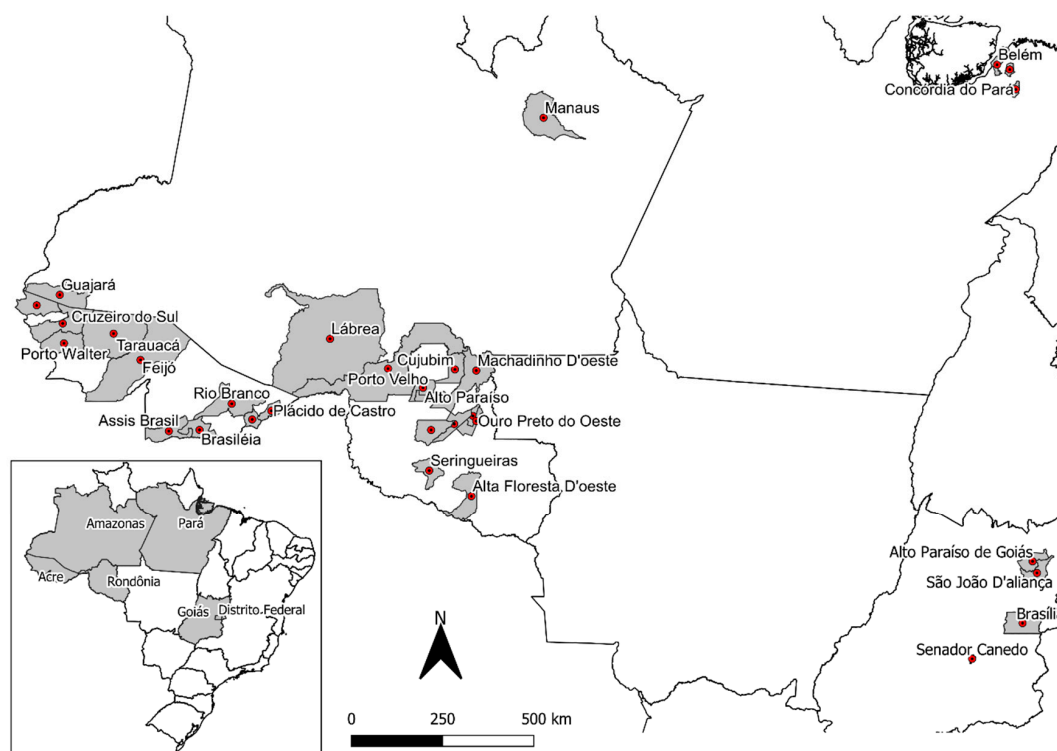
a thorough chemical investigation of the  $\beta$ -carbolines harmine, harmaline, and tetrahydroharmine levels present in *B. caapi* and in ayahuasca brew in samples collected from various regions in Brazil. Additionally, other plants used in the preparation of the brew were also analyzed, and the levels of DMT were investigated in the brew.

## 2. Material and Methods

### 2.1. *Banisteriopsis* spp., *Diplopterys pubipetala*, and Ayahuasca Brew Samples

A total of 176 liana samples were collected, 159 of *B. caapi* and 17 samples of different species that are also used in ayahuasca preparations by some groups (Schultes et al., 2001): four samples of *B. laevifolia* (A.Juss.) B. Gates, one of *B. megaphylla* (A.Juss.) B.Gates, one of *B. muricata* (Cav.) Cuatrec., one of *B. oxyclada* (A.Juss.) B. Gates, one of *B. variabilis* B.Gates, one of *B. gardneriana* (A.Juss.) W.R.Anderson & B.Gates, three of uncharacterized *Banisteriopsis* spp., and five of *Diplopterys pubipetala* (A.Juss.) W.R.Anderson & C.C.Davis.

Liana samples were collected from 2016 to 2019 in different states in the northern region of Brazil (Acre (AC), Amazonas (AM), Rondônia (RO), and Pará (PA)) and in the mid-western region (Federal District (DF) and Goiás (GO)), where the plants are cultivated (Figure 2). The *B. caapi* samples were classified in four main groups according to botanical characteristics, which were described by the collectors and ayahuasca users: tucunacá, amarelinho, and ourinho (without swollen nodes) and caupuri (characterized by the presence of swollen nodes) (Figure 3). Additionally, seven samples with other descriptions that could be referred to as hybrids were also provided: two samples of caupuri without nodes, one of pajezinho, two tucunacá with nodes, one caboquinho, and one quebrador. Plant samples are stored in the UB (University of Brasilia) herbarium and the UBw wood collection of the University of Brasilia, and detailed information of each sample is shown in Table S1 (Supplementary Materials).



**Figure 2.** Collection points of *Banisteriopsis caapi* and other species in Brazil.



**Figure 3.** Different *Banisteriopsis caapi* types used in ayahuasca preparation: (A) tucunacá; (B) caupuri (with swollen nodes); (C) fresh amarelinho; (D) amarelinho some days after harvesting. Images taken by the authors and collaborators.

A total of 33 ayahuasca brew samples were provided for analysis: five samples by the Centro Espírita Beneficente União do Vegetal group (UDV), one sample by the Igreja do Culto Eclético da Fluente Luz Universal (ICEFLU), and 27 samples by different groups that were generally referred to in this study as Daime. The beverages were prepared from 2017 to 2020 in the states of Acre and Goiás and the Federal District. Samples were frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  upon arriving at the laboratory until analyzed. Table S2 (Supplementary Materials) shows detailed information of each sample.

This work was registered at the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen) from the Brazilian Ministry of Environment (Protocols A2753ED and A320330).

## 2.2. Chemicals and Reagents

HPLC-grade acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany); formic acid was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); ultrapure water obtained through a Milli-Q purification system and the syringe filters used were Millex<sup>TM</sup>, both from Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA). Standards of harmine (98% purity) and harmaline (95% purity) were acquired from Sigma-Aldrich and tetrahydroharmine from LGC (Luckenwalde, Germany; 95% purity). Stock solutions of each standard were prepared at a concentration of 1 mg/mL, from which working solutions at 100, 10, and 1  $\mu\text{g/mL}$  were prepared.

## 2.3. Synthesis of DMT and THH, Identification and Purity Assessment

DMT was synthesized according to Qu et al. [35] with adaptations. In summary, tryptamine (6.25 mmol) was added to a mixture of methanol, acetic acid, and sodium cyanoborohydride (100 mL:1.5 mL:12 mmol), and at  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  under a nitrogen atmosphere, a methanol solution of formaldehyde (16.4 mmol) was added dropwise for 90 min. The resulting solution was stirred for 18 h and then

alkalinized with sodium carbonate at 2 mol/L until a pH between 8 and 9 was reached. The product was extracted with ethyl acetate and purified through a silica chromatographic column, which yielded a yellowish product.

When this work was initiated, there was no commercial THH available in the market, and the compound was synthesized following a previously described procedure [36] with some modifications. In summary, a methanolic solution of sodium borohydride (91.2 mg, 2.4 mmol) at 0 °C was added with harmaline (429 mg, 2 mmol). After two hours of reaction, the solution was acidified with 1 mol/L hydrochloric acid and then alkalinized with 5% sodium hydroxide until pH 9.0. The product was extracted with ethyl acetate and then recrystallized with acetone, which yielded white needle-like crystals. The structures of the DMT and THH were confirmed and their purity determined via <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR experiments in a 600 MHz NMR spectrometer (Bruker®, Billerica, MA, USA). The exact masses of the substances were determined by high resolution mass spectrometry with direct injection of a 1 µg/mL methanol solution, with 0.1% formic acid added, in a QTOF spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA). Spectrometric data are reported in the Supplementary Materials.

The purity of the synthesized THH was further confirmed against an analytical standard curve prepared with the analytical LGC standard (95% purity). Seven replicates of a 200 ng/mL solution of the synthesized compound were analyzed, and the results showed that THH was at least 99% pure.

#### 2.4. Sample Preparation

Liana samples were dried at room temperature for seven days, powdered by a Wiley mill (Macro Star FT-60, Fortinox, Piracicaba, SP, Brazil), sieved through a 500 µm screen and kept in a plastic bag at room temperature until analysis. Next, 100 mg of each sample were sonicated in 2 mL of methanol and macerated for 24 h at room temperature. The extract was filtered in a 0.45 µm syringe filter and diluted 750-fold with acetonitrile (ACN) and water (1:1). The dilution was adjusted to 100-fold or 10-fold if the sample concentration did not fit within the linear range of the standard analytical curve. Ayahuasca samples were thawed and diluted 750-fold in purified water. In both cases, 1 µL was injected in the HPLC-MS/MS for analyte quantification.

#### 2.5. Analysis of the β-carbolines and DMT by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

LC-MS/MS analysis was performed using a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled to a 4000 Qtrap triple-quadrupole mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA), fitted with a Turbo Ion Spray electrospray ionization source (ESI). System operation and data acquisition were controlled by Analyst® (V 1.5.2) software (Sciex). The analyte-dependent MS/MS parameters were optimized by direct infusion of a solution containing all the analytes (10 ng/mL), and the analysis was performed in multiple reaction monitoring (MRM) positive mode. Declustering potential, collision energy, and collision cell exit potential were optimized for the three most abundant transitions for each analyte, and the two most abundant transitions were used as quantifier and qualifier transitions. Ion source parameters were optimized using flow injection analysis of a 5 ng/mL harmaline, and the optimal conditions were: entrance potential at 10 V, ion source at 750 °C, ion source gas 1 and 2 at 50 and 40 psi, ion spray voltage at 4000 V, curtain gas at 12 psi, and collision gas at high. Chromatographic separation was performed with a Luna C18 analytical column (150 × 2 mm, 5 µm) preceded by a C18 security guard cartridge (4.0 × 3.0 mm, 5 µm), both from Phenomenex® (Torrance, CA, USA). The column was kept at 40 °C at a flow rate of 0.4 mL/min, and the injection volume was 1 µL. The mobile phase consisted of 85% water (A) and 15% ACN (B), both added with 0.1% formic acid (12 min run). Table S3 (Supplementary Materials) shows the optimized ESI parameters for all analytes.

The method was validated using a *B. cf. muricata* liana sample that did not contain β-carbolines, as shown by LC-MS/MS analysis. Selectivity was demonstrated by the absence of any interferences of a *B. cf. muricata* extract in the retention time of the analytes. The matrix effect, estimated by the ratio between the average instrument response (areas) of matrix matched standards and neat solution



standards (ACN:H<sub>2</sub>O, 1:1), ranged from 2.87 to 6.47% and was considered irrelevant. Furthermore, slopes of the matrix matched, and neat solution standard curves were also not significantly different ( $p > 0.05$ ). The analytical standard curves, prepared in ACN:H<sub>2</sub>O (1:1), showed homoscedastic behavior for all analytes and were linear, with R<sup>2</sup> values higher than 0.99. Percent recoveries of the analytes were evaluated by fortifying a sample of *B. muricata* at three different levels (0.75 to 1.5 mg/g) with three to five replicates at each level, and repeatability (same day experiment) and intermediate precision (two different days experiment) were expressed as relative standard deviations of the replicates (%RSD). The results of the validation parameters are shown in Table S4 (Supplementary Materials). The limit of quantification (LOQ) of the method, defined as the lowest level that could be quantified with acceptable recovery (80 to 110%) and precision (RSD < 20%) [37], ranged from 0.0005 mg/mL for harmaline in ayahuasca to 0.75 mg/g for harmine and THH in plant material (Table S4). The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration that gave a signal-to-noise ratio of three in the LC-MS/MS equipment [38], was 0.0015, 0.0075, and 0.003 mg/g for harmine, harmaline, and THH, respectively, in the plant and 0.00008 and 0.0004 mg/mL for harmine and harmaline, respectively, and 0.0002 mg/mL for THH and DMT in ayahuasca samples.

## 2.6. Statistical Analysis

Concentration data were analyzed using GraphPad Prism 5 (12 March 2007) by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. Values are means  $\pm$  standard error (SEM). In any case, a difference was significant when  $p$  was less than 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Quantification of $\beta$ -carbolines in *Banisteriopsis* spp. and *Diplopterys Pubipetala*

Table 1 summarizes the  $\beta$ -carboline results for the 159 *B. caapi* samples investigated in this study, and the levels for each sample are shown in Table S1 (Supplementary Materials). The mean levels ranged from 0.451 mg/g for harmaline to 4.79 mg/g for harmine, with THH levels showing the highest variability among the samples (170%). Nine *B. caapi* samples (5.7%) did not contain any of the investigated  $\beta$ -carbolines (<LOD), and no harmine was found in one sample that had the other  $\beta$ -carbolines (Table S1). In most *B. caapi* samples (88.2%), harmine was present at the highest concentration; eight samples only contained harmine. THH concentrations were higher in 17 samples (11.3%), and harmaline was the analyte with the lowest concentration in most samples (147 samples; 94.7%). The mean level for total  $\beta$ -carbolines levels (harmine + harmaline + THH) was 7.4 mg/g, with an RSD of 40.4% (Table 1). The highest ratios between the  $\beta$ -carbolines in the 141 *B. caapi* samples that contained all compounds (>LOD) were found for THH/harmaline (mean ratio of 5.6), and the highest variability among the ratios was found for THH/harmine (RSD of 331%).

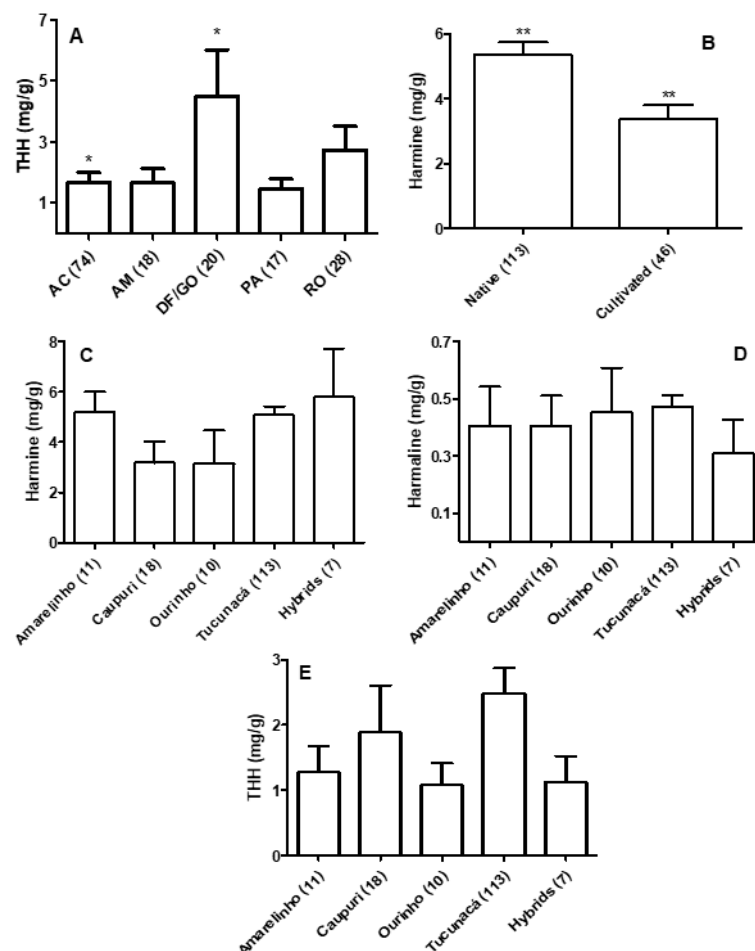
**Table 1.** Levels of alkaloids found in *B. caapi* and ayahuasca samples collected in various Brazilian regions from 2016 to 2020.

Compound	<i>Banisteriopsis caapi</i> (N = 159)		Ayahuasca (N = 33)	
	Range (Mean)	RSD, %	Range (Mean)	RSD, %
Harmine	<LOD-18.27 mg/g (4.79) <sup>a</sup>	78.9	0.109–7.11 mg/mL (1.28)	99.1
Harmaline	<LOD-2.08 mg/g (0.451) <sup>a</sup>	92.4	0.012–0.945 mg/mL (0.195)	102
THH	<LOD-29.04 mg/g (2.18) <sup>a</sup>	170	0.09–3.05 mg/mL (1.16)	60.3
DMT	-	-	0.10 <sup>b</sup> –3.12 mg/mL (1.08)	63.8
Total $\beta$ -carbolines	<LOD-32.1 mg/g (7.4) <sup>a</sup>	40.4	0.21–11.1 mg/mL (2.65)	76.2
Harmaline/harmine	0.006–3.0 (0.15) <sup>c</sup>	187	0.04–0.27 (0.155)	39.4
THH/harmaline	0.55–109 (5.6) <sup>c</sup>	198	2.0–17.0 (8.4)	41.1
THH/harmine	0.01–38 (1.2) <sup>c</sup>	331	0.35–3.4 (1.2)	54.2

<sup>a</sup> samples < limit of detection (LOD) were considered as half the LOD (0.0015, 0.0075, and 0.003 mg/g for harmine, harmaline, and THH, respectively); <sup>b</sup> does not include one ayahuasca sample that did not contain *P. viridis*; <sup>c</sup> only samples with detected levels of all  $\beta$ -carbolines (N = 141). RSD = relative standard deviation.

Of the 17 samples from other species used to prepare the ayahuasca beverage and analyzed in this study, only one *D. pubipetala* sample contained  $\beta$ -carbolines (0.16 mg/g harmine, 0.046 mg/g harmaline, and 1.04 mg/g THH; Table S1).

The *B. caapi* samples analyzed in this study were grouped according to place of growth, if the plants were cultivated or native, collecting period (wet season or dry season), presence or absence of swollen stem nodes, and the type and thickness (about 5 or 20 mm) of the liana. In general, THH mean levels were higher in samples collected in the Federal District and Goiás state ( $4.48 \text{ mg/g} \pm 1.53$ ) when compared with the Amazonian states, but significance was only found with the levels found in plants collected in the state of Acre ( $1.67 \text{ mg/g} \pm 0.38$ ; Figure 4A). The ratios between THH and the other two  $\beta$ -carbolines were also significantly different in these groups (data not shown). Harmine mean levels in native plants ( $5.315 \text{ mg/g} \pm 0.37$ ) were significantly higher than the mean levels found in cultivated plants ( $3.43 \text{ mg/g} \pm 0.43$ ; Figure 4B), and the mean ratios between harmine and the other two  $\beta$ -carbolines were also significantly higher in native samples (data not shown). No significant differences were found in the  $\beta$ -carboline mean levels among the different types of *B. caapi* (Figure 4C–E). The mean level of total  $\beta$ -carbolines in caupuri samples (5.48 mg/g) was lower than in tucunacá samples (8.03 mg/g), although this difference was not significant. No other significant differences were found for the other investigated parameters and analytes (data not shown).



**Figure 4.** (A): THH levels in *Banisteriopsis caapi* samples collected in different regions; two samples collected in the State of Minas Gerais were not included. (B): Harmine levels in native and cultivated *B. caapi* samples. (C–E):  $\beta$ -carboline levels in different *B. caapi* samples. Hybrids include plants described as tucunacá with nodes (2 samples), caupuri without nodes (2 samples), pajezinho (1 sample), caboquinho (1 sample), and quebrador (1 sample). Levels are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

### 3.2. Quantification of $\beta$ -carbolines and DMT in Ayahuasca Brew Samples

Table 1 also shows the summary of the alkaloid levels found in the 33 analyzed ayahuasca samples; the results for each sample are shown in Table S2 (Supplementary Materials). Harmaline was found at the lowest concentration (mean of 0.195 mg/mL), and the mean levels of the other alkaloids ranged from 1.08 mg/mL for DMT to 1.28 mg/mL for harmine. The highest variabilities found among the samples were for harmine and harmaline (about 100%). One sample prepared by a Daime group had the highest level of all components (3.12 mg/L DMT, 7.11 mg/L harmine, 0.945 mg/mL harmine, and 3.05 mg/mL THH), and the sample prepared only with *B. caapi* did not contain DMT (Table S2). The variabilities of the ratios among the  $\beta$ -carbolines ranged from 39.4 to 54.2 (Table 1).

Six ayahuasca samples in this study were prepared using *B. caapi* which sample were also analyzed. The ratios of the  $\beta$ -carbolines were calculated for the ayahuasca samples and for the *B. caapi* extracts, and the results are shown in Table 2. In all samples, the harmaline/harmine ratios were higher in the brew compared to the plant (1.3- to 2.2-fold higher). The THH/harmaline and THH/harmine ratios were higher in the brew in four cases (1 to 4), reaching 10.9- and 6.7-fold higherratios, respectively, in case 3 (Table 2).

**Table 2.**  $\beta$ -carboline ratios found in six ayahuasca samples and in the respective samples of *B. caapi* used in the preparation.

Sample	Ratio <sup>a</sup>		
	Harmaline/Harmine	THH/Harmaline	THH/Harmine
Ayahuasca 1	0.255	2.09	8.19
<i>B. caapi</i> 1	0.174	0.518	2.99
Ayahuasca 2	0.201	1.63	8.08
<i>B. caapi</i> 2	0.153	0.505	3.30
Ayahuasca 3	0.068	0.414	6.12
<i>B. caapi</i> 3	0.041	0.038	0.912
Ayahuasca 4	0.188	1.97	10.4
<i>B. caapi</i> 4	0.087	0.187	2.14
Ayahuasca 5	0.125	1.64	13.0
<i>B. caapi</i> 5	0.094	5.34	56.9
Ayahuasca 6	0.227	1.43	6.27
<i>B. caapi</i> 6	0.129	4.52	35.1

<sup>a</sup> the ratio of the  $\beta$ -carboline in *B. caapi* was estimated from the concentrations in the extract.

## 4. Discussion

In spite of the globalization of ayahuasca use and the substantial number of studies showing a broad spectrum of therapeutic potential of ayahuasca, *B. caapi*, and  $\beta$ -carbolines [13–28,39], there are very few studies that examined the chemical profile of the beverage and the plant obtained from different sources. The first studies that investigated the levels of  $\beta$ -carbolines in *B. caapi* were conducted in the late 1960s to the 1980s and analyzed 6–7 plant samples collected in the Peruvian Amazon [4,33,34,40]. Schultes et al. [40] analyzed the original material collected by Richard Spruce more than a century before (in 1852) by GC-MS, and the only  $\beta$ -carboline detected in the sample was harmine (at 4 mg/g), which was within the range of the levels found in this study.

The levels of  $\beta$ -carbolines found in the 159 samples of *B. caapi* analyzed in the present study showed a large variability, which was expected as different plant types, native or cultivated, collected during a four-year period in different regions of Brazil were analyzed. The variability among the samples for the total  $\beta$ -carbolines levels was much smaller (40%), indicating that the main differences are in the biotransformation rate among the plants, which affects the individual levels. In the study with the greatest number of *B. caapi* samples analyzed published in the literature (33 samples) [34],

the concentration variabilities of  $\beta$ -carboline were smaller compared to the present study (RSDs of 41 to 79%), probably due to the controlled sampling protocol applied in the study (all samples collected between 06:00 to 9:00 a.m. on a single October day in 22 UDV sites). The authors found similar mean concentrations for harmine and harmaline compared to the present study (~4.8 and 0.46 mg/g, respectively), but about half of that for THH (1.0 mg/g).

Samples of native plants analyzed in the present study showed significantly higher harmine content when compared to the cultivated ones, but liana samples of plants cultivated in the Federal District and the state of Goiás (DF/GO) showed a higher THH content when compared with plants from AC, which are all native, except one sample. Various factors are involved in the regulation of plant biosynthetic pathways. We may speculate that the warm and humid forest environment probably accelerates the initiation of  $\beta$ -carboline biosynthesis, and that the cultivated seasonally dry conditions favor the metabolization (reduction) of harmine to THH—a hypothesis that still needs to be further investigated. Furthermore, solar incidence is much lower in native specimens, as the high density of the tropical forest prevents sun rays from reaching the plants beneath and may affect  $\beta$ -carboline biosynthesis. Additionally, DF and GO are both located in the Brazilian savanna biome (cerrado), which is characterized by acidic soil with high aluminum levels and lower organic matter content compared to Amazonian soil [41], which could have an effect on nutrient uptake by the plant and  $\beta$ -carboline biosynthesis. Indeed, the impact of different environmental conditions on the  $\beta$ -carboline biosynthetic rates most likely explain the large variability found in the ratios between the compounds among the *B. caapi* samples, reaching 331% for THH/harmine.

Callaway et al. [34] found slightly, not significantly, higher levels of the  $\beta$ -carbolines in caupuri compared to tucunacá samples, a trend that was not confirmed in the present study. In fact, the mean of total  $\beta$ -carbolines in caupuri samples was lower than in tucunacá samples, although this difference was not significant. Brazilian ayahuasca users describe various subjective and physiological effects when the beverage is prepared with different *B. caapi* types, particularly with caupuri, which is blamed to cause gastrointestinal discomfort. The Peruvian ayahuasqueros also described different physiological effects after drinking beverages prepared with the different types [4], a point that was also mentioned by other authors [34,42]. Most likely, the different effects of ayahuasca observed by the users go beyond the investigated alkaloid profile of the *B. caapi* used and may also be affected by other chemicals in the plants and by the preparation process of the beverage, which will be discussed later in the paper.

Analysis of the 33 ayahuasca samples showed the mean levels of the alkaloids ranging from 0.195 mg/mL for harmaline to 1.28 mg/mL for harmine, with a large variability among the samples for each compound. As expected, one sample prepared only with *B. caapi* did not contain DMT. The traditional use of ayahuasca may not include DMT-containing plants, such as *P. viridis*, as this alkaloid is not the only substance responsible for the effects observed after ayahuasca ingestion [43]. As MAO inhibitors, the  $\beta$ -carbolines affect the levels of neurotransmitters in the central nervous system, including dopamine and serotonin [10–12,44], leading to the psychoactive effects sought by the users of *B. caapi*-only beverages.

Most of the studies that investigated the levels of alkaloids in ayahuasca in the last 20 years analyzed fewer than 10 samples, except for Souza et al. (38 samples) [45] and Callaway (29 samples) [43]. Pires et al. [46] analyzed by GC-NPD eight ayahuasca samples prepared by a religious group settled in a Brazilian city and found harmaline concentrations higher than harmine and THH in all samples, which contradicts the results of the present and all other studies conducted with both ayahuasca and *B. caapi* [4,21,22,24,25,43,45,47–49].

The highest DMT level found in the ayahuasca samples (3.12 mg/mL in a Daime preparation) was lower than the levels found in two samples provided by the Barquinha and Santo Daime groups and analyzed by Callaway (12.7 and 14.2 mg/mL, respectively) [43], but much higher than the highest level found by Souza et al. [36] in ayahuasca samples provided by UDV (0.34 mg/mL). These differences reflect the different proportions of *P. viridis* and *B. caapi* used in the preparation of the beverage. Indeed, *P. viridis* accounts for 7 to 10% of the plant material in the UDV, while the proportion of *P. viridis* used

by the ICEFLU group ranges normally from 17 to 20% (personal communication; Derick Carniello Rezende). Furthermore, the levels of DMT in *P. viridis* also vary substantially among plant specimens and can fluctuate during the day [34].

In the study by Callaway [43], the highest harmine and THH levels were found in ayahuasca samples from the indigenous Shuar people in Ecuador (23–24 mg/mL), but the THH/harmine ratio was similar among all the samples (0.8–1.1). In the present study, this ratio was 1.2 on average but with a much larger variation among the samples (RSD of 331%). Most samples showed a higher concentration of THH when compared to harmine and harmaline, whereas this distribution was the opposite in *B. caapi* samples. This fact could be explained by the possible conversion of harmine to THH (harmine→harmaline→THH; see the structures in Figure 1) through a reduction reaction during ayahuasca preparation, which involves boiling for several hours. Indeed, the harmaline/harmine ratios were higher in all six ayahuasca samples compared to the ratios found in the *B. caapi* used to prepare them, and the THH/harmaline and THH/harmine ratios were also higher in the brew in four samples. The decoction process varies widely among the ayahuasca groups and the ayahuasqueros who prepare it. In general, the plants are boiled in UDV for about 2.5 h, followed by a concentration step of about 3 h before the decoction is ready to be used. This last step varies substantially among other ayahuasca groups, with the liquid being concentrated from 2X up to 9X the initial water volume and can achieve a viscous and sweet material, called Daime honey [50]. These differences in the ayahuasca preparation may indeed impact the  $\beta$ -carboline ratios, although a clear pattern could not be seen in the seven Daime honey samples analyzed in this study (Table S2). A recent study showed that THH is stable in ayahuasca samples for about 9 days at 37 °C, simulating an extreme transport and storage situation, while harmine and harmaline concentrations vary under the same conditions [51].

The physiological effects of ayahuasca and the pharmacokinetics of its components were investigated using a chemically characterized brew [5,13]. However, the studies did not compare the effects with different chemical profiles. Furthermore, the impact of the different  $\beta$ -carboline concentrations and ratios on the psychological and subjective effects felt by ayahuasca users may be difficult to access. It is quite common that individuals who took the same brew describe different effects, which are recognized as mystical and spiritual experiences [50].

The variability of the chemical profile of the main alkaloids in ayahuasca and *B. caapi* is extremely important and should be considered when interpreting different biological effects found with different materials in animal studies. Da Motta et al. [48] and Oliveira et al. [49] evaluated the developmental effects of ayahuasca on pregnant rats using the same protocol and similar doses, but the results obtained were very different, with the first study showing more important toxicity, including maternal and embryo deaths. The sources of the brew were different in the studies (UDV and Daime, respectively), with different  $\beta$ -carboline and DMT levels and ratios, which probably influenced the observed effects. Furthermore, other components that might be present in the beverages used in the studies could interact and play a role in increasing or decreasing the toxicity. Schwarz et al. [19] tested both *B. caapi* extracts and isolated harmine in MAO inhibition and dopamine release and found the extract to be far more active than the equivalent dose of harmine, suggesting the possibility of synergism among the active compounds present in the plant.

One limitation of this study is that only the main  $\beta$ -carbolines (harmine, harmaline, and THH) were investigated in the *B. caapi* and ayahuasca samples, although various studies report the presence of other harmala alkaloids in the liana and in the brew [11,21,47]. This might have limited the detection of differences in the chemical profile among the various types of *B. caapi* that could explain some of the subjective and physiological characteristics among the types described by ayahuasca users.

## 5. Conclusions

To the best of our knowledge, this is the largest study that analyzed the profile of  $\beta$ -carbolines in native and cultivated *B. caapi* individuals, and the first to report the presence of  $\beta$ -carbolines in *Diplopterys pubipetala*. This large sampling allowed to capture the wide variability of  $\beta$ -carboline

profiles in the liana samples, which reflects all the factors involved in the biosynthesis of these compounds under different environmental conditions and organic and inorganic composition of the soil. The analysis of paired ayahuasca/*B. caapi* samples confirmed a previous hypothesis that harmine is reduced to harmaline and further to THH during the preparation of the brew. The data generated in this study should be considered when standardizing plant material for ethnopharmacological uses of *B. caapi* extracts and of ayahuasca. Further studies should be conducted to analyze the other harmala alkaloids in the samples and to correlate the chemical profile of the different types/varieties with the genetic profiles of the plant.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2223-7747/9/7/870/s1>, Table S1: Samples of *Banisteriopsis* ssp. and *Diplopterys pubipetala* and  $\beta$ -carboline concentrations. Table S2: Ayahuasca brew samples and alkaloid concentrations. Table S3: Optimized ESI+ MS/MS parameters, chromatographic retention times and ion ratios in the LC-MS/MS method for the target analytes in *B. caapi* extracts and ayahuasca. Table S4: Recovery and repeatability ( $n = 3$  for DMT and  $n = 5$  for the others) and intermediate precision ( $n = 8$ ) obtained for the analysis of Malpighiaceae extracts and ayahuasca samples at three concentration levels.

**Author Contributions:** B.W.L.S. collected samples, performed the chemical analysis, processed the data and prepared the first draft of the manuscript; R.C.d.O., J.S.-O., C.W.F. and J.B.F.B. collected samples and reviewed the manuscript; E.D.C. coordinated the study, critically revised the data and reviewed the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was financially supported by the Federal District Research Foundation (FAP-DF; Grants 0193000881/2015 and 0193.001773/2017. R.C. Oliveira and ED Caldas received Research Productivity Fellowships from Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ), and BWL Santos received a Ph.D Scholarship from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

**Acknowledgments:** This study had the support of the Academic and Scientific Coordination of the Centro Espírita Beneficente União do Vegetal. The authors thank all the other individuals who kindly provided Malpighiaceae liana and ayahuasca brew samples for the conduction of this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. MacRae, E. The ritual use of ayahuasca by three Brazilian religions. In *Drug Use and Cultural Contexts' Beyond the West': Tradition, Change and Post-Colonialism*; Coomber, R., South, N., Eds.; Free Association Books: London, UK, 2004; pp. 27–45.
2. Labate, B.C.; Assis, G.L. A critical review of the literature on the diaspora of Brazilian ayahuasca religions. In *The Expanding World Ayahuasca Diaspora*, 1st ed.; Labate, B., Cavnar, C., Eds.; Routledge: New York, NY, USA, 2018; pp. 1–21.
3. Luna, L.E. The healing practices of a peruvian shaman. *J. Ethnopharmacol.* **1984**, *11*, 123–133. [[CrossRef](#)]
4. McKenna, D.J.; Towers, G.H.N.; Abbott, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: Tryptamine and  $\beta$ -carboline constituents of Ayahuasca. *J. Ethnopharmacol.* **1984**, *10*, 195–223. [[CrossRef](#)]
5. Riba, J.; McIlhenny, E.H.; Valle, M.; Bouso, J.C.; Barker, S.A. Metabolism and disposition of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids after oral administration of ayahuasca. *Drug Test. Anal.* **2012**, *4*, 610–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Santillo, M.F.; Liu, Y.; Ferguson, M.; Vohra, S.N.; Wiesenfeld, P.L. Inhibition of monoamine oxidase (MAO) by  $\beta$ -carbolines and their interactions in live neuronal (PC12) and liver (HuH-7 and MH1C1) cells. *Toxicol. In Vitro* **2014**, *28*, 403–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Strassman, R.J.; Qualls, C.R. Dose-response study of N,N-dimethyltryptamine in humans, I. Neuroendocrine, autonomic, and cardiovascular effects. *Arch. Gen. Psychiatry* **1994**, *51*, 85–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Smith, R.L.; Canton, H.; Barrett, R.J.; Sanders-Bush, E. Agonist properties of N,N-dimethyltryptamine at serotonin 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1998**, *61*, 323–330. [[CrossRef](#)]
9. Ott, J. Pharmahuasca: Human pharmacology of oral DMT plus harmine. *J. Psychoact. Drugs* **1999**, *31*, 171–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Brierley, D.I.; Davidson, C. Harmine augments electrically evoked dopamine efflux in the nucleus accumbens shell. *J. Psychopharmacol.* **2013**, *27*, 98–108. [[CrossRef](#)]
11. Cao, R.; Peng, W.; Wang, Z.; Xu, A.  $\beta$ -carboline alkaloids: Biochemical and pharmacological functions. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 479–500. [[CrossRef](#)]
12. Glennon, R.A.; Dukat, M.; Grella, B.; Hong, S.; Mattson, M.V. Binding of beta-carbolines and related agents at serotonin (5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub>), dopamine (D<sub>2</sub>) and benzodiazepine receptors. *Drug Alcohol. Depend.* **2000**, *60*, 121–132. [[CrossRef](#)]
13. McKenna, D.J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: Rationale and regulatory challenges. *Pharmacol. Ther.* **2004**, *102*, 111–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Frecska, E.; Bokor, P.; Winkelman, M. The therapeutic potentials of ayahuasca: Possible effects against various diseases of civilization. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Morales-García, J.A.; Revenga, M.F.; Alonso-Gil, S.; Rodríguez-Franco, M.I.; Feilding, A.; Perez-Castillo, A.; Riba, J. The alkaloids of *Banisteriopsis caapi*, the plant source of the Amazonian hallucinogen Ayahuasca, stimulate adult neurogenesis in vitro. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Fortunato, J.J.; Réus, G.Z.; Kirsch, T.R.; Stringari, R.B.; Stertz, L.; Kapczinski, F.; Pinto, J.P.; Hallak, J.E.; Zuardi, A.W.; Crippa, J.A.; et al. Acute harmine administration induces antidepressant-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2009**, *33*, 1425–1430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Fortunato, J.J.; Réus, G.Z.; Kirsch, T.R.; Stringari, R.B.; Fries, G.R.; Kapczinski, F.; Hallak, J.E.; Zuardi, A.W.; Crippa, J.A.; Quevedo, J. Chronic administration of harmine elicits antidepressant-like effects and increases BDNF levels in rat hippocampus. *J. Neural Transm.* **2010**, *117*, 1131–1137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Serrano-Dueñas, M.; Cardozo-Pelaez, F.; Sánchez-Ramos, J.R. Effects of *Banisteriopsis caapi* extract on Parkinson's disease. *Sci. Rev. Altern. Med.* **2001**, *5*, 129–134.
19. Schwarz, M.J.; Houghton, P.J.; Rose, S.; Jenner, P.; Lees, A.D. Activities of extract and constituents of *Banisteriopsis caapi* relevant to parkinsonism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, *75*, 627–633. [[CrossRef](#)]
20. Samoylenko, V.; Rahman, M.M.; Tekwani, B.L.; Tripathi, L.M.; Wang, Y.H.; Khan, S.I.; Khan, I.A.; Miller, L.S.; Joshi, V.C.; Muhammad, I. *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. [[CrossRef](#)]
21. 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.; et al. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *128*, 662–671. [[CrossRef](#)]
22. Pic-Taylor, A.; Da Motta, L.G.; De Moraes, J.A.; Junior, W.M.; Santos, A.F.A.; Campos, L.A.; Mortari, M.R.; Von Zuben, M.; Caldas, E.D. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rat. *Behav. Process.* **2015**, *118*, 102–110. [[CrossRef](#)]
23. Da Silva, F.S.; Silva, E.A.S.; Sousa, G.M., Jr.; Maia-de-Oliveira, J.P.; Soares-Rachetti, V.P.; De Araujo, D.B.; Sousa, M.B.C.; Lobão-Soares, B.; Hallak, J.; Galvão-Coelho, N.L. Acute effects of ayahuasca in a juvenile non-human primate model of depression. *Rev. Bras. Psychiatry* **2019**, *41*, 280–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Colaço, C.S.; Alves, S.S.; Nolli, L.M.; Pinheiro, W.O.; Oliveira, D.G.R.; Santos, B.W.L.; Pic-taylor, A.; Mortari, M.R.; Caldas, E.D. Toxicity of ayahuasca after 28 days daily exposure and effects on monoamines and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in brain of Wistar rats. *Metab. Brain Dis.* **2020**, *35*, 739–751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Nolli, L.M.; Gustavo, D.; Oliveira, R.; Alves, S.S.; Von Zuben, M.V.; Pic-taylor, A.; Mortari, M.R.; Caldas, E.D. Effects of the hallucinogenic beverage ayahuasca on voluntary ethanol intake by rats and on cFos expression in brain areas relevant to drug addiction. *Alcohol* **2020**, *84*, 67–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lawn, W.; Hallak, J.E.; Crippa, J.A.; Dos Santos, R.; Porffy, L.; Barratt, M.J.; Ferris, J.A.; Winstock, A.R.; Morgan, C. Well-being, problematic alcohol consumption and acute subjective drug effects in past-year ayahuasca users: A large, international, self-selecting online survey. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15201. [[CrossRef](#)]
27. Palhano-Fontes, F.; Barreto, D.; Onias, H.; Andrade, K.C.; Novaes, M.M.; Pessoa, J.A.; Mota-Rolim, S.A.; Osório, F.L.; Sanches, R.; Dos Santos, R.G.; et al. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: A randomized placebo-controlled trial. *Psychol. Med.* **2019**, *49*, 655–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Jiménez-Garrido, D.F.; Gómez-Sousa, M.; Ona, G.; Dos Santos, R.G.; Hallak, J.; Alcázar-Córcoles, M.A.; Bouso, J.C. Effects of ayahuasca on mental health and quality of life in naïve users: A longitudinal and cross-sectional study combination. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4075. [CrossRef]
29. Schultes, R.E. Hallucinogens of plant origin. *Science* **1969**, *163*, 245–254. [CrossRef]
30. Schultes, R.E.; Hofmann, A. *The Botany and Chemistry of Hallucinogens*; Charles C. Thomas Pub: Springfield, IL, USA, 1980; 437p.
31. Langdon, E.J. Las clasificaciones del yagé Dentro del grupo Siona: Etnobotánica, etnoquímica e historia. *Am. Indíg.* **1986**, *46*, 101–116.
32. Schultes, R.E.; Hofmann, A.; Rätsch, C. *Plants of the Gods: Their Sacred, Healing and Hallucinogenic Powers*; Healing Arts Press: Rochester, NY, USA, 2001; 208p. Available online: <https://archive.org/details/SchultesHofmannPlantsOfTheGodsHealingArts2001/page/n15/mode/2up> (accessed on 22 June 2020).
33. Rivier, L.; Lindgren, J.E. 'Ayahuasca,' the South American hallucinogenic drink: An ethnobotanical and chemical investigation. *Econ. Bot.* **1972**, *26*, 101–129. [CrossRef]
34. Callaway, J.C.; Brito, G.S.; Neves, E.S. Phytochemical analyses of *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*. *J. Psychoact. Drugs* **2005**, *37*, 145–150. [CrossRef]
35. Qu, S.J.; Wang, G.F.; Duan, W.H.; Yao, S.Y.; Zuo, J.P.; Tan, C.H.; Zhu, D.Y. Tryptamine derivatives as novel non-nucleosidic inhibitors against hepatitis B virus. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3120–3127. [CrossRef] [PubMed]
36. Callaway, J.C.; Raymon, L.P.; Hearn, W.L.; McKenna, D.J.; Grob, C.S.; Brito, G.S.; Mash, D.C. Quantitation of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *J. Anal. Toxicol.* **1996**, *20*, 492–497. [CrossRef] [PubMed]
37. INMETRO. *Orientações Sobre Validação de Métodos Analíticos (DOQ-CGCRE-008)*; Revisão 5; INMETRO: Rio de Janeiro, Brazil, 2016; 31p.
38. Shrivastava, A.; Gupta, V.B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron. Young Sci.* **2011**, *2*, 21–25. [CrossRef]
39. De Castro-Neto, E.F.; Da Cunha, R.H.; Da Silveira, D.X.; Yonamine, M.; Gouveia, T.L.F.; Cavalheiro, E.A.; Amado, D.; Naffah-Mazzacoratti, M.D.G. Changes in aminoacidergic and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus and amygdala of rats after ayahuasca ingestion. *World J. Biol. Chem.* **2013**, *4*, 141–147. [CrossRef] [PubMed]
40. Schultes, R.E.; Holmstedt, B.; Lindgren, J. Phytochemical examination of Spruce's original collection of *Banisteriopsis caapi*. *Bot. Mus. Leaflet. Harv. Univ.* **1969**, *22*, 121–132.
41. Franco, A.C.; Bustamante, M.; Caldas, L.S.; Goldstein, G.; Meinzer, F.C.; Kozovits, A.R.; Rundel, P.; Coradin, V.T.R. Leaf functional traits of Neotropical savanna trees in relation to seasonal water deficit. *Trees* **2005**, *19*, 326–335. [CrossRef]
42. Teixeira, D.C.; Quinteiro, M.D.C.; Baptista, A.A.; Da Silva, J.G. Uso e manejo de plantas ritualísticas na Comunidade do Santo Daime em Galdinópolis, Nova Friburgo/Rj, Brasil. *Rev. Cién. Vida* **2008**, *28*, 63–74.
43. Callaway, J.C. Various alkaloid profiles in decoctions of *Banisteriopsis caapi*. *J. Psychoact. Drugs* **2005**, *37*, 151–155. [CrossRef]
44. Boerngen-Lacerda, R.; Jamal, Y.; Correia, D.; Goeldner, F.O. Contribution of serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor to ethanol-induced sensitization and ethanol consumption in mice. In *Serotonin: Biosynthesis, Regulation and Health Implications*; Hall, F.S., Ed.; Nova Science Publishers Inc: Happaage, NY, USA, 2013; pp. 224–255.
45. Souza, R.C.Z.; Zandonadi, F.S.; Freitas, D.P.; Tófoli, L.F.F. Validation of an analytical method for the determination of the main ayahuasca active compounds and application to real ayahuasca samples from Brazil. *J. Chromatogr. B* **2019**, *1124*, 197–203. [CrossRef]
46. Pires, A.P.S.; Oliveira, C.D.R.; Moura, S.; Dörr, F.A.; Silva, W.A.E.; Yonamine, M. Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and  $\beta$ -carboline alkaloids in ayahuasca, an Amazonian psychoactive beverage. *Phytochem. Anal.* **2009**, *20*, 149–153. [CrossRef]
47. McIlhenny, E.H.; Pipkin, K.E.; Standish, L.J.; Wechkin, H.A.; Strassman, R.; Barker, S.A. 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. [CrossRef] [PubMed]



48. Da Motta, L.G.; Morais, J.A.; Tavares, A.C.A.M.; Vianna, L.M.S.; Mortari, M.R.; Amorim, R.F.B.; Carvalho, R.R.; Paumgartten, F.J.R.; PicTaylor, A.; Caldas, E.D. Maternal and developmental toxicity of the hallucinogenic plant-based beverage ayahuasca in rats. *Reprod. Toxicol.* **2018**, *77*, 143–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Oliveira, C.D.R.; Moreira, C.Q.; De Sá, L.R.M.; Spinosa, H.D.S.; Yonamine, M. Maternal and developmental toxicity of ayahuasca in Wistar rats. *Birth Defects Res. Part B* **2010**, *89*, 207–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Assis, G.L. A Religião of the Floresta: Apontamentos Sociológicos em Direção a uma Genealogia do Santo Daime e seu Processo de Diáspora. Ph.D. Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, 2017; 484p. Available online: <http://hdl.handle.net/1843/BUBD-ANYQSW> (accessed on 22 June 2020).
51. De Oliveira Silveira, G.; Guimarães Dos Santos, R.; Rebello Lourenço, F.; Novak Rossi, G.; Hallak, J.E.C.; Yonamine, M. Stability evaluation of DMT and harmala alkaloids in ayahuasca tea samples. *Molecules* **2020**, *25*, 2072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# Biodiversity of $\beta$ -carboline profile of *Banisteriopsis caapi* and ayahuasca, a plant and a brew with neuropharmacological potential

## Supplementary Material

### Spectrometric data for the synthesized N,N dimethyltryptamine (DMT) and tetrahydroharmine (THH):

DMT  $^1\text{H}$  NMR spectrum:  $\delta$  2.34 (6H, s,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 2.61 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 2.92 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 7,0 (1H, m, Ph); 7.08 to 7.20 (2H, m, Ph); 7.32 (1H, m, Ph); 7.59 (1H, m, Ph); 8,11 (1H, s, N-H). DMT  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum:  $\delta$  23,70; 45,48; 60,33; 111,11; 114,36; 118,79; 119,17; 121,44; 121,92; 127,47; 136,26. Exact mass  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 189.1389.

THH  $^1\text{H}$  NMR spectrum:  $\delta$  1.42 (3H, d,  $\text{NHCHCH}_3$ ); 2.65 (1H, d m,  $\text{HCHCH}_2\text{NH}$ ); 2.73 (1H, m,  $\text{HCHCH}_2\text{NH}$ ); 3.01 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ); 3.33 (1H, m,  $\text{NHCHCH}_3$ ); 3.83 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ); 6.76 (1H, d d, Ph); 6.83 (1H, d, Ph); 7.33 (1H, d, Ph). THH  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum: 20,81; 22,81; 42,84; 48,21; 55,82; 95,08; 108,40; 108,79; 118,62; 122,09; 135,95; 136,38; 156,21. The exact mass determined was  $[\text{M}+\text{H}]^+$  217.1332.

**Table S1.** Samples of *Banisteriopsis* ssp. and *Diplopterys pubipetala* and  $\beta$ -carboline concentrations.

Sample Identification	Species/Common Name	Collecting State	Cultivated or Native	Collecting Date	Harmine (mg/g)	Harmaline (mg/g)	THH (mg/g)
JS237*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	DF	Cultivated	06/24/2016	1.517	1.536	29.037
JS235*	<i>D. pubipetala</i>	GO	Native	06/07/2016	<LOD	<LOD	<LOD
JS238*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	DF	Cultivated	06/24/2016	6.347	0.312	1.580
JS239*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	DF	Cultivated	06/24/2016	0.083	0.252	3.120
JS242*	<i>B. caapi</i> /caupuri	DF	Cultivated	06/24/2016	4.704	0.094	0.843
JS243*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	DF	Cultivated	06/2016	<LOD	0.463	12.354
JS244*	<i>B. caapi</i> /caupuri	DF	Cultivated	08/2016	11.827	1.000	5.264
JS245*	<i>B. caapi</i> /caupuri	DF	Cultivated	08/2016	6.807	0.239	1.898
BS134/17	<i>B. caapi</i> /tucunacá	DF	Cultivated	01/02/2017	1.525	0.143	8.136
BS137/17	<i>B. caapi</i> /caupuri	DF	Cultivated	09/02/2017	2.741	0.353	12.402
RCO3326*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	DF	Cultivated	06/10/2017	7.663	1.330	3.973
BS163/17	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	11/17/2017	18.269	1.081	4.051
BS164/17	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	11/17/2017	2.264	0.629	18.471
BS165/17	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	11/17/2017	1.398	0.505	7.760
BS166/17	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	11/17/2017	1.225	0.912	13.919
BS167/17	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	11/18/2017	8.332	1.011	3.259
CF2479*	<i>D. pubipetala</i>	DF	Native	08/22/2017	<LOD	<LOD	<LOD
CF2467*	<i>D. pubipetala</i>	DF	Native	08/22/2017	<LOD	<LOD	<LOD
CF2469*	<i>D. pubipetala</i>	DF	Native	08/22/2017	<LOD	<LOD	<LOD
CF2471*	<i>B. laevifolia</i>	DF	Native	08/22/2017	<LOD	<LOD	<LOD
CF2470*	<i>B. laevifolia</i>	DF	Native	08/22/2017	<LOD	<LOD	<LOD
RCO3392*	<i>B. muricata</i>	AC	Native	12/06/2017	<LOD	<LOD	<LOD
JS353*	<i>Banisteriopsis</i> sp.	GO	Native	08/11/2017	<LOD	<LOD	<LOD
CF2474*	<i>B. variabilis</i>	DF	Cultivated	08/23/2017	<LOD	<LOD	<LOD
CF2435*	<i>B. megaphylla</i>	DF	Native	07/04/2017	<LOD	<LOD	<LOD
CF2431*	<i>B. gardneriana</i>	DF	Native	07/05/2017	<LOD	<LOD	<LOD
JS341*	<i>B. oxyclada</i>	GO	Native	06/30/2017	<LOD	<LOD	<LOD
CF2482*	<i>B. laevifolia</i>	DF	Native	01/29/2018	<LOD	<LOD	<LOD

Sample Identification	Species/Common Name	Collecting State	Cultivated or Native	Collecting Date	Harmine (mg/g)	Harmaline (mg/g)	THH (mg/g)
CF2483*	<i>B. laevifolia</i>	DF	Native	01/29/2018	<LOD	<LOD	<LOD
CF2454*	<i>D. pubipetala</i>	DF	Native	03/26/2018	0.158	0.046	1.037
JS380*	<i>B. caapi</i> /ourinho	AC	Cultivated	08/02/2018	<LOD	<LOD	<LOD
JS381*	<i>Banisteriopsis</i> sp.	AC	Native	08/02/2018	<LOD	<LOD	<LOD
JS382*	<i>B. caapi</i> /ourinho	AC	Native	08/04/2018	<LOD	<LOD	<LOD
JS383*	<i>B. caapi</i> /ourinho	AC	Native	08/04/2018	13.580	0.805	2.306
JS384*	<i>B. caapi</i> /tucunacá with nodes	AC	Native	08/06/2018	10.303	0.273	1.196
JS385*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	10.084	0.490	1.789
JS386*	<i>B. caapi</i> /tucunacá with nodes	AC	Native	08/06/2018	12.077	0.844	3.026
JS387*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	10.917	0.609	1.549
JS388*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	9.948	0.445	1.705
JS389*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	5.475	0.400	1.166
JS390*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	6.290	1.573	2.895
JS391*	<i>B. caapi</i> /amarelinho	AC	Native	08/06/2018	8.539	1.594	3.375
JS392*	<i>B. caapi</i> /caboquinho	AC	Native	08/07/2018	0.124	0.001	0.109
RCO3490*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	GO	Cultivated	07/23/2018	0.754	0.686	1.269
RCO3494*	<i>B. caapi</i> /ourinho	AC	Native	08/02/2018	3.829	0.683	1.930
DR130/18	<i>B. caapi</i> /ourinho	GO	Cultivated	09/07/2018	6.917	1.583	3.084
AC31/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/03/2018	3.334	0.158	0.236
AC32/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/03/2018	4.822	0.494	1.200
AC33/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	6.400	0.434	2.892
AC34/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	4.438	1.609	2.891
AC35/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	2.892	0.424	0.946
AC36/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	0.377	0.005	0.012
AC37/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	0.128	0.009	0.012
AC38/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	8.070	0.355	1.154
AC39/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	0.184	<LOD	<LOD
AC40/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	4.972	0.747	1.734
AC41/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	<LOD	<LOD	<LOD
AC42/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	4.689	1.453	3.738

Sample Identification	Species/Common Name	Collecting State	Cultivated or Native	Collecting Date	Harmine (mg/g)	Harmaline (mg/g)	THH (mg/g)
AC43/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	8.827	0.432	1.930
AC44/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	0.325	0.013	0.065
AC45/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	7.355	0.165	0.959
AC46/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	4.830	0.176	0.416
AC47/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	6.583	0.858	2.998
AC48/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	9.122	0.987	3.373
AC49/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	8.114	0.132	1.196
AC50/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	7.292	0.637	2.182
AC51/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/04/2018	8.794	0.818	2.855
AC52/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	10.754	0.457	0.793
AC53/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	8.730	0.475	0.831
AC54/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	7.479	0.357	0.513
AC55/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	5.521	0.126	0.069
AC56/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	10.222	0.412	1.271
AC57/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	3.574	0.209	0.122
AC58/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	5.623	0.326	0.506
AC59/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	0.969	0.171	0.713
AC60/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/06/2018	4.443	0.188	1.106
AC61/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AM	Native	08/07/2018	6.955	0.650	2.290
AC62/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AM	Native	08/07/2018	11.079	0.231	1.067
AC63/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AM	Native	08/07/2018	3.283	0.365	3.850
AC64/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AM	Native	08/07/2018	2.324	0.663	7.874
AC65/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	08/08/2018	2.380	0.187	0.760
AC66/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	08/08/2018	2.320	0.875	13.132
AC67/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	08/08/2018	2.320	0.875	13.132
AC68/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	08/08/2018	1.989	0.756	6.818
AC69/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/15/2018	2.872	0.347	3.215
AC70/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/15/2018	6.785	0.575	1.513
RD01/18	<i>B. caapi</i> /caupuri	RO	Native	08/19/2018	<LOD	<LOD	<LOD
RD02/18	<i>B. caapi</i> /caupuri	RO	Native	08/19/2018	<LOD	<LOD	<LOD

Sample Identification	Species/Common Name	Collecting State	Cultivated or Native	Collecting Date	Harmine (mg/g)	Harmaline (mg/g)	THH (mg/g)
RD03/18	<i>B. caapi</i> /caupuri without nodes	RO	Native	08/19/2018	2.060	0.255	1.033
RD04/18	<i>B. caapi</i>	RO	Native	07/06/2018	2.636	0.727	12.526
RD05/18	<i>B. caapi</i>	RO	Native	07/06/2018	6.727	0.218	1.215
RD11/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	09/05/2018	2.478	0.597	9.696
RD12/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	09/05/2018	6.650	0.215	0.387
RD13/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	09/05/2018	5.886	0.164	0.256
RD14/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	09/07/2018	5.979	0.152	0.175
RD15/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	09/07/2018	6.746	0.351	1.430
RD16/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	09/02/2018	3.710	0.349	1.001
RD17/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	08/02/2018	5.904	0.732	2.067
RD18/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	09/07/2018	5.164	0.092	0.270
RD19/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	09/07/2018	6.325	0.351	1.132
RD20/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	RO	Native	09/07/2018	6.045	0.280	0.842
RD31/18	<i>B. caapi</i> /amarelinho	RO	Native	08/20/2018	4.820	0.260	3.481
RD32/18	<i>B. caapi</i> /amarelinho	RO	Native	08/20/2018	4.351	0.093	0.146
RD33/18	<i>B. caapi</i> /amarelinho	RO	Native	08/12/2018	7.936	0.324	1.125
RD34/18	<i>B. caapi</i> /amarelinho	RO	Native	08/24/2018	7.226	0.564	1.646
RD35/18	<i>B. caapi</i> /amarelinho	RO	Native	08/20/2018	<LOD	<LOD	<LOD
RD36/18	<i>B. caapi</i> /amarelinho	RO	Native	08/14/2018	6.088	0.767	2.351
RD37/18	<i>B. caapi</i> /amarelinho	RO	Native	08/18/2018	4.731	0.236	0.268
RD38/18	<i>B. caapi</i> /amarelinho	RO	Native	08/24/2018	5.547	0.297	1.424
RD39/18	<i>B. caapi</i> /amarelinho	RO	Native	09/03/2018	1.285	<LOD	<LOD
AC01/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/15/2018	0.284	<LOD	<LOD
AC02/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/15/2018	0.618	0.004	0.010
AC03/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/15/2018	7.189	0.143	0.102
AC04/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/15/2018	1.864	<LOD	<LOD
AC05/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/15/2018	0.627	0.004	<LOD
AC06/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/18/2018	10.696	0.900	1.444
AC07/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/18/2018	<LOD	<LOD	<LOD
AC08/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/18/2018	10.966	0.409	1.305

Sample Identification	Species/Common Name	Collecting State	Cultivated or Native	Collecting Date	Harmine (mg/g)	Harmaline (mg/g)	THH (mg/g)
AC09/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/18/2018	6.032	0.109	0.340
AC10/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	08/18/2018	11.908	0.949	2.006
AC11/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/07/2018	0.415	<LOD	<LOD
AC12/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/07/2018	0.694	<LOD	<LOD
AC13/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/07/2018	2.963	0.234	0.656
AC14/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/07/2018	1.207	0.043	0.080
AC15/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/07/2018	1.994	<LOD	<LOD
AC17/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/13/2018	9.234	0.416	0.393
AC18/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/13/2018	7.111	0.488	1.009
AC19/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/13/2018	3.420	0.239	0.262
AC20/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/13/2018	13.873	0.606	1.708
AC21/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/02/2018	4.133	0.146	0.406
AC22/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/02/2018	3.502	0.267	2.050
AC23/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/02/2018	0.171	<LOD	<LOD
AC24/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/02/2018	4.200	0.301	1.300
AC25/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AC	Native	09/02/2018	4.820	0.273	0.345
AC26/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AM	Native	08/15/2018	5.729	0.165	0.849
AC27/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AM	Native	08/15/2018	15.951	1.244	0.842
AC28/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AM	Native	08/16/2018	6.834	0.660	0.804
AC29/18/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AM	Native	08/17/2018	10.886	0.626	1.286
AC30/18	<i>B. caapi</i> /tucunacá	AM	Native	08/18/2018	13.720	2.076	4.818
DF01/19	<i>B. caapi</i> /tucunacá	GO	Cultivated	01/24/2019	7.746	0.677	1.448
RCO3674*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	PA	Cultivated	07/09/2019	4.596	0.736	2.361
RCO3675*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	PA	Cultivated	07/09/2019	7.300	1.513	3.833
RCO3677*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	PA	Cultivated	07/09/2019	2.932	0.335	0.955
RCO3680*	<i>B. caapi</i> /caupuri	PA	Cultivated	07/09/2019	1.830	0.406	0.756
RCO3682*	<i>B. caapi</i> /caupuri	PA	Native	07/09/2019	10.374	1.514	4.223
RCO3684*	<i>B. caapi</i> /caupuri	PA	Native	07/09/2019	0.750	0.151	0.153
RCO3687*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	PA	Cultivated	07/10/2019	2.635	0.377	0.392
RCO3689*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	PA	Cultivated	07/10/2019	3.979	0.663	1.760

Sample Identification	Species/Common Name	Collecting State	Cultivated or Native	Collecting Date	Harmine (mg/g)	Harmaline (mg/g)	THH (mg/g)
RCO3690*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	PA	Cultivated	07/10/2019	3.486	0.408	1.223
RCO3691*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	PA	Cultivated	07/10/2019	6.711	0.308	0.666
RCO 3697*	<i>B. caapi</i> /caupuri	PA	Cultivated	07/10/2019	<LOD	<LOD	<LOD
RCO3698*	<i>B. caapi</i> /caupuri	PA	Cultivated	07/10/2019	6.768	1.305	3.584
RCO3702*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	PA	Cultivated	07/10/2019	1.217	0.248	0.272
RCO3707*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	PA	Native	07/11/2019	1.671	0.149	0.355
RCO3709*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	PA	Cultivated	07/11/2019	4.253	1.181	2.829
RCO3710*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	PA	Cultivated	07/11/2019	2.039	0.471	0.939
RCO3712*	<i>B. caapi</i> /caupuri	PA	Cultivated	07/11/2019	2.134	0.275	0.464
CB37*	<i>B. caapi</i> /caupuri	AM	Cultivated	08/23/2019	2.421	0.497	1.051
CB38*	<i>B. caapi</i> /caupuri	AM	Cultivated	08/23/2019	1.273	0.138	0.375
CB39*	<i>B. caapi</i> /ourinho	AM	Cultivated	08/23/2019	1.015	0.193	0.704
CB40*	<i>B. caapi</i> /caupuri	AM	Cultivated	08/23/2019	<LOD	<LOD	<LOD
CB41*	<i>B. caapi</i> /pajezinho	AM	Cultivated	08/23/2019	0.407	0.076	0.338
CB42*	<i>B. caapi</i> /caupuri	AM	Cultivated	08/25/2019	1.684	0.265	1.046
CB43*	<i>B. caapi</i> /caupuri	AM	Cultivated	08/25/2019	2.966	0.614	1.435
CB45*	<i>B. caapi</i> /ourinho	AM	Cultivated	08/25/2019	0.899	0.253	0.694
CB47*	<i>B. caapi</i> /caupuri	AM	Cultivated	08/25/2019	1.053	0.448	0.528
CB50*	<i>Banisteriopsis</i> sp.	AM	Cultivated	08/25/2019	<LOD	<LOD	<LOD
RCO3516*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	MG	Cultivated	12/27/2019	3.287	0.614	1.948
RCO3519*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	MG	Cultivated	12/27/2019	1.937	0.228	0.623
RCO3553*	<i>B. caapi</i> /quebrador	DF	Cultivated	03/12/2019	5.229	0.619	1.901
RCO3619*	<i>B. caapi</i> /ourinho	DF	Cultivated	04/04/2019	2.498	0.590	1.424
RCO3643*	<i>B. caapi</i> /tucunacá	DF	Cultivated	04/17/2019	1.734	0.205	0.657
RCO3620*	<i>B. caapi</i> /ourinho	DF	Cultivated	04/04/2019	1.025	0.108	0.170
RCO3621*	<i>B. caapi</i> /ourinho	DF	Cultivated	04/04/2019	1.634	0.321	0.493
LC156/19	<i>B. caapi</i> /caupuri without nodes	GO	Cultivated	12/05/2019	10.370	0.093	0.301
LC157/19	<i>B. caapi</i> /amarelinho	GO	Cultivated	12/05/2019	6.774	0.329	0.268

\* Samples stored in the UB herbarium and UBw wood collection of the University of Brasilia; RO=Rondonia; AC=Acre; DF= Federal District; GO=Goiás, MG=Minas Gerais; AM=Amazonas; PA=Pará; LOD = 0.0009 mg/g for harmine, 0.0018 mg/g for harmaline and 0.0146 mg/g for tetrahydroharmine.



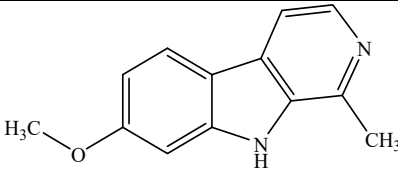
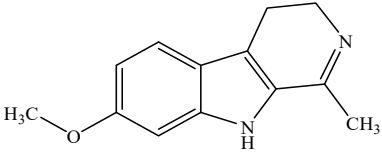
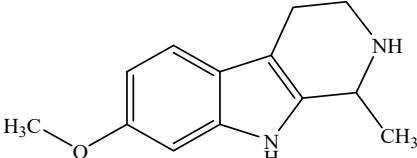
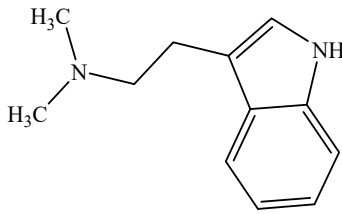
Table S2. Ayahuasca brew samples and alkaloid concentrations.

Sample	Collection Date	Ayahuasca Group/State	Observation	DMT (mg/mL)	Harmina (mg/mL)	Harmalina (mg/mL)	THH (mg/mL)
BS136/17	01/02/2017	UDV/DF	Prepared with tucunacá in 2017	0.096	0.669	0.084	1.095
BS140/17	09/02/2017	UDV/DF	Prepared with tucunacá in 2017	0.279	0.986	0.224	1.406
BS143/17	06/10/2017	CELF/DF	Prepared with tucunacá in 2017	0.537	1.133	0.288	2.363
BS172/17	11/18/2017	UDV/AC	Prepared with tucunacá in 2017	0.304	0.788	0.035	0.346
RCO01/17	11/18/2017	Daime/AC	Honey prepared in 2015	2.513	2.434	0.310	2.981
RCO02/17	11/18/2017	Daime/AC	Honey prepared in 2014	1.616	2.063	0.209	1.995
RCO03/17	11/18/2017	Daime/AC	Prepared with ourinho in 2015	0.773	0.704	0.085	0.788
RCO04/17	11/18/2017	Daime/AC	Honey prepared with "arara" in 2015	1.470	1.043	0.062	0.810
RCO05/17	11/18/2017	Daime/AC	Prepared with ourinho in 2015	0.600	0.327	0.049	0.490
RCO06/17	11/18/2017	Daime/AC	Prepared with ourinho in 2015	1.324	1.283	0.111	1.009
RCO07/17	11/18/2017	Daime/AC	Prepared with ourinho in 2015	1.755	0.163	0.045	0.559
RCO08/17	11/18/2017	Daime/AC	Honey prepared with 2 parts vine and 1 part <i>P. viridis</i> in 2015	0.870	1.463	0.119	1.039
RCO09/17	11/18/2017	Daime/AC	honey prepared with 2 parts vine and 1 part <i>P. viridis</i> in 2015	0.131	0.109	0.012	0.086
RCO10/17	11/18/2017	Daime/AC	Prepared with arara in 2015	2.111	2.081	0.212	2.063
RCO11/17	11/18/2017	Daime/AC	Honey prepared with ourinho in 2015	1.459	1.309	0.208	1.339
RCO12/17	11/18/2017	Daime/AC	Prepared with 2 parts ourinho and 1 part <i>P. viridis</i> in 2015	0.956	0.142	0.020	0.344
RCO13/17	11/18/2017	Daime/AC	Prepared with arara and ourinho in 2015	1.088	0.632	0.108	1.073
RCO14/18	04/06/2018	Daime/AC	Prepared with tucunacá only in 2018	<LOD	0.140	0.026	0.269
RCO15/18	04/06/2018	Daime/GO	Prepared with tucunacá, ourinho and caupuri in 2018	1.384	0.818	0.173	1.114
RCO16/18	04/06/2018	Daime/GO	"Brew of the names" prepared with tucunacá in 2018.	1.646	0.896	0.178	1.114
RCO17/18	04/30/2018	Daime/GO	honey prepared with tucunacá and diluted with the vine in 2018	1.001	0.870	0.145	0.990
DR224/18	09/19/2018	ICEFLU/GO	Prepared with tucunacá in 2018	0.881	1.088	0.219	1.770
VF02/19	07/01/2018	Daime/AC	Prepared in 2018	1.429	1.043	0.078	0.848

Sample	Collection Date	Ayahuasca Group/State	Observation	DMT (mg/mL)	Harmina (mg/mL)	Harmalina (mg/mL)	THH (mg/mL)
DF04/19	01/25/2019	Daime/GO	Prepared with tucunacá in 2019	1.699	0.722	0.136	1.421
RCO18/19	01/15/2019	Daime/DF	Almost honey prepared with tucunacá in 2018	0.791	0.660	0.093	0.938
RCO19/19	01/15/2019	Daime/DF	Prepared with tucunacá in 2018	0.733	0.546	0.073	0.874
RCO20/19	04/06/2018	Daime/DF	honey prepared with tucunacá in 2017	1.249	1.016	0.195	1.219
LC158/19	08/12/2019	UDV/GO	Prepared with caupuri without nodes (14.3%) and amarelinho (85.7%) in 2019	0.483	1.084	0.073	0.449
CB01/20	02/10/2020	Daime/DF	Prepared in 2019	0.900	2.989	0.701	1.395
CB02/20	02/10/2020	Daime /DF	Prepared in 2017	0.549	2.029	0.468	1.114
CB03/20	02/13/2020	Daime /DF	Prepared in 2019	3.120	7.110	0.945	3.053
CB04/20	02/01/2020	Daime /AC	Prepared in 2019	0.365	1.279	0.324	0.998
LC06/20	02/11/2020	UDV/AC	Prepared with tucunacá in 2020	0.556	2.681	0.440	0.949

honey is a term used when the brew is concentrated through further boiling. DF= Federal District, AC = Acre, GO=Goias, UDV=União do Vegetal; ICEFLU= Igreja do Culto Eclético da Fluente Luz Universal; LOD = 0.0006 mg/mL.

**Table S3.** Optimized ESI+ MS/MS parameters, chromatographic retention times and ion ratios in the LC-MS/MS method for the target analytes in *B. caapi* extracts and ayahuasca.

Analyte Structure	DP (V)	Transition (m/z)	CE (V)	CXP (V)	RT, min	Ion Ratio (RSD, %)*
 <p>Harmine; <math>[M+H]^+ = 213</math></p>	86	170 198	43 33	12 16	6.4	1.24 (1.03)
 <p>Harmaline <math>[M+H]^+ = 215</math></p>	71	174 200	33 33	14 14	5.8	1.01 (2.30)
 <p>THH <math>[M+H]^+ = 217</math></p>	46	188 200	17 19	14 16	3.4	1.35 (1.99)
 <p>DMT; <math>[M+H]^+ = 189</math></p>	41	144 143	25 45	10 8	2.3	5.58 (1.18)

DP = declustering potential; CE = collision energy; CXP = collision cell exit potential; RT = retention time \* quantifier/qualifier obtained through the validation experiments ( $n = 70$ ); RSD: relative standard deviation.

**Table S4.** Recovery and repeatability ( $n = 3$  for DMT and  $n = 5$  for the others) and intermediate precision ( $n = 8$ ) obtained for the analysis of Malpighiaceae extracts and ayahuasca samples at three concentration levels.

Analyte	Level (mg/g; mg/mL)*	Recovery, Mean (%)	Repeatability (RSD %)	Intermediate Precision (RSD %)
Harmine	<u>0.75</u> ; 0.005	100.5	11.4	14.5
	3.00; 0.02	88.6	5.9	7.4
	7.50; 0.05	92.3	7.5	8.5
Harmaline	<u>0.075</u> ; 0.0005	91.8	5.8	8.1
	0.375; 0.025	98.2	2.8	7.9
	1.50; 0.1	90.7	9.0	9.2
THH	<u>0.75</u> ; 0.005	94.6	11.3	9.5
	3.00; 0.02	89.5	6.4	12.3
	7.50; 0.05	87.9	8.2	11.6
DMT	-; <u>0.005</u>	103.1	7.1	-
	-; 0.02	98.7	1.5	-
	-; 0.05	92.1	11.4	-

RSD = relative standard deviation. \* level at Malpighiaceae extract; level adjusted for ayahuasca sample; underlined values are the limit of quantification of the method.