



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de la actividad antimicrobiana y caracterización de metabolitos
presentes en el extracto etanólico de *Philodendron heleniae*

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de grado:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: JUAN DIEGO SACOTO TORRES

TUTORA: PhD. NOROSKA GABRIELA SALAZAR MOGOLLON

COTUTORA: NINA ESPINOSA DE LOS MONTEROS SILVA

Tena - Ecuador

2024

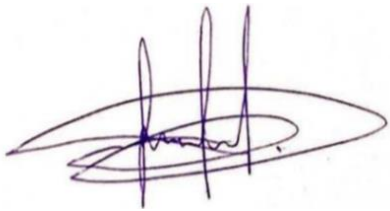
Carrera de Biotecnología

Declaración de derechos de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 28 de agosto del 2024

Yo, Juan Diego Sacoto Torres con documento de identidad N° 1106010851 declaró que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniería en Biotecnología absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

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



Juan Diego Sacoto Torres

CI. 1106010851

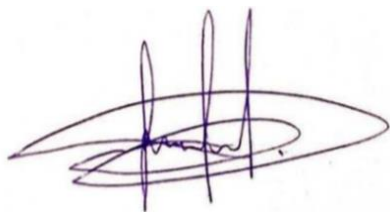
Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Tena, 28 de agosto del 2024

Yo, Juan Diego Sacoto Torres, con documento de identidad N° 1106010851, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: Evaluación de la actividad antimicrobiana y caracterización de metabolitos presentes en el extracto etanólico de *Philodendron heleniae*, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.



Juan Diego Sacoto Torres

CI: 110601085

Carrera de Biotecnología

Certificado de Dirección de Trabajo de Titulación

Tena, 28 de agosto del 2024

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular titulado: “Evaluación de la actividad antimicrobiana y caracterización de metabolitos presentes en el extracto etanólico de *Philodendron heleniae*”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Juan Diego Sacoto Torres bajo mi dirección.

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



PhD. Noroska Gabriela Salazar Mogollon

C.I: 1757494453

Tutora



MSc. Nina Espinosa de los Monteros Silva

C.I: 1500755283

Cotutora

TABLA DE CONTENIDO

Portada.....	i
<i>Declaración de derechos de autor, autenticidad y responsabilidad</i>	<i>ii</i>
<i>Autorización de publicación en el repositorio institucional</i>	<i>iii</i>
<i>Certificado de Dirección de Trabajo de Titulación</i>	<i>iv</i>
ÍNDICE DE TABLA	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I: Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Justificación de la investigación	4
1.4 Objetivos de la investigación	5
1.4.1 General	5
1.4.2 Específicos	5
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	6
2.1 Colecta de material vegetal y elaboración del extracto.....	6
2.2 Ensayos antimicrobianos	7
2.3 Ensayos fitoquímicos cualitativos y cuantitativos	8
2.3.1 Determinación cualitativa de flavonoides.....	8
2.3.2 Determinación cualitativa de terpenoides.....	8
2.3.3 Determinación cualitativa de alcaloides	9
2.3.4 Determinación cualitativa de taninos	9
2.3.5 Determinación cualitativa de quinonas.....	9
2.3.6 Determinación cualitativa de compuestos fenólicos	10
2.3.7 Cuantificación de polifenoles totales	10
2.3.8 Cuantificación de flavonoides totales	11
2.4 Identificación de compuestos en el extracto etanólico por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	12
2.4.1 Preparación de la muestra	12
2.4.2 Condiciones instrumentales	12
2.4.3 Tratamiento de datos	13

2.4.4	Identificación de metabolitos.....	14
2.5	Identificación de compuestos enel extracto etanólico de <i>Philodendron heleniae</i> mediante cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS).....	15
2.5.1	Preparación de muestra.....	15
2.5.2	Programación del equipo.....	16
2.5.3	Preparación de los estándares.....	17
2.5.4	Tratamiento de datos	17
2.5.5	Análisis estadísticos y gráficas	17
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....		19
3.1	Ensayos antimicrobianos.....	19
3.2	Ensayos fitoquímicos cualitativos del extracto etanólico de <i>P. heleniae</i>	20
3.3	Ensayos fitoquímicos cuantitativos del extracto etanólico de <i>P. heleniae</i>	20
3.4	Identificación de metabolitos presentes en el extracto etanólico de <i>P. heleniae</i> : GC-MS.	21
3.5	Identificación de metabolitos presentes en el extracto etanólico de <i>P. heleniae</i> : LC-MS.....	26
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....		28
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		33
REFERENCIAS.....		

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 3 - 1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de la fracción etanólica y acuosa de <i>P. heleniae</i> contras diferentes microorganismos.	19
Tabla 3 - 2. Ensayos fitoquímicos en el extracto etanólico de <i>P. helaniae</i>	20
Tabla 3 - 3. Ensayos cuantitativos del contenido de polifenoles y flavonoides totales en el extracto etanólico de <i>P. helaniae</i>	21
Tabla 3 - 4. Metabolitos identificados en el extracto etanólico de <i>P. heleniae</i> mediante GC-MS.	24
Tabla 3 - 5. Metabolitos identificados en el extracto etanólico de <i>P. heleniae</i> mediante LC-MS.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3 - 1. a) Cromatograma de la fracción acuosa: 1. 2-terc-butilciclohexonona, 2. Desconocido, 3. Desconocido b) Cromatograma de la fracción etanólica: 1. Desconocido, 2. fitano, 3. Anhídrido 5-nitroisatoico, 4. Ácido esteárico, 5. Estearato de etilo, 6. (Z)-9-tricoseno, 7. (11Z,14Z,17Z)-icosa-11,14,11-trienoato de metilo, 8. Eicosil isobutil éter, 9. Desconocido, 10. Eicosil Etil éter, 1-3 propanodiol, 11. Monolinoleato de glicerilo, 12. Desconocido, 13. 6-metoxi-2,7,8-trimetil-2-2(4,8,12-trimetiltridecil)cromano, 14-20. Desconocido. c) Cromatograma del extracto crudo de *P. heleniae*: 1. Desconocido, 2. 2-terc-butilciclohexonona, 3. 3-(4-hidroxifenil) propionitrilo, 4. Desconocido, 5. Desconocido, 6. Guai-1(10)-en-11-ol, 7. Desconocido, 8. 5-Azulenemetanol, 1,2,3,4,5alfa,6,7,8-octahidro-alfa, alfa,3beta,3beta,8beta-tetrametil-, acetato, 9. Fitano, 10. (-)-Isolongifolol, Chlorodifluoroacetato, 11. Desconocido. 12. Anhídrido 5-Nitroisatoico, 13. Ácido esteárico, 14. Estearato de etilo, 15. (Z)-9-tricoseno, 16. Desconocido, 17. (11Z,14Z,17Z)-icosa-11,14,11- trienoato de metilo, 18. desconocido, 19. Desconocido, 20. Eicosil isobutil éter, 21. Desconocido, 22. Eicosil Etil éter, 1-3 propanodiol, 23. Desconocido, 24. Monolinoleato de glicerilo, 25. Desconocido, 26. 6-metoxi-2,7,8-trimetil-2-2(4,8,12-trimetiltridecil) cromano, 27-34. Desconocido. 22

Figura 3 - 2. a) Cromatograma de la fracción etanólica: 1. Procianidina B1, 2. Epicatequina, 3. Rutina, 4. Datiscetin-3-O-rutinósido. b) Cromatograma de la fracción acuosa; c) Cromatograma del extracto crudo: 1. Procianidina B1, 2. Epicatequina, 3. Rutina, 4. Datiscetin-3-O-rutinósido 26

RESUMEN

En Ecuador está establecido como política de estado el fortalecer y consolidar la salud intercultural, incorporando medicina ancestral como alternativa al Sistema Nacional de Salud. Con el fin de aportar a esta temática, el presente es un estudio piloto que evalúa la actividad antimicrobiana y caracterizar los metabolitos presentes en el extracto etanólico de *Philodendron heleniae*. Los ensayos de actividad antimicrobiana lograron determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *P. heleniae* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Bacillus subtilis* (Resistente a ampicilina) con valores de 0.1 y 0.2 mg/mL, respectivamente. Se encontró la presencia cualitativa de: terpenos, taninos, quinonas, compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas. Además, se identificó el contenido total de polifenoles y flavonoides con valores de 574.74 y 2.53 µg/mg de extracto etanólico de *P. heleniae*, respectivamente. Estos resultados fueron complementados con la identificación de 19 moléculas (17 nivel II y 2 nivel III) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y 4 (2 nivel I y 2 nivel II) mediante cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS). De manera general los compuestos fenólicos y terpenos fueron las moléculas más abundantes en el extracto etanólico de *P. heleniae* que se sugieren como responsables de su actividad antimicrobial. Estos resultados aportan información interesante para el potencial desarrollo de nuevos productos, sobre todo en la industria farmacéutica.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, Cromatografía, Concentración mínima bactericida (CMB), Concentración mínima inhibitoria (CMI), Compuestos fenólicos.

ABSTRACT

In Ecuador, it is established as a state policy to strengthen and consolidate intercultural health, incorporating ancestral medicine as an alternative to the National Health System. To contribute to this topic, this pilot study evaluates the antimicrobial activity and characterizes the metabolites present in the ethanolic extract of *Philodendron heleniae*. The ethanolic extract of *P. heleaniae* showed a minimal inhibitory concentration of 0.1 mg/ml against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and 0,2 mg/ml against *Bacillus subtilis* (ampicilin resistant). Terpenes, tannins, quinones, phenolic compounds, flavonoids, and anthocyanins were determined qualitatively. In addition, the total content of polyphenols and flavonoids was identified with values of 574.74 and 2.53 µg/mg of ethanolic extract of *P. heleniae*, respectively. Results were complemented with the identification of 19 molecules (17 level II and 2 level III) by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and 4 (2 level I and 2 level II) by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). In general, phenolic compounds and terpenes were the most abundant molecules in the ethanolic extract of *P. heleniae* suggesting to be responsible for its antimicrobial activity. These results provide interesting information for the potential development of new products, especially in the pharmaceutical industry.

Keywords: Antimicrobial activity, Chromatography, Minimum bactericidal concentration (MBC), Minimum inhibitory concentration (MIC), Phenolic compounds

CAPÍTULO I: Introducción

1.1 Antecedentes

Ecuador es uno de los 17 países megadiversos que posee alrededor del 10% de todas las especies de plantas en el mundo [1, 2]. El territorio ecuatoriano está dividido en 3 diferentes regiones: Costa, Sierra y Amazonía [1]. La región Amazónica ecuatoriana representa una de las mayores reservas ecológicas para la humanidad debido a su gran diversidad en flora y fauna, además de los servicios ecosistémicos que provee [1,2]. La Amazonía ecuatoriana está conformada por un 42% del territorio ecuatoriano, caracterizada por el gran número de especies de plantas que alberga [2]. Las plantas medicinales han sido el primer tratamiento usado por las comunidades frente a enfermedades y a su vez para la prevención de las mismas. Existen estudios etnofarmacológicos que describen el uso tradicional de plantas medicinales para distintas enfermedades o dolencias [3, 4]. Investigaciones corroboran que esta región conserva un amplio conocimiento en las cuales se consideran 104 propiedades farmacológicas de 145 especies de plantas medicinales [3]. Incluso en algunos sectores como Alto Pano, en la provincia de Napo, se han identificado 101 especies de plantas medicinales de 54 familias [4].

A pesar de la información etnofarmacológica de las plantas medicinales, hoy en día su caracterización química es de gran importancia, ya que permite relacionar estos componentes con su posible actividad biológica. En diferentes investigaciones se reporta el uso de plantas medicinales como una alternativa herbal para enfrentar diferentes enfermedades, es así como, a través de técnicas de caracterización fitoquímica se ha logrado determinar la presencia de diferentes compuestos con diferentes bioactividades [14]. En la actualidad, varias enfermedades son tratadas gracias al descubrimiento de compuestos a partir de plantas medicinales, evidenciando su papel significativo en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos [11, 12].

Esto se respalda con el hecho de que un extracto vegetal puede contener una alta variedad de metabolitos secundarios, representando un depósito de moléculas de interés farmacológico [11].

Dentro de estas interesantes especies encontramos a *Philodendron heleniae* Croat (*P. heleniae*) que pertenece a la familia Araceae. Es originaria de América central y se encuentra en hábitats de bosque húmedo tropical y lluvioso ubicados en Panamá, Ecuador y Colombia. Esta planta se caracteriza por ser hemiepífita en forma de enredaderas. Sus hojas pueden llegar a medir de 30 a 40 cm y tiende a formar codiformes, gruesas y de color verde oscuro, además no requieren de luz directa del sol para su desarrollo. Presenta raíces aéreas lo que le permite aferrarse a cualquier estructura. En Ecuador *P. heleniae* se encuentra distribuida principalmente en la región amazónica [6, 9, 10].

El género *Philodendron* ha sido partícipe de varios estudios científicos y etnofarmacológicos en los cuales se describe su uso como planta medicinal en diferentes comunidades [3,5]. En la Amazonía ecuatoriana se ha reportado el uso de extractos de tallos y raíces de este género, para tratar el estrés, problemas de vejiga, accidentes ofídicos, además de ser usado como cicatrizante y antihemorrágico [3].

En un estudio en el 2020 en Pará, Brasil, se evaluó el potencial antimicrobiano y antioxidante de *Philodendron megalophyllum* Schott (Araceae). Los ensayos antioxidantes en cultivo celular demostraron que el extracto de *P. megalophyllum* fue capaz de reducir en un 50% los radicales libres DPPH [6]. En cuanto a la actividad antimicrobiana, el extracto inhibió el crecimiento de 10 de los 18 organismos testados [6]. Por otro lado, este género ha sido parte de investigaciones, en donde mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), se han identificado diferentes compuestos como: terpenos, esteroides, flavonoides y alcaloides [9,10], otorgándole un valor agregado a los extractos etanólicos de estas plantas. Además, existen estudios donde para plantas del género *Philodendron* se reporta

actividad antiinflamatoria, antihemorrágica y antiofídica [3, 6, 7, 8]. Sin embargo, no existen estudios específicos con el extracto de *P. heleniae* provenientes de Napo que evalúen la actividad antimicrobiana o caractericen los metabolitos presentes en el extracto etanólico, el cual es el más usado por las comunidades [6]. Por esto, es necesario abordar más estudios del extracto de *P. heleniae* en los cuales se determine los metabolitos que le otorgan sus propiedades farmacológicas con miras a estudios más complejos que sean capaces de catalogar sus componentes como productos fitoterapéuticos.

1.2 Planteamiento del problema

En países donde prevalece el conocimiento ancestral, sobre todo aquellos en vías de desarrollo, aproximadamente el 80% de la población usa plantas medicinales como primera opción de atención sanitaria, tratándose en ocasiones del único tratamiento disponible [2]. La mayoría de estas terapias involucran el uso de extractos de plantas o sus compuestos activos. En este contexto, sólo el 5.2% de las especies utilizadas a nivel mundial cuenta con datos etnofarmacológicos [25, 26]. En Ecuador, un país megadiverso, se han reportado propiedades medicinales en 3118 especies de plantas pertenecientes a 206 familias [3, 15]. Debido a la baja atención sanitaria a nivel regional, el uso de plantas medicinales en la Amazonía ecuatoriana es una de las más altas en Sudamérica [15, 16]. Adicionalmente, debido a que muchas enfermedades son tratadas gracias al descubrimiento de compuestos a partir de las plantas, se ha evidenciado un papel significativo en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos o tratamientos alternativos a partir de estas [12]. En una revisión publicada en el 2012, determinaron que entre 1981 y 2010, el 34% de los medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos eran productos naturales o derivados directos de productos naturales [13]. A pesar de su gran potencial, la mayor parte de investigaciones sobre plantas medicinales en la Amazonía ecuatoriana se centran en el área de la etnomedicina donde se reporta la especie y el uso tradicional [1, 3, 4, 5]. De la misma manera existen muchas plantas medicinales que aún no han sido estudiadas

que podrían ser potenciales recursos para nuevos medicamentos. Es por esto que es apremiante el estudio con enfoques de caracterización e identificación de metabolitos presentes en las plantas medicinales para lograr preservar el conocimiento ancestral y así poder validarlos. Así, el propósito de la ciencia actual se direcciona y se enfoca hacia la transformación del conocimiento ancestral en científico, las costumbres y hábitos en terapias y los preparados o extractos en suplementos o productos farmacéuticos [23]. Por lo tanto, es necesario la identificación completa de los compuestos presentes en el extracto etanólico de *P. heleniae* por ser el más utilizado por las comunidades de la parroquia Sangay provincia de Morona Santiago, para poder establecer una relación entre su composición y actividad biológica aportando así a la validación científica de sus propiedades farmacológicas.

1.3 Justificación de la investigación

En Ecuador se estableció como política de estado el fortalecer y consolidar la salud intercultural, incorporando medicina ancestral como alternativa al Sistema Nacional de Salud, que busca principalmente diseñar y aplicar protocolos para facilitar la implementación progresiva de la medicina ancestral y alternativa, con visión holística, en los servicios de salud pública [23, 24]. En este contexto, el uso etnofarmacológico de extractos de tallos y raíces de plantas del género *Philodendron* en comunidades de la parroquia Sangay provincia de Morona Santiago en la Región Amazónica Ecuatoriana se ha reportado como cicatrizantes, antiofídicos, antiinflamatorios, para tratar el estrés, problemas de vejiga y como un antihemorrágico [3, 6, 12]. Sin embargo, a pesar de su gran potencial etnofarmacológico, hay carencia de análisis profundos sobre su composición química y actividad antimicrobiana en contra de algunos patógenos. En este sentido, con el fin de fortalecer la caracterización e identificación de metabolitos presentes en el extracto etanólico de *Philodendron heleniae* para determinar sus propiedades farmacológicas, este proyecto evaluará la actividad antimicrobiana y caracterizará a través de técnicas espectrométricas de alta resolución los metabolitos presentes en el extracto etanólico de dicha especie.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 General

- Evaluar la actividad antimicrobiana y caracterizar los metabolitos presentes en el extracto etanólico de *Philodendron heleniae*

1.4.2 Específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de *P. helainae* contra diferentes cepas de microorganismos.
- Determinar cualitativamente la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, terpenos, taninos y quinonas en el extracto etanólico de *P. helainae*.
- Cuantificar polifenoles y flavonoides totales presentes en el extracto etanólico de *P. heleniae* por Espectrofotometría UV-Vis.
- Identificar el perfil metabolómico del extracto etanólico de *P. heleniae*(Phe) por cromatografía líquida y gaseosa acoplada a espectrometría de masas

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

2.1 Colecta de material vegetal y elaboración del extracto

La colecta del material vegetal se realizó con la autorización del Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica, número MAATE-DBI-CM-2023-0302. Además, se entregó un espécimen al Herbario Nacional Ecuador del INABIO, número de depósito: QCNE-030-2021, como parte del compromiso del permiso de investigación otorgado. La muestra de la planta *Philodendron heleniae* se recolectó en Tena, Napo, Ecuador (-0.9558024998176364, -77.85684114977904) a pocos kilómetros de la Universidad Regional Amazónica Ikiam (URAI). Se utilizaron bolsas ziploc y un cooler para evitar degradación y pérdida de las propiedades de la planta hasta su llegada a los laboratorios de la URAI para su procesamiento. Se tomó la raíz de *P. heleniae* para proceder a lavarla con agua destilada eliminando tierra y otros residuos presentes. Se realizó un secado que consistió en 48 horas a temperatura ambiente, seguida de una fase de 48 horas a 40°C en una estufa. Finalmente se trituró la corteza obteniendo 109.49 g de raíz seca triturada.

Para la elaboración del extracto etanólico de *P. heleniae* (Phe) se tomaron 100.4 g y se realizó una maceración con 1 L de etanol al 96% y se maceró durante 72 horas, homogeneizando cada 24h. Luego se filtró con ayuda de una bomba de succión usando papel filtro N° 2. El líquido obtenido fue concentrado en un rotavapor, para posteriormente ser liofilizado a -80°C y 120 mTorr (Benchtop Pro 9 L, Omnitronics).

A partir del extracto etanólico crudo se realizó un fraccionamiento del mismo mediante el tratamiento y acondicionamiento de acuerdo a Bajkacz, et al. (2018). Se tomó 1 muestras de 10 mg del extracto etanólico y se disolvió en 1 ml de etanol. Se agito en el vórtex por 1 minuto y se sometió a ultrasonido durante 1 minuto para homogeneizar la muestra. Este procedimiento se realizó por triplicado. Luego, se filtraron 5 ml de

extracto con una capa de algodón purificado con hexano en la base y 600 mg de sílica gel (Sigma-Aldrich) en la parte superior de jeringas como cartuchos de extracción en fase sólida (SPE). Estos se acondicionaron con 15 ml de agua Tipo 1 seguido de 6 ml de etanol y luego se pasó el extracto para realizar el fraccionamiento. Inicialmente, se realizó la fracción acuosa con 10 ml de agua y por último se realizó la elución con 6 ml de etanol en el cartucho, todas las fracciones fueron recuperadas y llevadas hasta sequedad en un concentrador al vacío (Thermofisher). Se realizaron ensayos exploratorios de la actividad antimicrobiana con las fracciones concentradas y se determinó qué fracción es la que tiene actividad.

2.2 Ensayos antimicrobianos

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Candida albicans* ATCC 10231, *Klebsiella pneumoniae* (Resistente a ampicilina), *Bacillus subtilis* (Resistente a ampicilina). El ensayo de actividad antimicrobiana se evaluó inicialmente mediante un ensayo exploratorio de halos de inhibición para la fracción acuosa y etanólica de *P. heleniae* [94]. Seguido a esto, para aquellos microorganismos en los que se identificó actividad, se aplicó el método de microdiluciones en placas de 96 pocillos, siguiendo como base el protocolo descrito por Borroto, con algunas modificaciones [95]. Los microorganismos se cultivaron en caldo Mueller Hinton (MHB) a 37 °C hasta alcanzar 1×10^6 unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL). Se prepararon diferentes concentraciones de extracto etanólico de *P. heleniae* (0.05, 0.10, 0.20, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 mg/mL) usando dimetilsulfóxido (DMSO) 1% como solvente. En la placa de 96 pocillos se incubaron 100 µL de cada concentración del extracto con 100 µL de cada microorganismo a 37°C durante 18 horas. Se usó como control negativo DMSO 1%, y control positivo MHB estéril y antibiótico o antimicótico. Se consideraron 5 réplicas para cada concentración, y cada ensayo se realizó por triplicado. La inhibición de crecimiento y determinación de CMI se midieron con la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm con un espectrofotómetro de microplacas Glomax Discover System (Promega). Para la CMB, 10

uL de cada pocillo fueron sembrados en agar Muller Hinton (MHA) e incubados a 37°C por 18 horas, identificando la concentración mínima bactericida como la menor concentración con ausencia de crecimiento de microorganismos.

2.3 Ensayos fitoquímicos cualitativos y cuantitativos

2.3.1 Determinación cualitativa de flavonoides

Ensayo Shinoda [38]: Se utilizaron 5 mg de extracto etanólico de *P. heleniae* liofilizado disuelto en 1 ml de HCl concentrado con una pequeña cantidad de magnesio metálico. El blanco consistió en 5 gotas de etanol y el control positivo fue 5 mg de Quercetina (Sigma-Aldrich) recibiendo al igual que la muestra el mismo tratamiento. Se dejó reposar 30 min la mezcla y se añadió 1 ml de alcohol isoamílico para luego homogeneizar en el vórtex y dejar en reposo durante 5 minutos. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol isoamílico toma una coloración intensa de: amarillo, naranja, carmelita o rojo.

2.3.2 Determinación cualitativa de terpenoides

Ensayo Salkowski [39]: se midieron 5 mg de extracto etanólico de *P. heleniae* liofilizado y se mezcló con 5 ml de cloroformo mediante vórtex. Luego, a la mezcla se le adicionaron 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Para el blanco se utilizó etanol y para el control positivo se utilizó una solución concentrada de vitamina A, ambos controles recibieron el mismo tratamiento de las muestras. Se considera el ensayo positivo para terpenoides cuando se genera una coloración marrón rojiza en la interfase [39].

2.3.3 Determinación cualitativa de alcaloides

Ensayo Dragendorff [40]: Se pesaron 5 mg de extracto etanólico de *P. heleniae* liofilizado, el cual fue disuelto en 2 ml de HCl al 10% (m/v), homogeneizando en el vórtex durante 5 min y se recuperó el sobrenadante. Dicha preparación se realizó por triplicado y se usó para el ensayo de Dragendorff. Para el blanco se utilizó etanol y el control positivo se realizó con 5 mg de atropina, recibiendo ambos el mismo tratamiento que el extracto etanólico de *P. heleniae*. A todas las muestras se les ajustó el pH a 6 con una solución de amoníaco diluído. Luego, se colocaron 5 gotas del reactivo comercial Dragendorff (Sigma-Aldrich) según corresponda para cada muestra. El ensayo se considera positivo para alcaloides cuando se tiene una coloración marrón rojizo en ambos casos [40].

2.3.4 Determinación cualitativa de taninos

Para la determinación cualitativa de taninos se realizó la prueba del cloruro férrico (FeCl_3) [42]: Se tomaron 5mg de extracto etanólico de *P. heleniae* liofilizado y se diluyó en 5 ml etanol, luego se agregó 1 ml de agua destilada y se mezcló con la ayuda del vórtex. Se agregaron 0.3 ml de cloruro de sodio al 10% y finalmente se agregó 3 gotas de FeCl_3 al 10%. Se utilizó etanol para el blanco y como control positivo se realizó una solución etanólica de ácido tánico (1 mg/mL). La prueba fue considerada negativa al no tener un cambio de color a negro, gris, negro azulado o un color café.

2.3.5 Determinación cualitativa de quinonas

Ensayo de Borntrager [43]: En un tubo de ensayo se colocó una alícuota de 5 ml de extracto etanólico de *P. heleniae* y se sometió a baño maría por 5 minutos. Se resuspendió el residuo en 1 ml de cloroformo, luego se añadió 1 ml de hidróxido de potasio y se mezcló en un vórtex. Se dejó reposar por 3 minutos y se observó si existe cambio de coloración. Para el control negativo se utilizó etanol y como control positivo

se realizó una solución de 5 mg de hidroquinona en 5 ml de etanol. El ensayo se considera positivo para quinonas cuando existe una coloración rosada o roja.

2.3.6 Determinación cualitativa de compuestos fenólicos

Ensayo del cloruro férrico (FeCl_3) [44]: Se midieron 5 mg de extracto etanólico de *P. heleniae* liofilizado y se disolvió en 5 ml de etanol. Se usó 1 ml de etanol como blanco y 6 mg de Quercetina en 5 mL de etanol como control positivo. Luego, en cada una de las muestras se colocaron 5 gotas de solución de FeCl_3 al 1% (m/v) y se observó la coloración de las mismas. Si se observa una coloración verde, púrpura, azul o negro se considera al ensayo como positivo para polifenoles.

2.3.7 Cuantificación de polifenoles totales

El método usado para la cuantificación de polifenoles totales en el extracto etanólico de *P. heleniae* fue un protocolo estandarizado del laboratorio de Química 1 de la Universidad Regional Amazónica Ikiam con modificaciones detalladas a continuación [44]. Se realizó una curva de calibración con una solución madre de ácido gálico de 5 mg/ml: 25, 50, 125, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g/ml}$. Se usó una concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico como control positivo para el cálculo del porcentaje de recuperación. De manera semejante que el estándar, la muestra se preparó diluyendo 5 mg del extracto etanólico liofilizado de *P. heleniae* en 5 ml de etanol. En todos los casos, se tomaron 100 μl de la muestra para mezclarlos con 860 μl de agua destilada y 40 μl del reactivo comercial Folin-Ciocalteu (Supelco®), dejando en reposo durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 100 μl de agua destilada seguido de 100 μl de carbonato de sodio al 7 % (Na_2CO_3) y se dejó en reposo por 60 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro (SHIMADZU UV-1280) a una longitud de 750 nm. Se expresó el contenido de fenoles totales en la planta como μg de polifenoles totales con base a ácido gálico por mg de extracto etanólico liofilizado de *P. helainae*. Tanto la

muestra y las diferentes concentraciones de la curva de calibración se realizaron por triplicado para la expresión de resultados en promedio y desviación estándar ($\bar{x} \pm S$).

2.3.8 Cuantificación de flavonoides totales

Se utilizó el método estandarizado del laboratorio de Química 1 de la Universidad Regional Amazónica Ikiam para la cuantificación de flavonoides totales en el extracto etanólico con algunas modificaciones [43]. Se realizó una curva de calibración con una solución madre de 5 mg de quercetina disuelta en 10 ml de metanol, tomando los siguientes intervalos: 1, 2.4, 4.8, 6.7, 8.6, 10.5, 12.4 y 14.3 $\mu\text{g/ml}$. Se usó una concentración conocida de quercetina (11.4 $\mu\text{g/ml}$) como control positivo. Se diluyó 4 mg extracto etanólico de *P. heleniae* liofilizado en 4 ml de etanol. Se tomó 1 ml de la muestra y se mezcló con 1 ml de cloruro de aluminio (2%) dejándolo reposar durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo de reposo, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 435 nm en un espectrofotómetro (SHIMADZU UV-1280). Se realizaron correcciones de absorbancia midiendo las muestras reemplazando AlCl_3 por metanol. Se tomó como absorbancia, la diferencia de absorbancias de con y sin AlCl_3 . Los flavonoides totales presentes en la muestra se expresaron en μg de flavonoides totales con base en quercetina por mg de extracto etanólico liofilizado de extracto etanólico de *P. heleniae*. Las muestras y las diferentes concentraciones de la curva de calibración se realizaron por triplicado para la expresión de resultados en promedio y desviación estándar ($\bar{x} \pm S$).

2.4 Identificación de compuestos en el extracto etanólico por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

2.4.1 Preparación de la muestra

Se preparó el extracto etanólico de *P. heleniae* mediante el tratamiento y acondicionamiento de acuerdo a Bajkacz [95], con las siguientes modificaciones. Se tomaron 4 muestras de 10 mg del extracto etanólico y se disolvieron en 1 ml de etanol. Se agitaron en el vórtex por 1 minuto y se sometió a ultrasonido durante 1 minuto para la homogeneización de la muestra. Este procedimiento se realizó por triplicado. Luego,

se filtraron 5 ml de extracto con una capa de algodón purificado con hexano en la base y 600 mg de sílica gel (Sigma-Aldrich) en la parte superior de jeringas como cartuchos de SPE. Estos se acondicionaron con 15 ml de agua Tipo 1 seguido de 6 ml de etanol y luego se pasó el extracto para realizar el fraccionamiento. Inicialmente, se realizó la fracción acuosa con 10 ml de agua y por último se realizó la elución con 6 ml de etanol en el cartucho, todas las fracciones fueron recuperadas y llevadas hasta sequedad en un concentrador al vacío (Thermofisher). Finalmente, se resuspendieron las muestras en 1 ml de etanol y se tomó en una relación 1:1 500 μ L de la muestra resuspendida con 500 μ L de etanol para obtener un volumen final de 1 ml por muestra en cada vial. Inyectándose finalmente la fracción acuosa, fracción etanólica y extracto crudo etanólico. Para garantizar el buen funcionamiento del equipo se realizó un pool de todas las muestras o QC (quality control) con 100 μ L de cada muestra, de esta manera se verificó la reproducibilidad y precisión de los resultados experimentales en el GC-MS.

2.4.2 Condiciones instrumentales

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo gaseoso (SHIMADZU, Nexis GC 2030) acoplado a un espectrómetro de masas (SHIMADZU, GCMS QP2020 NX). La temperatura inicial del horno fue de 70°C, el cual se aumentó a 6°C/min hasta 300°C y se mantuvo durante 10

minutos para un tiempo total de corrida de 47.45 minutos. La temperatura del puerto de inyección y la línea de transferencia se mantuvieron a $T = 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente, con helio ultra puro como gas portador, a un flujo inicial de 1 mL/min. El análisis se efectuó en el modo de ionización por impacto de electrones (EI). La fuente de ionización MS se ajustó a 200°C y el rango de barrido de masas fue de 50 a 500 Da. Se realizaron 4 réplicas de las muestras, donde una de las muestras contenía cafeína como estándar interno. Además, se trabajó con un estándar de n-Alcanos (Restek, Qualitative Retention Time Index Std) para obtener el nombre y tiempo de retención de cada compuesto por medio de Van Dool Kratz y su uso posteriormente.

2.4.3 Tratamiento de datos

Los datos espectrales fueron obtenidos en 2 diferentes software: MZmine(versión 3.6.0) y MSDIAL (versión 4.9.221218). Para ambos softwares se transformaron los archivos Shimadzu .qgd a formato .mzXML con el programa GCMSsolution. Posteriormente, los datos espectrales brutos del archivo (*.mzML) se convirtieron a *.mzML utilizando ProteoWizard (parámetros disponibles en la información de apoyo).

Los datos obtenidos fueron cargados en el software MZmine (versión 3.6.0), los parámetros usados para el cromatograma fueron los siguiente: ruido cromatográfico MS1 de 20, con un módulo generador de cromatogramas (ADAP Chromatogram Builder) o Cromatogramas de Iones Extraídos (EIC, por sus siglas en inglés) con un mínimo de scans consecutivos de 5, una intensidad mínima de scans de 60, una altura absoluta mínima de 140 y una tolerancia de 0.1 m/z. Para la deconvolución de los picos cromatográficos, se usó el módulo de resolver la función del ADAP (ADAP Feature resolver) del cromatograma con lo siguiente parámetros: umbral (S/N) de 3, una anchura del pico de 3, una altura de 50, un área de 100 y un rango de la duración del pico de 0 a 1. La deconvolución de los espectros (Hierarchical clustering) se realizó con los siguientes parámetros: rango (grupo) de distancia de 0.1 min, con un tamaño mínimo de 2, y una

intensidad de 100. Finalmente, se sustrajeron los picos de los blancos (500 % de intensidad) y se alinearon los 4 cromatogramas.

Con MS-DIAL (<http://prime.psc.riken.jp/>) se analizaron los datos (mzML) con los siguiente parámetros: rango de escaneo de masas de 50 A 500 Da, rango del tiempo de retención de 4,5 a 48 minutos, parámetros de detección de picos (Ruido cromatográfico) con un mínimo de altura de 100 de amplitud, deconvolución de datos MS1 de 0.5, con corte espectral EI de 20 amplitud, usando parámetros de identificación del índice de retención tipo alcanos, los datos se alinearon con una tolerancia del tiempo de retención de 0.1 min, una tolerancia de m/z de 0.5 Da y un corte de similaridad mínimo del 90%. Los datos fueron alineados con una tolerancia de similaridad del 70% y finalmente se sustrajeron los picos del blanco con un filtro de recuento de picos mínimos del 60%. Además, se utilizó la biblioteca de estándares propio del software.

2.4.4 Identificación de metabolitos

Los datos obtenidos de MZmine se exportaron a la página Global Natural Products Social Networking (GNPS) para la identificación de metabolitos mediante el algoritmo MOLECULAR-LIBRARYSEARCH-GC con los siguientes parámetros: Se utilizaron los archivos obtenidos por MZmine con los espectros en formato MGF y la tabla de cuantificación con la abundancia de los picos (altura) en formato csv. Se utilizó la opción del índice de retención de Van Dool Kratz, colocando el tiempo de retención de cada alcano en un archivo csv. Se tomó una tolerancia de la fragmentación de iones de 0.7 Da, un mínimo de match de pico de 6 y un porcentaje de cosine (limite) de 0.7. Los parámetros avanzados se podrán corroborar en el link del trabajo de la página GNPS (ID=de41940d64c54be0ab31cf4689c5b8f2) para los datos obtenidos de MZmine.

Además, la identificación en MS-DIAL se llevó a cabo con la librería: GC-MS DB-Public-KovatsRI-VS3 (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>) con los siguientes

parámetros: tolerancia del índice de retención de 20 unidades, tolerancia de m/z de 0.5 Da y similitud de corte en el EI del 70%.

Una vez finalizada la identificación de compuestos en GNPS, se realizó el curado de la identificación teniendo en cuenta los siguientes parámetros: El metabolito tendrá un porcentaje de coseno igual o mayor que 0.7, los índices de retención calculados por GNPS se compararon con los índices de retención teórico buscado en diferentes bases de datos (Pubchem, Chempider y Massbank), teniendo en cuenta que este no difiera por más de 20 unidades, para los que cumplen con nivel de identificación 2, los cuales cumplen con el match por fragmentos obtenidos, mientras que se aceptó hasta 200 unidades para nivel de identificación 3, siendo estos los que tenían match con la masa molecular del compuesto [37]. Además, se confirmó que los índices de retención teóricos correspondían a la columna utilizada (semi-standar-nopolar). Finalmente, se verificó en el cromatograma del blanco que los metabolitos identificados no sean contaminantes o formen parte del mismo.

2.5 Identificación de compuestos en el extracto etanólico de *Philodendron heleniae* mediante cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS)

2.5.1 Preparación de muestra

Se preparó el extracto etanólico de *P. heleniae* mediante el tratamiento y acondicionamiento de acuerdo a Bajkacz, et al. (2018), con las siguientes modificaciones. Se tomaron 4 muestras de 10 mg del extracto etanólico y se disolvió en 1 ml de etanol. Se realizó vórtex por 1 minuto y se sometió a ultrasonido durante 1 minuto para la homogeneización de la muestra. Se realizó tres veces este procedimiento y luego se aforaron las muestras a 10 ml. Se filtraron 5 ml de extracto con una capa de algodón purificado con hexano en la base y 600 mg de sílica gel (Sigma-Aldrich) en la parte superior de jeringas como cartuchos SPE (extracción en fase sólida). Se

acondicionaron los cartuchos con 15 ml de agua seguido de 6 ml de etanol. Luego se pasó el extracto, causando la elución de la fracción acuosa con 10 ml. Luego se procedió a la elución de la fracción etanólica con 6 ml de etanol. Ambas fracciones fueron recuperadas y llevadas hasta sequedad en un concentrador al vacío (Thermofisher). Seguidamente, se resuspendieron las muestras en 1 ml de etanol y se tomó en una relación 1:1 500 μ L de la muestra resuspendida con 500 μ L de agua tipo II para obtener un volumen final de 1 ml por muestra en cada vial. Finalmente se inyectaron tanto la fracción acuosa, como la etanólica y el extracto crudo. Para garantizar el buen funcionamiento del equipo se realizó un pool de todas las muestras o QC (quality control) con 100 μ L de cada muestra para verificar la reproducibilidad y precisión de los resultados experimentales en el UPLC-MS/MS.

2.5.2 Programación del equipo

El análisis para la determinación de los componentes se llevó a cabo por Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia (UPLC, Waters, clase 1) acoplada a espectrometría de masas de tandem (Q-TOF, Waters, clase Xevo G2). La fase móvil consistió en dos disolventes A y B. La fase móvil A: ácido fórmico al 0.1% disuelto en agua y la fase móvil B: ácido fórmico al 0.1 % disuelto en acetonitrilo. El gradiente fue de 1% B (0 min), 1% de disolvente B (0.5 min.), 100% de B (8 min), 100% de B (9 min), 1% B (9.01 min) y 1% B (10 min), con un caudal de 0.500 ml/min, el volumen de inyección fue de 10 μ L. En cuanto a la ionización por electropulverización (ESI), se realizó en modo negativo y positivo para el análisis de masas con las siguientes condiciones: voltaje de AT 3,5 kV; capilar 7 μ A; voltaje de la boquilla 500 V; delta EMV 300 V; flujo de gas 5 ml/min; temperatura del gas 350 °C; presión del nebulizador 45 psi; temperatura del gas envolvente 350 °C; flujo de gas envolvente 11 ml/min; rango de escaneo 100–1200 m/z; modo de adquisición de datos DDA considerando los diez iones más abundantes.

2.5.3 Preparación de los estándares

Se prepararon 50 ml de soluciones madres de ácido gálico, catequina, quercetina y kaempferol a concentración de 100000 ng/ml. A partir de estas se prepararon 10 ml de soluciones estándares a 10000 ng/ml. Los estándares se utilizaron para la optimización de los parámetros del UPLC-MS/MS, así como el error en ppm del mismo. Para ello se verificó la presencia de los estándares en el cromatograma tomando en cuenta la m/z y el tiempo de retención, obteniendo finalmente un valor en ppm de 2.80 ppm (ácido gálico), 3.33 ppm (catequina), 3.0 ppm (quercetina), 2.73 ppm (kaempferol), los resultados corroboran la debida calibración del equipo. Adicionalmente, se prepararon estándares de rutina y epicatequina con la finalidad de realizar una identificación a nivel 1 de estos componentes en la muestra.

2.5.4 Tratamiento de datos

Los datos DDA (MS2) se evaluaron a una polaridad negativa a 20 eV. Los datos (*.raw) de Waters fueron cargados en el programa MSConvert para transformar a centroide y a formato (*.mzML) y poder ser usada en el software MS-DIAL (versión 4.9). Se utilizó catequina y kaempferol como controles positivos que guiarán el proceso de identificación. Los parámetros usados fueron: ruido cromatográfico MS1 de 1000, ruido de espectros MS2 de 20 y se sustrajeron los picos de los blancos (500 % de intensidad), finalmente los datos obtenidos se analizaron en la misma biblioteca del software.

2.5.5 Análisis estadísticos y gráficas

Todos los análisis de los ensayos de cuantificación de polifenoles y flavonoides totales por espectrofotometría se realizaron por triplicado para obtener los promedios y desviación estándar. Adicionalmente se calcularon los parámetros analíticos de calidad

para la validación son: límite de detección, límite de cuantificación, y porcentaje de recuperación (%R).

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Ensayos antimicrobianos

En el ensayo exploratorio de actividad antimicrobiana la fracción etanólica de *P. heleniae* presentó actividad antimicrobiana frente a dos de los cinco microorganismos analizados, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, mientras que la fracción acuosa no presentó actividad en la concentración evaluada (12.5mg/mL).

Seguidamente, los ensayos de determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) para el extracto activo (Etanólico), mostraron a la CMI más baja frente al patógeno *S. aureus* (0.1 mg/mL).

Tabla 3 - 1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de la fracción etanólica y acuosa de *P. heleniae* contra diferentes microorganismos.

Microorganismos	Muestra			
	Fracción etanólica		Fracción acuosa	
	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.1	0.1	>12.5	>12.5
<i>Candida albicans</i>	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5
<i>Bacillus subtilis</i> *	0.2	0.2	>12.5	>12.5

*Resistente a ampicilina. **Realizado por:** Sacoto, 2024.

3.2 Ensayos fitoquímicos cualitativos del extracto etanólico de *P. heleniae*

Los ensayos fitoquímicos cualitativos del extracto etanólico de *P. heleniae* evidenciaron la presencia de terpenos, taninos, quinonas, compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas. En la tabla 3-2. se pueden observar cada grupo de compuestos presente en el extracto según sus abundancias relativas.

Tabla 3 - 2. Ensayos fitoquímicos en el extracto etanólico de *P. helaniae*.

Fitoquímicos	Abundancia
Alcaloides	-
Terpenoides	++
Taninos	+++
Quinonas	++
Compuestos fenólicos	++
Flavonoides	+++

Donde: (-) Ausencia, (+) Leve (++) Media (+++) Abundante. **Realizado por:** Sacoto, 2024.

3.3 Ensayos fitoquímicos cuantitativos del extracto etanólico de *P. heleniae*

Los resultados para el ensayo de cuantificación de polifenoles se obtuvieron mediante una curva de calibración de ácido gálico bajo la siguiente ecuación: $Y = 0.0042x - 0.116$ y $R^2 = 0.9939$, el límite de detección (LD) fue 0.97 µg/ml, el límite de cuantificación (LQ) de 3.25 µg/ml y el porcentaje de recuperación del control positivo de 92.79 %.

Por otro lado, el contenido de flavonoides presente en el extracto etanólico de *P. heleniae* se cuantificaron mediante una curva de calibración de quercetina con ecuación de la recta: $0.0381x - 0.0411$ y $R^2 = 0.9709$, con LD = 0.094µg/ml, LQ = 0.315 µg/ml y porcentaje de recuperación del control positivo 92.87 %. El contenido de flavonoides y polifenoles totales presentes en el extracto fue de 2.5307 ± 0.2 µg y 574.74 ± 0.9 µg respectivamente.

Tabla 3 - 3. Ensayos cuantitativos del contenido de polifenoles y flavonoides totales en el extracto etanólico de *P. heleniae*

Metabolito	µg/mg de Phe	Límite de cuantificación µg/ml
Polifenoles	574.74 ± 0.9	3.25
Flavonoides	2.5307 ± 0.2	0.315

Donde: El contenido de polifenoles fue expresado en µg de polifenoles totales con base en Ácido gálico por mg de extracto etanólico de *P. heleniae*. El contenido de flavonoides fue expresado en µg de flavonoides totales con base en quercetina por mg de extracto etanólico de *P. heleniae*. El resultado fue el promedio de tres repeticiones y desviación estándar ($\pm \sigma$). **Realizado por:** Sacoto, 2024.

3.4 Identificación de metabolitos presentes en el extracto etanólico de *P. heleniae*: GC-MS.

La figura 1 muestra el cromatograma de cada fracción (a) acuosa, (b) etanólica y (c) extracto crudo, mientras en la tabla 3-4. se presentan los compuestos identificados.

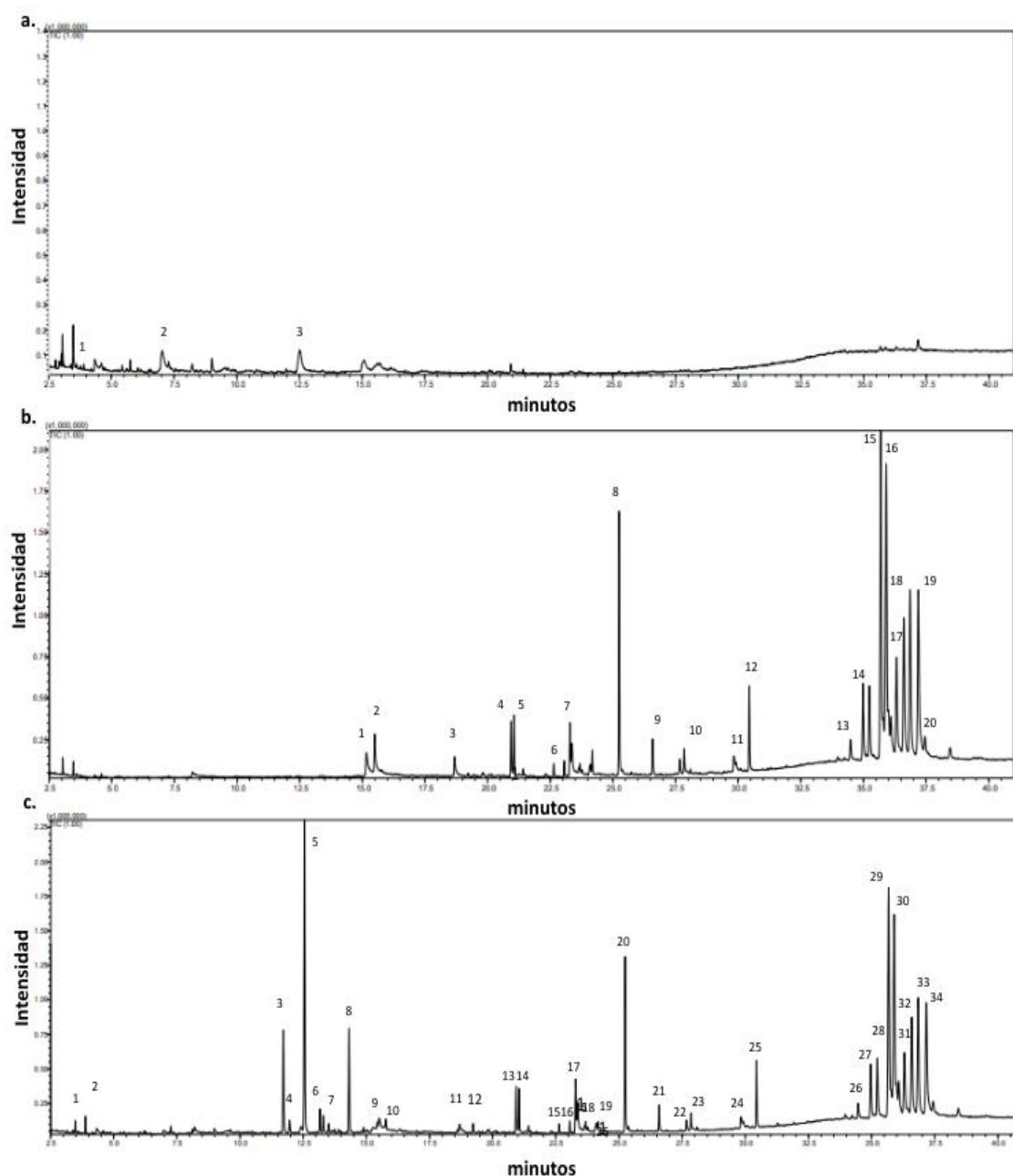


Figura 3 - 1. a) Cromatograma de la fracción acuosa: 1. 2-terc-butilciclohexonona, 2. Desconocido, 3. Desconocido b) Cromatograma de la fracción etanólica: 1. Desconocido, 2. fitano, 3. Anhídrido 5-nitroisatoico, 4. Ácido esteárico, 5. Estearato de etilo, 6. (Z)-9-tricoseno, 7. (11Z,14Z,17Z)-icosa-11,14,11- trienoato de metilo, 8. Eicosil isobutil éter, 9. Desconocido, 10. Eicosil Etil éter, 1-3 propanodiol, 11. Monolinoleato de glicerilo, 12. Desconocido, 13. 6-metoxi-2,7,8-trimetil-2-2(4,8,12-trimetiltridecil)cromano, 14-20. Desconocido. c) Cromatograma del extracto crudo de *P. heleniae*: 1. Desconocido, 2. 2-terc-butilciclohexonona, 3. 3-(4-hidroxifenil) propionitrilo, 4. Desconocido, 5. Desconocido, 6. Guai-1(10)-en-11-ol, 7. Desconocido, 8. 5-Azulenemetanol, 1,2,3,4,5alfa,6,7,8-octahidro-alfa, alfa,3beta,3beta,8beta-tetrametil-, acetato, 9. Fitano, 10. (-)-Isolongifolol, Chlorodifluoroacetato, 11. Desconocido. 12. Anhídrido 5-Nitroisatoico, 13. Ácido esteárico, 14. Estearato de etilo, 15. (Z)-9-tricoseno, 16. Desconocido, 17. (11Z,14Z,17Z)-icosa-11,14,11- trienoato de metilo, 18. desconocido, 19. Desconocido, 20. Eicosil

isobutil éter, 21. Desconocido, 22. Eicosil Etil éter, 1-3 propanodiol, 23. Desconocido, 24. Monolinoleato de glicerilo, 25. Desconocido, 26. 6-metoxi-2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetiltridecil) cromano, 27-34. Desconocido.

Como se aprecia en la figura 1 en el cromatograma de la fracción acuosa se observaron 3 picos de los cuales se identificó 1. Se observaron 20 picos en el cromatograma de la fracción etanólica, sin embargo, se identificaron 10 metabolitos. Por último, en el cromatograma del extracto crudo se observan 34 picos, de los cuales se identificaron 15 metabolitos (Figura 1).

Se identificaron un total de 19 moléculas que cumplen los parámetros como se muestra en la tabla 3-3, 17 de nivel II y 2 de nivel III.

Tabla 3 - 4. Metabolitos identificados en el extracto etanólico de *P. heleniae* mediante GC-MS.

#	IL	Identificación	Nombre	Subclase	% M	Rt (min)	RI (E)	Fracción	RI (T)
1	II	MZmine	Anhidrido 5-Nitroisatoico	Compuesto Heterocíclico	82	18.69	2004	EtOH	2000
2	II	MZmine	Ácido 4-hidroxi-3-bitrofenilacético	Compuesto fenólico	74	15.50	1801.8	EtOH	1805
3	II	MZmine	DL-alfa-Tocoferol	Compuesto fenólico	71	34.49	3123	EtOH	3130
4	III	MZmine	Nitromalonato de dimetilo	Éster	71	6.21	1289	EtOH	1259
5	III	MZmine	S-metilcisteína	Aminoácido	75	7.07	1335	EtOH	1294
6	II	MS-DIAL	3-(4-hidroxifenil) propionitrilo	Compuesto aromático	74	11.74	1585.4	EtOH	1570
7	II	MS-DIAL	Guai-1(10)-en-11-ol	Terpenoide	83	13.30	1672.7	EtOH	1667
8	II	MS-DIAL	5,Azulenemetanol,1,2,3,4,5ala,6,7,8-octahidro-alfa,alfa,3beta,3beta,8beta-tetrametil-,acetato	Sesquiterpeno	84	14.32	1731.6	EtOH	1727
9	II	MS-DIAL	Fitano	Diterpeno	87	15.45	1798.2	EtOH	1795

10	II	MS-DIAL	Isolongifolol, chlorodifluoroacetate	Terpenoide	81	15.77	1818.3	EtOH	1823
11	II	MS-DIAL	Ácido esteárico	Ácido graso saturado	79	20.93	2158.7	EtOH	2172
12	II	MS-DIAL	Estearato de etilo	Éster graso	85	21.42	2193.8	EtOH	2195
13	II	MS-DIAL	(Z)-9-tricoseno	Feromona	80	22.64	2267.4	EtOH	2275
14	II	MS-DIAL	(11Z,14Z,17Z)-icosa-11,14,11-trienoato de metilo	Éster de ácido graso	81	23.38	2311.1	EtOH	2305
15	II	MS-DIAL	Eicosil isobutil éter	Éter Alquílico	82	25.38	2430.4	EtOH	2426
16	II	MS-DIAL	Eicosil Etil éter, 1-3 propanodiol	Éter de polipropilenglicol	85	27.67	2566.9	EtOH	2571
17	II	MS-DIAL	Monolinoleato de glicerilo	Éster de glicerol	82	29.83	2695.4	EtOH	2626
18	II	MS-DIAL	6-metoxi-2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetiltridecil) cromano	Compuesto fenólico	82	34.50	2973.6	EtOH	2700
19	II	MS-DIAL	2-terc-butilciclohexano	Cetonas	84	3.90	1151	H2O	1157

Donde: IL, Nivel de identificación dos II. Nivel de identificación tres III, Programa en el que se identificó el metabolito. %M, porcentaje de similaridad. RT, tiempo de retención. RI(E), índice de retención experimental. RI(T), índice de retención teórico. **Realizado por:** Sacoto, 2024.

3.5 Identificación de metabolitos presentes en el extracto etanólico de *P. heleniae*: LC-MS

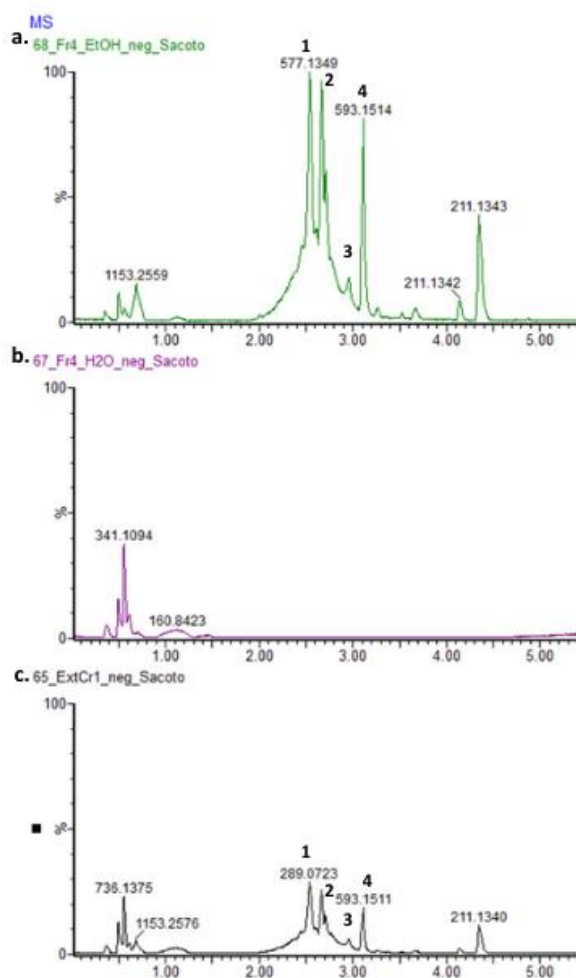


Figura 3 - 2. a) Cromatograma de la fracción etanólica: 1. Procianidina B1, 2. Epicatequina, 3. Rutina, 4. Datiscetin-3-O-rutinósido. b) Cromatograma de la fracción acuosa; c) Cromatograma del extracto crudo: 1. Procianidina B1, 2. Epicatequina, 3. Rutina, 4. Datiscetin-3-O-rutinósido

La figura 2 muestra el cromatograma de cada fracción (a) etanólica, (b) acuosa y (c) extracto crudo. Como es posible observar, estos compuestos son los predominantes en los cromatogramas, además de lograr ser identificados.

La tabla 3-5 resume los compuestos identificados en el extracto etanólico de *P. heleniae* por LC-MS. Se identificaron 2 metabolitos de nivel I y 2 metabolitos de nivel II.

Tabla 3 - 5. Metabolitos identificados en el extracto etanólico de *P. heleniae* mediante LC-MS.

IL	RT	[M-H] (m/z)	Fracción	Fórmula molecular	Δm (ppm)	MS2 (score) (%)	Subclase	Identificación
II	2.54	577.13	EtOH	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	1.0	91.9	Flavonoide	Procianidina B1
II	3.12	593.15	EtOH	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	0.02	92.7	Flavonoide	Datiscetin-3-O-rutinósido
I	2.93	609.14	EtOH	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	2.0	-	Flavonoide	Rutina
I	2.62	290.07	EtOH	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	1.0	-	Flavonoide	Epicatequina

Donde: IL, Nivel de identificación. I, nivel de identificación uno. II, Nivel de identificación dos II. [M-H](m/z), masa molecular. Δm (ppm), diferencial de masa monoisotópica. MS2(score), porcentaje de similitud de espectro. **Realizado por:** Sacoto, 2024.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

En el género *Philodendron*, se ha reportado la acción de extractos de hexano, agua y metanol de algunas especies como *Philodendron megalophyllum*, frente a cepas de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* [6, 97]. En un estudio realizado en Brasil en el 2019, se determinó la actividad antimicrobiana de extractos de etanol y acetato de etilo de *Philodendron bipinnatifidum* con diferentes solventes frente a las cepas de *Streptococcus pyogenes* (3.2 mg/ml en CMI y CMB), *E. faecalis* (10 mg/ml en CMI y CMB 10) y *Listeria monocytogenes* (10 mg/ml en CMI y CMB 10) [98]. Sin embargo, no se han reportado estudios de actividad antimicrobial en extractos etanólicos de *P. heleniae*, siendo este el primer reporte, donde se demostró la actividad contra cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y *Bacillus subtilis* (Resistente a la ampicilina) con valores de CMI de 0.1 y 0.2 mg/mL, respectivamente. Aunque el extracto etanólico de *P. heleniae* fue capaz de inhibir el crecimiento de menor cantidad de microorganismos que otras especies del mismo género, es importante recalcar que además de tratarse de otra especie se han utilizado otros solventes en la preparación de los extractos, factor que puede influir en la extracción de metabolitos que promuevan la actividad antimicrobial [159].

La diversidad de grupos de metabolitos identificados cualitativamente en el extracto etanólico de *P. heleniae* mediante los ensayos fitoquímicos, demuestran la presencia abundante de taninos y flavonoides (Tabla 3-2). Esto es importante ya que diferentes investigaciones relacionan los taninos con la actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas de microorganismos como *S. aureus*, *E. coli* y *Pseudomona aeruginosa* [99, 100, 101]. Los flavonoides suelen ser utilizados como antibacterianos, ya que causan daño contra la membrana, inhiben enzimas y son quelantes de metales pesados (generando estrés oxidativo, inactivación de enzimas y escases de metales esenciales para el microorganismo) [124, 126, 127, 128, 129]. Además, se relacionan con diversos

efectos terapéuticos como: antihelmínticos, antioxidantes y antivirales [100, 101]. Por otro lado, los flavonoides son compuestos heterocíclicos que también contienen oxígeno en su estructura y se ha reconocido que tienen un efecto prometedor con la actividad antibacteriana frente a cepas resistentes a los fármacos [102, 103]. La ausencia de información sobre la fitoquímica de las raíces de la planta *Philodendron heleniae* limita su comparación con otras investigaciones, sin embargo, existen estudios científicos y etnofarmacológicos de otras especies del mismo género en donde se ha reportado la presencia de cumarinas, ácidos grasos y taninos hidrolizados en sus raíces [6, 58]. En 2014 en Santander, oeste de Pará, Brasil, se realizó un análisis fitoquímico por cromatografía de capa fina (TLC) al extracto acuoso de *P. megallophyllum* donde se observó presencia de ácidos grasos, terpenos, taninos condensados y taninos hidrolizados [58].

Adicionalmente en los ensayos cuantitativos de polifenoles totales se identificó mayor cantidad de polifenoles que en especies pertenecientes a la misma familia (*Aráceas*) como *Amorphophallus konkanensis* Hett y *Amorphophallus bulbifer* que reportan concentraciones de 0.01725 mg y 0.01432 mg equivalentes de ácido gálico por g (mg GAE mg⁻¹) de polvo seco de extracto, respectivamente [174]. En cuanto a los flavonoides no existen estudios cuantitativos de flavonoides totales en extractos etanólicos del género *Philodendron*, sin embargo, estudios de extractos etanólicos de otras especies pertenecientes a la misma familia como *Amorphophallus paeoniifolius*, reportan valores mayores a los determinados en el extracto etanólico de *P. heleniae* con 0.01803 mg equivalente a quercetina por g de polvo seco de extracto [194]. Adicionalmente, existen estudios donde los extractos ricos en polifenoles y fracciones de polifenoles demuestran su actividad antimicrobiana [113, 114, 115, 128, 176]. Los polifenoles tienen esta capacidad debido a su interacción con las membranas celulares y proteínas de los microorganismos, causando alteraciones en la integridad celular y la inhibición de enzimas clave [175, 176]. Estos compuestos pueden generar especies reactivas de oxígeno que dañan componentes celulares críticos, desnaturalizar proteínas, y alterar la

permeabilidad de la membrana, lo que lleva a un desequilibrio osmótico y muerte celular [114, 127, 128, 175].

Para identificar las moléculas responsables de la actividad antimicrobiana observada en el extracto crudo etanólico de *P. heleniae*, se realizó un fraccionamiento en dos partes: una fracción acuosa y una fracción etanólica. Posteriormente, se evaluó la actividad biológica de cada fracción, determinando que solo la fracción etanólica y el extracto crudo original presentaban actividad antimicrobiana. Ambas fracciones en conjunto con el extracto crudo fueron analizadas tanto por GC-MS como por LC-MS.

En primera instancia el análisis mediante GC-MS, que favorece la identificación de metabolitos volátiles y semivolátiles, permitió identificar 21 metabolitos (Tabla 3-4). Mientras en LC-MS se logró identificar 4 metabolitos (Tabla 3-5).

Todos los compuestos identificados por GC-MS (Tabla 3-4) están presentes en el extracto etanólico, a excepción de la 2-terc-butilciclohexanona. Se sugiere que esta última molécula puede estar involucrada en procesos distintos a la actividad antimicrobial ya que la fracción acuosa del extracto en donde se identificó, no mostró actividad frente a ninguna de las cepas de microorganismos en las concentraciones evaluadas (Tabla 3-1). A su vez, no se descarta la posibilidad de que pueda ser una molécula activa, pero en comportamiento sinérgico con otras moléculas o en otras condiciones [187, 188].

Entonces, se presume como principales responsables de la actividad antimicrobiana observada a los compuestos Anhídrido 5-nitroisatoico, 4-hidroxi-3-nitrofenilacético, alfa tocoferol, Guai-1(10)-en-11-ol, fitano, ácido estearico, (Z)-9-tricoseno, monolinoleato, ya que además de los resultados obtenidos en el presente estudio, diferentes investigaciones ya han demostrado la actividad antimicrobiana de estas moléculas contra patógenos como *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *B. subtilis* [79, 106, 113, 117, 140, 143, 146, 147, 148, 165, 171, 172, 177, 178]. De manera similar sucede con las moléculas identificadas en LC-MS (Tabla 5) pertenecientes a la fracción etanólica como la rutina,

epicatequina, procianidina B1 y el datiscetin-3-O-rutinósido para los cuales se ha reportado propiedades antimicrobianas contra microorganismos como *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *B. cereus* [157, 160, 162, 164, 165, 167, 172, 178, 179, 180]. De forma más específica podemos mencionar a los compuestos que han reportado actividad antimicrobiana frente a cepas de microorganismos similares a las que mostraron susceptibilidad en este estudio frente al extracto etanólico de *P. heleniae*, los cuales son: ácido 4-hidroxi-3-nitrofenilacético (*S. aureus*) [113, 114, 115], , fitano (*S. aureus*) [143], ácido esteárico (*S. aureus*, *B. subtilis*) [118, 120, 121, 122], Rutin (*S. aureus*, *B. subtilis*) [178, 181], Epicatequina (*S. aureus*, *B. subtilis*) [164, 165], procianidina B1(*S. aureus*, *B. subtilis*)[166, 172], datiscetin-3-O-rutinósido (*S. aureus*, *B. subtilis*) [170, 171] y alfa tocoferol (*S. aureus*) [117]. Es importante mencionar que esta última molécula además ha reportado actividad frente a cepas multirresistentes a antibióticos como *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* [117]. Si bien no podemos establecer una comparación directa por utilizar cepas diferentes, esta puede ser una pauta para conocer los componentes involucrados en la acción del extracto frente a la resistencia microbiana.

Del total de moléculas identificadas como posibles involucradas en la actividad antimicrobial, la mayoría corresponden a compuestos fenólicos (7), seguidas de terpenos (4), ácidos grasos (3), ester (3), éter (2), aminoácido (1), compuestos heterocíclicos (1), aromáticos (1), cetonas (1) y feromona (1). Esto es importante ya que la mayoría de estas moléculas (fenoles) tienen la característica particular de poseer en su estructura química grupos Hidroxilo (-OH) que tiene interacción con la membrana de los microorganismos y además sus estructuras aromáticas tienen interacción con lípidos y proteínas para alterar la estructura y función de la membrana celular de los microorganismos [182, 183]. Además, respalda la selectividad identificada del extracto etanólico de *P. heleniae* frente a microorganismos Gram positivos, ya que se sabe que las bacterias Gram positivas son más susceptibles a la acción de los compuestos fenólicos que las bacterias Gram negativas [184], esto debido a que carecen de membrana externa, lo que facilita la difusión de los compuestos fenólicos y ácidos

fenólicos a través de la pared celular provocando una acidificación intracelular [184, 185, 186]. Además, Vattem et al, 2004 menciona que la disociación de los ácidos fenólicos provoca la hiperacidificación en la interfase de la membrana plasmática como uno de los posibles mecanismos de la acción antimicrobiana de los ácidos fenólicos [186]. La hiperacidificación hace más permeable a la membrana celular provocando alteraciones irreversibles en la bomba sodio-potasio ATPasa, provocando la muerte celular [184, 185, 186]. En cuanto a los terpenos, se ha demostrado su capacidad de permeabilizar las membranas, haciéndolas hincharse, inhibiendo enzimas respiratorias, conduciéndolas a una disipación parcial del gradiente de pH y del potencial eléctrico, crucial para el sistema energético de un microorganismo [189, 190]. Estos tienen la capacidad para desestabilizar las membranas celulares microbianas, desnaturalizar proteínas, interferir con la respiración celular y, en algunos casos, actuar como antioxidantes [189, 190, 191, 192]. Se ha demostrado también que son capaces de inhibir la actividad de las bombas de flujo en bacterias resistentes [193]. Incluso existen estudios donde las cepas bacterianas Gram-positivas son más susceptibles a la acción de los terpenos, que están implicados bien a la inhibición de la expresión génica o en la interacción con el sitio de unión de las proteínas de flujo asociadas a la membrana [191, 193]. A pesar de que existió un menor número de moléculas identificadas para otras subclases como ácidos grasos, o ésteres, no podemos quitarles protagonismo, sino recordar que estas podrían estar actuando en el sinergismo para poder exhibir actividad antimicrobiana en el extracto etanólico de *P. heleniae* [187, 188].

Es por esto que, como ensayo piloto, a pesar de haber determinado actividad sólo para dos de las cinco cepas evaluadas en este estudio, los resultados son prometedores en cuanto a la potencial actividad antimicrobiana de este extracto no sólo frente a cepas convencionales de microorganismos, sino frente a aquellas resistentes a antibióticos. El presente estudio no sólo un aporte a la comunidad científica, sino que permite validar los conocimientos ancestrales de las comunidades, lo que puede servir como una base esencial en el desarrollo de nuevos productos, sobre todo en la industria farmacéutica.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente trabajo nos deja información valiosa sobre la actividad antimicrobial y moléculas contenidas en el extracto etanólico de *P. heleniae*. Se determinó que este extracto tiene actividad antimicrobiana contra cepas de microorganismos Gram positivos como *S. aureus* ATCC y *B. subtilis* resistente a ampicilina, con CMI de 0.10 y 0.2 mg/mL, respectivamente.

Además, se pudo identificar exitosamente de forma cualitativa la presencia de metabolitos como terpenos, taninos, quinonas, compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas. Se determinó que la concentración de los compuestos fenólicos está estrechamente relacionada con la actividad antimicrobiana en productos naturales, donde cuantitativamente se obtuvo una concentración elevada de 574.74 µg/mg del extracto etanólico de *P. heleniae*.

Finalmente, se identificó la presencia de al menos 23 moléculas, de las cuales 14 han reportada actividad antimicrobiana en investigaciones anteriores. Las moléculas reportadas en su mayoría corresponden a compuestos fenólicos (7), terpenos (4) y ácidos grasos (3). Los compuestos identificados en el extracto etanólico de *P. heleniae* pueden estar ligados a la actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*).

Además, es importante realizar ensayos antimicrobianos con más cepas frente al extracto etanólico de *P. heleniae* para incrementar la información disponible sobre su actividad. Se recomienda el análisis con aislamiento de moléculas para evaluar su actividad específica, así como más estudios adicionales para determinar el sinergismo de los compuestos presentes y su papel en la actividad biológica de los extractos de esta especie, que representa un valioso recurso biológico para la sociedad.

REFERENCIAS

1. Noriega, P., Guerrini, A., Sacchetti, G., Grandini, A., Ankuash, E., & Manfredini, S. (2019). Chemical Composition and Biological Activity of Five Rain Forest. *Molecules*, 24, 1–12. doi:10.3390/molecules24081637
2. C., Ramírez, A., Marín, H., Torres, B., Alemán, R., Torres, R., Navarrete, H., & Changoluisa, D. (2017). *Factors associated with soil fertility in different land uses of the Ecuadorian Amazon Region*. 18, 1–16. file:///C:/Users/STEVE/OneDrive/Documentos/Bibliografias M/63653574014.pdf
3. Caballero-Serrano, V., McLaren, B., Carrasco, J. C., Alday, J. G., Fiallos, L., Amigo, J., & Onaindia, M. (2019). Traditional ecological knowledge and medicinal plant diversity in Ecuadorian Amazon home gardens. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00524. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00524>
4. Robles Arias, D. M., Cevallos, D., Gaoue, O. G., Fadiman, M. G., & Hindle, T. (2020). Non-random medicinal plants selection in the Kichwa community of the Ecuadorian Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 246(May 2019), 112220. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112220>
5. Milliken, W., Walker, B. E., Howes, M. J. R., Forest, F., & Nic Lughadha, E. (2021). Plants used traditionally as antimalarials in Latin America: Mining the tree of life for potential new medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 279. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114221>
6. da Costa Guimarães, N., Freitas-de-Sousa, L. A., Scheffer de Souza, M. C., Oliveira de Almeida, P. D., Dos-Santos, M. C., Nunez, C. V., Bezerra de Oliveira, R., Veras Mourão, R. H., & Mourão de Moura, V. (2020). Evaluation of the anti-snakebite, antimicrobial and antioxidant potential of *Philodendron megalophyllum* Schott (Araceae), traditionally used in accidents caused by snakes in the western region of Pará, Brazil. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 184, 99–108. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2020.05.024>
7. Soares, A. M., Ticli, F. K., Marcussi, S., Lourenco, M. V., Januario, A. H., Sampaio, S. V., Giglio, J. R., Lomonte, B., & Pereira, P. S. (2005). Medicinal Plants with Inhibitory Properties Against Snake Venoms. *Current Medicinal Chemistry*, 12(22), 2625–2641. <https://doi.org/10.2174/092986705774370655>
8. Vásquez, J., Jiménez, S. L., Gómez, I. C., Rey, J. P., Henao, A. M., Marín, D. M., Romero, J. O., & Alarcón, J. C. (2013). Snakebites and ethnobotany in the Eastern region of Antioquia, Colombia—The traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(2), 449–455. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2012.12.043>

9. Gonçalves-Souza, P., Schlindwein, C., Dötterl, S., & Paiva, E. A. S. (2017). Unveiling the osmophores of *Philodendron adamantinum* (Araceae) as a means to understanding interactions with pollinators. *Annals of Botany*, 119(4), 533–543. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw236>
10. Scapinello, J., Aguiar, G. P. S., Dal Magro, C., Capelezzo, A. P., Niero, R., Dal Magro, J., de Oliveira, D., & Oliveira, J. V. (2018). Extraction of bioactive compounds from *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl and encapsulation in PHBV by SEDS technique. *Industrial Crops and Products*, 125(May), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.079>
11. De Moura, R. S., & Resende, Â. C. (2016). Cardiovascular and Metabolic Effects of Açaí, an Amazon Plant. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 68(1), 19–26. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000347>
12. María, A., & Vanegas, M. (2017). Una visión histórica en el desarrollo de fármacos a partir de productos naturales. *Rev Mex Cienc Farm*, 48(3), 16–27.
13. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75(3), 311–335. <https://doi.org/10.1021/np200906s>
14. Jiménez, C. (2013). El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *Real Sociedad Española de Química*, 109(2), 134–141. www.rseq.org
15. Navarrete, H., Torre, L., Muriel, P., Marcía, M., & Balsev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador (con extracto de datos). In *Herbario QCA & Herbario AAU*. <https://bibdigital.rjb.csic.es/records/item/16016-redirect>
16. Paniagua-Zambrana, N., Bussmann, R. W., & Macía, M. J. (2017). The socioeconomic context of the use of *Euterpe precatoria* Mart. and *E. oleracea* Mart. in Bolivia and Peru. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13002-017-0160-0>
17. Mb M, Maldonado X, Rojas G (2015). Mordedura de serpiente, una enfermedad en el olvido. *REV.ECU.MED.EUGENIO ESPEJO*. Vol 4. doi:10.1186/1678-9199-20-7
18. Yañez-Arenas C, Díaz-Gamboa L, Patrón-Rivero C, López-Reyes K, Chiappa-Carrara X. Neotropical Biodiversity Estimating geographic patterns of ophidism risk in Ecuador Estimating geographic patterns of ophidism risk in Ecuador. *Neotropical Biodiversity*. 2018;4: 55–61. doi:10.1080/23766808.2018.1454762
19. Ochoa-Avilés A, Heredia-Andino OS, Escandón SA, Celorio-Carvajal CA, Arias-Peláez MC, Zaruma-Torres F, et al. Viperidae snakebites in Ecuador: A review of epidemiological and ecological aspects. *Toxicon* X. 2020;7: 100051. doi:10.1016/J.TOXCX.2020.100051
20. Search results | The Reptile Database. [cited 15 Jun 2022]. Available: http://reptile-database.reptarium.cz/advanced_search?location=Ecuador&exact=location&submit=Search
21. LISTA ROJA DE LOS REPTILES DEL ECUADOR 2005. [cited 15 Jun 2022]. Available: www.flacsoandes.edu.ec

22. Vera-Palacios, A. L., Sacoto-Torres, J. D., Hernández-Altamirano, J. A., Moreno, A., Peñuela-Mora, M. C., Salazar-Valenzuela, D., Mogollón, N. G. S., & Almeida, J. R. (2022). A First Look at the Inhibitory Potential of *Urospatha sagittifolia* (Araceae) Ethanolic Extract for *Bothrops atrox* Snakebite Envenomation. *Toxins*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/toxins14070496>
23. Salazar-Valenzuela D, Mora-Obando D, Fernández ML, Loaiza-Lange A, Gibbs HL, Lomonte B. Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia. *Toxicon*. 2014;90: 15–25. doi:10.1016/J.TOXICON.2014.07.012
24. Monteiro WM, Contreras-Bernal JC, Bisneto PF, Sachett J, Mendonça da Silva I, Lacerda M, et al. *Bothrops atrox*, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology. *Toxicon X*. 2020;6: 100037. doi:10.1016/J.TOXCX.2020.100037
25. Patiño RSP, Salazar-Valenzuela D, Medina-Villamizar E, Mendes B, Proaño-Bolaños C, da Silva SL, et al. *Bothrops atrox* from Ecuadorian Amazon: Initial analyses of venoms from individuals. *Toxicon*. 2021;193: 63–72. doi:10.1016/J.TOXICON.2021.01.007
26. Núñez V, Cid P, Sanz L, de La Torre P, Angulo Y, Lomonte B, et al. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *J Proteomics*. 2009;73: 57–78. doi:10.1016/J.JPROT.2009.07.013
27. Albulescu LO, Xie C, Ainsworth S, Alsolaiss J, Crittenden E, Dawson CA, et al. A therapeutic combination of two small molecule toxin inhibitors provides broad preclinical efficacy against viper snakebite. *Nature Communications*. 2020;11. doi:10.1038/S41467-020-19981-6
28. Williams DJ, Faiz MA, Abela-Ridder B, Ainsworth S, Bulfone TC, Nickerson AD, et al. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2019;13. doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0007059
29. Snakebite envenoming. [cited 15 Jun 2022]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>
30. Arroyo C, Solano S, Segura Á, Herrera M, Estrada R, Villalta M, et al. Cross-reactivity and cross-immunomodulation between venoms of the snakes *Bothrops asper*, *Crotalus simus* and *Lachesis stenophrys*, and its effect in the production of polyspecific antivenom for Central America. *Toxicon*. 2017;138: 43–48. doi:10.1016/J.TOXICON.2017.08.009
31. Snakebite: WHO targets 50% reduction in deaths and disabilities. [cited 15 Jun 2022]. Available: <https://www.who.int/news/item/23-05-2019-who-launches-global-strategy-for-prevention-and-control-of-snakebite-envenoming>
32. La OMS lanza una estrategia mundial para la prevención y el control del envenenamiento por mordeduras de serpiente. [cited 15 Jun 2022]. Available: <https://www.who.int/es/news/item/23-05-2019-who-launches-global-strategy-for-prevention-and-control-of-snakebite-envenoming>

33. Arias AS, Rucavado A, Gutiérrez JM. Peptidomimetic hydroxamate metalloproteinase inhibitors abrogate local and systemic toxicity induced by *Echis ocellatus* (saw-scaled) snake venom. *Toxicon*. 2017;132: 40–49. doi:10.1016/J.TOXICON.2017.04.001
34. de Souza J, Oliveira ICF, Yoshida EH, Cantuaria NM, Cogo JC, Torres-Bonilla KA, et al. Effect of the phospholipase A2 inhibitor Varespladib, and its synergism with crotalic antivenom, on the neuromuscular blockade induced by *Crotalus durissus terrificus* venom (with and without crotamine) in mouse neuromuscular preparations. *Toxicon*. 2022;214: 54–61. doi:10.1016/J.TOXICON.2022.05.001
35. Lewin M, Samuel S, Merkel J, Bickler P. Varespladib (LY315920) Appears to Be a Potent, Broad-Spectrum, Inhibitor of Snake Venom Phospholipase A2 and a Possible Pre-Referral Treatment for Envenomation. *Toxins (Basel)*. 2016;8. doi:10.3390/TOXINS8090248
36. Escalante T, Franceschi A, Rucavado A, Gutiérrez JM. Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Biochemical Pharmacology*. 2000;60: 269–274. doi:10.1016/S0006-2952(00)00302-6
37. da Costa Guimarães N, Freitas-de-Sousa LA, Scheffer de Souza MC, Oliveira de Almeida PD, Dos-Santos MC, Nunez CV, et al. Evaluation of the anti-snakebite, antimicrobial and antioxidant potential of *Philodendron megalophyllum Schott* (Araceae), traditionally used in accidents caused by snakes in the western region of Pará, Brazil. *Toxicon*. 2020;184: 99–108. doi:10.1016/J.TOXICON.2020.05.024
38. Sousa LF, Portes-Junior JA, Nicolau CA, Bernardoni JL, Nishiyama-Jr MY, Amazonas DR, et al. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. *Journal of Proteomics*. 2017;159: 32–46. doi:10.1016/J.JPROT.2017.03.003
39. Río, M. G., & Lanteri, A. A. (2014). La imitación en la naturaleza. *Museo de La Plata*, 138
40. Ministerio de Salud Pública. Manejo clínico de pacientes con mordeduras de serpientes venenosas y picaduras de escorpiones. Protocolo basado en la evidencia. Primera ed. Quito: Dirección Nacional de Prevención y Control y Dirección de Normatización. 2017.
41. Bizzo, H. R., Brilhante, N. S., Nolvachai, Y., & Marriott, P. J. (2023). Use and abuse of retention indices in gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1708, 464376. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2023.464376>
42. Ramírez K, Ruiz M. Estudio químico y actividad antioxidante de las hojas y corteza del tallo de Carapa guianensis. Universidad de Guayaquil. 2021. Available: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/54249>
43. Das BK, Al-Amin MM, Russel SM, Kabir S, Bhattacharjee R, Hannan JMA. Phytochemical Screening and Evaluation of Analgesic Activity of *Oroxylum indicum*. *Indian J Pharm Sci*. 2014;76: 575. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25593396>

44. Adedapo A, Adewuyi T, Sofidiya M. Phytochemistry, anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous leaf extract of *Lagenaria breviflora* (Cucurbitaceae) in laboratory animals. *Rev Biol Trop*. 2013;61: 281–290. Available:https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003477442013000100023
45. Villagomez Iñiguez AV. Efectos inhibitorios de los extractos de hojas de *Morus* sp. en la actividad de alfa-glucosidasa. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. 2007. Available: <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/2205>
46. Robles-García, M. A., Aguilar, A. J., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., Morales- Del-Río, J. A., Guerrero-Medina, P. J., Madrigal-Pulido, J. A., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extracto de tempisque (*Sideroxylum capiri* PITTIER). *Sid. Biotecnia*, 18(3), 3–8. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v18i3.328>
47. Colina, A. (2016). Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de “*Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst” de la zona de Yucay (Cusco). *Repositorio de Tesis - UNMSM*, 98. https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/7121/Colina_ra.pdf?sequence=1&isAllowed=y
48. Harborne JB. *Phytochemical Methods*. 1st ed. Dordrecht: Springer Netherlands; 1984. doi:10.1007/978-94-009-5570-7
49. Lartey NL, Asare-Anane H, Ofori EK, Antwi S, Asiedu-Larbi J, Ayertey F, et al. Antidiabetic activity of aqueous stem bark extract of *Annickia polycarpa* in alloxan-induced diabetic mice. *J Tradit Complement Med*. 2021;11: 109–116. doi:10.1016/J.JTCME.2020.02.001
50. Scovino Loboguerrero, S., Sarmiento, K., Galvis, C., Castiblanco, A. L., & Aristizabal, F. (2021). Analysis of the protein profile of the venoms of snakes *Bothrops asper*, *Bothrocophias myersi* and *Crotalus durissus* from the Colombian Andean Region obtained by RP-HPLC. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23(1), 24–31. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.94211>
51. Niño Pérez, R. M. (2018). *Análisis comparativo del contenido proteico de venenos de serpientes de la familia Viperidae de diferentes regiones de Colombia mediante el empleo de cromatografía líquida y electroforesis*. Vol 2. 80–94. [http://www.bdigital.unal.edu.co/63962/1/Rosamery Niño P.52173513.pdf](http://www.bdigital.unal.edu.co/63962/1/Rosamery_Niño_P.52173513.pdf)
52. Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Madrigal, M., Escolano, J., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2009). Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. *Toxicon*, 54(7), 938–948. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2009.06.011>
53. Vásquez, J., Jiménez, S. L., Gómez, I. C., Rey, J. P., Henao, A. M., Marín, D. M., Romero, J. O., & Alarcón, J. C. (2013). Snakebites and ethnobotany in the Eastern region of Antioquia, Colombia -

- The traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(2), 449–455. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2012.12.043>
54. Giovannini, P., & Howes, M. J. R. (2017). Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 199, 240–256. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.011>
 55. Caballero-Serrano, V., McLaren, B., Carrasco, J. C., Alday, J. G., Fiallos, L., Amigo, J., & Onaindia, M. (2019). Traditional ecological knowledge and medicinal plant diversity in Ecuadorian Amazon home gardens. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00524. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00524>
 56. Milliken, W., Walker, B. E., Howes, M. J. R., Forest, F., & Nic Lughadha, E. (2021). Plants used traditionally as antimalarials in Latin America: Mining the tree of life for potential new medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 279, 114221. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114221>
 57. Calvopiña, M., Guamán-Charco, E., Ramírez, K., Dávalos, F., Chiliquinga, P., Villa-Soxó, S., Oña-Vistin, R., & Romero-Álvarez, D. (2023). Epidemiology and clinical features of venomous snake bites in the Northern Amazon of Ecuador (2017-2021). *Biomedica*, 43(1), 93–107. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6587>
 58. De Moura, V. M., Freitas De Sousa, L. A., Cristina Dos-Santos, M., Almeida Raposo, J. D., Evangelista Lima, A., De Oliveira, R. B., Da Silva, M. N., & Veras Mourão, R. H. (2015). Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by Bothrops jararaca venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 161, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.020>
 59. Otero, R., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Núñez, V., Evans, N., Alzate, S. P., García, M. E., Saldarriaga, M., Del Valle, G., Osorio, R. G., Díaz, A., Valderrama, R., Duque, A., & Vélez, H. N. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part I: Traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(3), 493–504. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00243-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00243-9)
 60. da Costa Guimarães, N., Freitas-de-Sousa, L. A., Scheffer de Souza, M. C., Oliveira de Almeida, P. D., Dos-Santos, M. C., Nunez, C. V., Bezerra de Oliveira, R., Veras Mourão, R. H., & Mourão de Moura, V. (2020). Evaluation of the anti-snakebite, antimicrobial and antioxidant potential of *Philodendron megalophyllum* Schott (Araceae), traditionally used in accidents caused by snakes in the western region of Pará, Brazil. *Toxicon*, 184(February), 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.05.024>
 61. Roopashree, K. M., & Naik, D. (2019). Advanced method of secondary metabolite extraction and quality analysis. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 1829–1842.
 62. Joffard N, Legendre L, Gibernau M, Pascal L (2017). Differential Accumulation of Volatile Organic Compounds by Leaves and Roots of Two Guianese *Philodendron* Species, *P. fragrantissimum*

- Kunth and *P. melinonii* Brongn, Francia. *Chem Biodivers*, Abril. doi: 10.1002/cbdv.201600415. Epub 2017 Mar 29. PMID: 28027618.
63. Gonçalves-Souza, P., Schlindwein, C., Dötterl, S., & Paiva, E. A. S. (2017). Unveiling the osmophores of *Philodendron adamantinum* (Araceae) as a means to understanding interactions with pollinators. *Annals of Botany*, 119(4), 533–543. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw236>
 64. Nadal, J., Swiech, D., Folquitto, D. G., Bobek, V. B., Urban, A. M., Cesar, F., Betim, M., Pereira, C. B., Kanunfre, C. C., & Miguel, O. G. (2021). Volatile oils from *Philodendron meridionale* Buturi & Sakur : chemical composition and in vitro effect against *Ctenocephalides felis* and leukemia cells. *Research, Society and Development*, 10, 1–13.
 65. Aydin, E., Türkez, H., & Taşdemir, Ş. (2013). Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 64(3), 415–424. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2365>
 66. Chen, T. C., da Fonseca, C. O., Levin, D., & Schönthal, A. H. (2021). The monoterpenoid perillyl alcohol: Anticancer agent and medium to overcome biological barriers. *Pharmaceutics*, 13(12), 1–28. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122167>
 67. Khan, A. Q., Nafees, S., & Sultana, S. (2011). Perillyl alcohol protects against ethanol induced acute liver injury in Wistar rats by inhibiting oxidative stress, NFκ-B activation and proinflammatory cytokine production. *Toxicology*, 279(1–3), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.09.017>
 68. Carvalho, B. M. A., Santos, J. D. L., Xavier, B. M., Almeida, J. R., Resende, L. M., Martins, W., Marcussi, S., Marangoni, S., Stábeli, R. G., Calderon, L. A., Soares, A. M., & Silva, S. L. Da. (2013). *Snake Venom PLA 2 s Inhibitors Isolated from Brazilian Plants : Synthetic and Natural Molecules. 2013.*
 69. Singh, P., Yasir, M., Hazarika, R., Sugunan, S., & Shrivastava, R. (2017). *A Review on Venom Enzymes Neutralizing Ability of Secondary Metabolites from Medicinal Plants.* 20(3): 173-178. <https://doi.org/10.3831/KPI.2017.20.020>
 70. Soares, A. M., Ticli, F. K., Marcussi, S., Lourenco, M. V., Januario, A. H., Sampaio, S. V., Giglio, J. R., Lomonte, B., & Pereira, P. S. (2005). Medicinal Plants with Inhibitory Properties Against Snake Venoms. *Current Medicinal Chemistry*, 12(22), 2625–2641. <https://doi.org/10.2174/092986705774370655>
 71. Cáceres, M. I., Ricciardi, G. A., Torres, A. M., Ricciardi, B. V., Ferrero, S., & Dellacassa, E. (2017). In vitro Anti-snake Venom Activities of *Aloysia citrodora* Palau: New Possibilities for a Known Aromatic Plant. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 20(1), 132–140. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2016.1239551>
 72. de Carvalho Selvati Rezende, D. A., das Graças Cardoso, M., Souza, R. V., Teixeira, M. L., Brandão, R. M., Ferreira, V. R. F., e Nogueira, J. O., Magalhães, M. L., Marcussi, S., & Nelson, D. L. (2017). Essential Oils from <i>Mentha piperita</i>, <i>Cymbopogon citratus</i>, <i>Rosmarinus officinalis</i>,

- Peumus boldus & Foeniculum vulgare: Inhibition of Phospholipase A2 and Cytotoxicity to Human Erythrocytes. *American Journal of Plant Sciences*, 08(09), 2196–2207. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.89147>
73. Miranda, C. A. S. F., Cardoso, M. G., Mansanares, M. E., Gomes, M. S., & Marcussi, S. (2014). Preliminary assessment of Hedychium coronarium essential oil on fibrinogenolytic and coagulant activity induced by Bothrops and Lachesis snake venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 20(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-39>
 74. Torres, A. M., Camargo, F. J., Ricciardi, G. A. L., Ricciardi, A. I. A., & Dellacassa, E. (2011). Neutralizing effects of Nectandra angustifolia extracts against Bothrops neuwiedi snake venom. *Natural Product Communications*, 6(9), 1393–1396. <https://doi.org/10.1177/1934578x1100600942>
 75. Hamed, A. B., Mantawy, E. M., El-Bakly, W. M., Abdel-Mottaleb, Y., & Azab, S. S. (2020). Putative anti-inflammatory, antioxidant, and anti-apoptotic roles of the natural tissue guardian methyl palmitate against isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00044-y>
 76. Saeed, N. M., El-Demerdash, E., Abdel-Rahman, H. M., Algandaby, M. M., Al-Abbasi, F. A., & Abdel-Naim, A. B. (2012). Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 264(1), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.020>
 77. Ramasamy, E., & Ganesan, S. (2015). *Chemical Compounds Investigation of Cassia auriculata Leaves-A Potential Folklore Medicinal Plant*. May 2015. www.bepi.com
 78. Joshua, P. E., Anosike, C. J., Asomadu, R. O., Ekpo, D. E., Uhwo, E. N., & Nwodo, O. F. C. (2020). Bioassay-guided fractionation, phospholipase A2-inhibitory activity and structure elucidation of compounds from leaves of Schumannia magnificum. *Pharmaceutical Biology*, 58(1), 1069–1076. <https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1839510>
 79. Scapinello, J., Aguiar, G. P. S., Dal Magro, C., Capelezzo, A. P., Niero, R., Dal Magro, J., de Oliveira, D., & Oliveira, J. V. (2018). Extraction of bioactive compounds from Philodendron bipinnatifidum Schott ex Endl and encapsulation in PHBV by SEDS technique. *Industrial Crops and Products*, 125(May), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.079>
 80. Bhalchim, V., Shewale, S. D., & Undale, V. (2023). In silico Virtual Broadcasting of Herbal Phyto-Compounds Isolated from Sansevieria cylindrica and Plumeria obtusa as Impending Snake Venom Venin ' s. *Indian Journal of Natural Sciences*, 14(December), 976–997. www.tnsroindia.org.in
©IJONS
 81. Cunico, M. M., Dias, J. G., Miguel, M. D., Miguel, O. G., Auer, C. G., Côcco, L. C., Lopes, A. R., Yamamoto, C. I., & Monache, F. D. (2006). Potencial antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato das raízes de Ottonia martiana Miq. *Química Nova*, 29(4), 746–749. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000400021>

82. Nielsenw, N. M., & Bundgaard, H. (1988). Glycolamide esters as biolabile prodrugs of carboxylic acid agents: Synthesis, stability, bioconversion, and physicochemical properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77(4), 285–298. <https://doi.org/10.1002/jps.2600770402>
83. Drabik, J., Korasiak, K., Chrobak, J., Woch, J., Brzeźniak, N., Barszcz, W., Kozdrach, R., & Iłowska, J. (2024). Amide/Amino-Based Functional Additives for Lubricants: Structure, Antimicrobial Activity and Wear Resistance. *Molecules*, 29(1). <https://doi.org/10.3390/molecules29010122>
84. Tsamo, L. D. F., Yimgang, L. V., Wouamba, S. C. N., Mkounga, P., Nkengfack, A. E., Voutquenne-Nazabadioko, L., Ngnokam, D., Lenta, B. N., & Sewald, N. (2021). A New Ceramide (Rumexamide) and Other Chemical Constituents from *Rumex abyssinicus* Jacq (Polygonaceae): Isolation, Characterization, Antibacterial Activities and Chemophenetic Significance. *Advances in Biological Chemistry*, 11(05), 266–282. <https://doi.org/10.4236/abc.2021.115018>
85. Alhazmi, H. A., Sultana, S., Khan, A., & Al-bratty, M. (2018). GC-MS analysis and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. leaves. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 10(1), 45–49.
86. Murti, Y., Yogi, B., & Pathak, D. (2010). Pharmacognostic standardization of leaves of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Asclepiadaceae). *International Journal of Ayurveda Research*, 1(1), 14. <https://doi.org/10.4103/0974-7788.59938>
87. Anagha Ranade, R. A. (2014). An appraisal on ethno-medicinal claims of *calotropis procera* ait and *calotropis gigantea* (linn) r.br. -two source drugs of ayurvedic medicinal plant “arka.” *Global Journal of Research on Medicinal Plants and Indigenous Medicine*, 3(12), 475–488. [https://www.academia.edu/32821548/An Appraisal on Ethno Medicinal Claims of Calotropis Procera Ait and Calotropis Gigantea Linn R BR Two Source Drugs of Ayurvedic Medicinal Plant Arka](https://www.academia.edu/32821548/An_Appraisal_on_Ethno_Medicinal_Claims_of_Calotropis_Procera_Ait_and_Calotropis_Gigantea_Linn_R_BR_Two_Source_Drugs_of_Ayurvedic_Medicinal_Plant_Arka)
88. Hemiparasite, L. M., Don, G., Hemiparasite, L. M., Don, G., & Cassia, L. (2022). GC-MS Analysis and Antioxidant Potential of the Stem and Leaf Extracts of Tropical Journal of Natural Product Research GC-MS Analysis and Antioxidant Potential of the Stem and Leaf Extracts of. *Tropical Journal of Natural Product Research Available*, 6(10), 1638–1643.
89. Nonthalee, S., Maneechai, S., Saensouk, S., & Saensouk, P. (2023). Comparative Phytochemical Profiling (GC-MS and HPLC) and Evaluation of Antioxidant Activities of Wild, in Vitro Cultured and Greenhouse Plants of *Kaempferia grandifolia* Saensouk and *Jenjitt* and *Kaempferia siamensis* Sirirugsa; Rare Plant Species in Thaila. *Pharmacognosy Magazine*, 19(1), 156–167. <https://doi.org/10.1177/09731296221145066>
90. Tsurho, S., Of, D., & In, P. (2021). *Synthesis of octadecanamide chalcones, octadecanamide pyrazolines and their in-silico and in-vitro antimicrobial activity. by SHURHOVOLIE TSURHO Submitted to In Partial Fulfilment of the Requirements for Award of the Degree of DOCTOR OF PHILOSOPHY IN CHEM.*

91. Olaoluwa, O., Moronkola, D., Taiwo, O., & Iganboh, P. (2018). Volatile oil composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Boerhavia erecta* L. and *Euphorbia hirta* L. *Trends in Phytochemical Research (TPR) Trends Phytochem. Res*, 2(3), 171–178. <http://tpr.iau-shahrood.ac.ir>
92. Gopi, K., Renu, K., & Jayaraman, G. (2014). Inhibition of *Naja naja* venom enzymes by the methanolic extract of *Leucas aspera* and its chemical profile by GC – MS. *Toxicology Reports*, 1, 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.08.012>
93. Caro, D., Ocampo, Y., Castro, J., Barrios, L., Salas, R., & Franco, L. A. (2017). ScienceDirect Protective effect of *Dracontium dubium* against *Bothrops asper* venom. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 89, 1105–1114. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.080>
94. Sanchez-Perez, J. A., Béjar Castillo, V., Villanueva Cotrina, F., Guevara-Granados, J. M. M. (2020). Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* sensu stricto sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. *Anales de La Facultad de Medicina*, 81(2), 180–185. <https://doi.org/10.15381/ANALES.V81I2.16170>
95. Borroto, J., Trujillo, R., de la Torre, Y., Waksman, N., Hernández, M., & Salazar, R. (2011). Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a artemia salina del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1), 34–42. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm-2011/cpm111d.pdf>
96. Bajkacz, S., Baranowska, I., Buszewski, B., Kowalski, B., & Ligor, M. (2018). Determination of Flavonoids and Phenolic Acids in Plant Materials Using SLE-SPE-UHPLC-MS/MS Method. *Food Analytical Methods*, 11(12), 3563–3575. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1332-9>
97. Souza, M. C. S. de, Moura, V. M. de, Mourão, R. H. V., Fachin-Espinar, M. T., Nunez, C. V., & Dos-Santos, M. C. (2021). Antimicrobial activity of Amazonian plant species against the causative agents of secondary infection in snakebites. *Revista Fitos*, 15(3), 280–297. <https://doi.org/10.32712/2446-4775.2021.1084>
98. Scapinello, J., Schindler, M. S. Z., Zanatta, L., Mohr, L. C., Capelezzo, A. P., Calixto, J. F., Aguiar, G. P. S., Boligon, A. A., Niero, R., Oliveira, D. De, Magro, J. D., & Oliveira, J. V. (2019). Chemical Composition, Antioxidant, Antimicrobial and Antidiabetic Potential of *Philodendron Bipinnatifidum* Schott ex Endl. *Journal of Food Engineering and Technology*, 8(2), 103–111. <https://doi.org/10.32732/jfet.2019.8.2.103>
99. Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875–3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)
100. Mailoa, M. N., Mahendradatta, M., Laga, A., & Djide, N. (2014). Antimicrobial Activities Of Tannins Extract From Guava Leaves (*Psidium Guajava* L) On Pathogens Microbial. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 3(1), 236–241.

101. Ukoha, P. O., Cemaluk, E. A. C., Nnamdi, O. L., & Madus, E. P. (2011). Tannins and other phytochemical of the Samanea saman pods and their antimicrobial activities. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 5(8), 237–244. <http://www.academicjournals.org/AJPAC>
102. Abdel Ghani, S. B., Weaver, L., Zidan, Z. H., Ali, H. M., Keevil, C. W., & Brown, R. C. D. (2008). Microwave-assisted synthesis and antimicrobial activities of flavonoid derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(2), 518–522. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.11.081>
103. Mahmoudi, S., Khali, M., Benkhaled, A., Benamirouche, K., & Baiti, I. (2016). Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian Ficus carica L. varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(3), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.010>
104. Margarido, H. M. P. (2023). Synthesis and structure elucidation of a series of chiral nitro derivatives as promising antimicrobial agents. *Synthesis and Structure Elucidation of a Series of Chiral Nitro Derivatives as Promising Antimicrobial Agents*. <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/110824>
105. Weissleder, R., Kelly, K., Sun, E. Y., Shtatland, T., & Josephson, L. (2005). Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nature Biotechnology*, 23(11), 1418–1423. <https://doi.org/10.1038/nbt1159>
106. Mabkhot, Y. N., Al-Majid, A. M., Barakat, A., Al-Showiman, S. S., Al-Har, M. S., Radi, S., Moazzam Naseer, M., & Hadda, T. B. (2014). Synthesis and biological evaluation of 2-aminobenzamide derivatives as antimicrobial agents: Opening/closing pharmacophore site. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 5115–5127. <https://doi.org/10.3390/ijms15035115>
107. El-Barbary, A. A., Hafiz, Y. A., & Abdel-Wahed, M. S. (2010). Glycosylation, sugar hydrazones, and antimicrobial evaluation of some 6-substituted-1,2,4-triazines. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 29(1), 55–71. <https://doi.org/10.1080/15257770903454482>
108. Ma, Y., Ren, D., Zhang, J., Liu, J., Zhao, J., Wang, L., & Zhang, F. (2015). Synthesis, antibacterial activities evaluation, and docking studies of some 2-substituted-3-(phenylamino)-dihydroquinazolin-4(1H)-ones. *Tetrahedron Letters*, 56(27), 4076–4079. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.05.020>
109. Zicane, D., Tetere, Z., Mierina, I., Turks, M., Ravina, I., & Leonciks, A. (2014). Synthesis of quinazolinone-1,3,4-oxadiazole conjugates and studies of their antibacterial and antioxidant activity. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(4), 1153–1158.
110. Hirota, S., Takahama, U., Ly, T. N., & Yamauchi, R. (2005). Quercetin-dependent inhibition of nitration induced by peroxidase/H₂O₂/nitrite systems in human saliva and characterization of an oxidation product of quercetin formed during the inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3265–3272. <https://doi.org/10.1021/jf0404389>

111. Watanabe, M., & Watanabe, J. (1994). Screening, Isolation, and Identification of Food-originated Compounds Enhancing the Ice-nucleation Activity of *Xanthomonas campestris*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(1), 64–66. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.64>
112. Lim, S. H., & Hudson, S. M. (2004). Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. *Carbohydrate Research*, 339(2), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.024>
113. Shoko TESAOKI , Soichi TANABE , Haruhiro ONO , Eri FUKUSHI , Jun KAWABATA, M. W. (n.d.). *Ácidos 4-hidroxi-3-nitrofenilacético y sinápico como compuestos antibacterianos de semillas de mostaza*. *Biociencia, biotecnología y bioquímica*, 62, 998-1000. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.998>
114. Anghel, A. C., & Țăranu, I. (2023). Antimicrobial potential of polyphenols obtained from agro-industrial by-products. *Archiva Zootechnica*, 26(2), 96–115. <https://doi.org/10.2478/azibna-2023-0017>
115. Engels, C., Schieber, A., & Gänzle, M. G. (2012). Sinapic acid derivatives in defatted Oriental mustard (*Brassica juncea* L.) seed meal extracts using UHPLC-DAD-ESI-MS n and identification of compounds with antibacterial activity. *European Food Research and Technology*, 234(3), 535–542. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1669-z>
116. Andrade, J. C., Morais-Braga, M. F. B., Guedes, G. M. M., Tintino, S. R., Freitas, M. A., Menezes, I. R. A., & Coutinho, H. D. M. (2014). Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by alpha-tocopherol and other cholesterol derivatives. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 68(8), 1065–1069. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.10.011>
117. Islan, G. A., Gonçalves, L. M. D., Marto, J., Duarte, A., Alvarez, V. A., Castro, G. R., & Almeida, A. J. (2021). Effect of α -tocopherol on the physicochemical, antioxidant and antibacterial properties of levofloxacin loaded hybrid lipid nanocarriers. *New Journal of Chemistry*, 45(2), 1029–1042. <https://doi.org/10.1039/d0nj03781h>
118. Jubie, S., Ramesh, P. N., Dhanabal, P., Kalirajan, R., Muruganantham, N., & Shanish Antony, A. (2012). Synthesis, antidepressant and antimicrobial activities of some novel stearic acid analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 931–935. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.025>
119. Kitahara, T., Koyama, N., Matsuda, J., Aoyama, Y., Hirakata, Y., Kamihira, S., Kohno, S., Nakashima, M., & Sasaki, H. (2004). Antimicrobial activity of saturated fatty acids and fatty amines against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(9), 1321–1326. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1321>
120. Simonkai, H., & L, C. (2010). *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Centaurea pannonica and C. jacea*. *Natural Product Communications*, Vol 5, 1663-1668. DOI: 10.3390/plants12040800

121. Öztürk, M., Duru, M. E., Kivrak, Ş., Mercan-Doğan, N., Türkoglu, A., & Özler, M. A. (2011). In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1353–1360. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.019>
122. Pu, Z. hui, Zhang, Y. qun, Yin, Z. qiong, Xu, J., Jia, R. yong, Lu, Y., & Yang, F. (2010). Antibacterial activity of 9-octadecanoic acid-hexadecanoic acid-tetrahydrofuran-3,4-diyl ester from neem oil. *Agricultural Sciences in China*, 9(8), 1236–1240. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60212-1](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60212-1)
123. Gołebiowski, M., Cerkowniak, M., Urbanek, A., Dawgul, M., Kamysz, W., Boguś, M. I., & Stepnowski, P. (2015). Identification and antifungal activity of novel organic compounds found in cuticular and internal lipids of medically important flies. *Microbiological Research*, 170, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.06.004>
124. Sargassum, K. (2022). *Serial Extraction Technique of Rich Antibacterial Compounds in*. <https://doi.org/10.2174/1573407217666210910095732>
125. Campos, F. M., Couto, J. A., Figueiredo, A. R., Tóth, I. V., Rangel, A. O. S. S., & Hogg, T. A. (2009). Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 144–151. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2009.07.031>
126. İmamoğlu, R., Koç, E., & Kisa, D. (2022). Polyphenolic compounds: Synthesis, assessment of antimicrobial effect and enzymes inhibition against important medicinal enzymes with computational details. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 65, 128722. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2022.128722>
127. Martinez, J., & Moreno, J. J. (2000). Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology*, 59(7), 865–870. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00380-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00380-9)
128. Sánchez-Vioque, R., Polissiou, M., Astraka, K., Mozos-Pascual, M. de los, Tarantilis, P., Herraiz-Peñalver, D., & Santana-Méridas, O. (2013). Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Industrial Crops and Products*, 49, 150–159. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2013.04.053>
129. Santos, C. A., Lima, E. M. F., Franco, B. D. G. de M., & Pinto, U. M. (2021). Exploring Phenolic Compounds as Quorum Sensing Inhibitors in Foodborne Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 12, 735931. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.735931/BIBTEX>
130. Khan, M., Khan, M., Adil, S. F., & Alkhathlan, H. Z. (2022). Screening of potential cytotoxic activities of some medicinal plants of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1801–1807. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.10.045>

131. Mellado, M., Soto, M., Madrid, A., Montenegro, I., Jara-Gutiérrez, C., Villena, J., Werner, E., Godoy, P., & Aguilar, L. F. (2019). In vitro antioxidant and antiproliferative effect of the extracts of *Ephedra chilensis* K Presl aerial parts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2462-3>
132. Bahun, M., Jukić, M., Oblak, D., Kranjc, L., Bajc, G., Butala, M., Bozovičar, K., Bratkovič, T., Podlipnik, Č., & Poklar Ulrih, N. (2022). Inhibition of the SARS-CoV-2 3CLpro main protease by plant polyphenols. *Food Chemistry*, 373(September 2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131594>
133. Martinović, N., Polak, T., Ulrih, N. P., & Abramović, H. (2020). Mustard Seed: Phenolic Composition and Effects on Lipid Oxidation in Oil, Oil-in-Water Emulsion and Oleogel. *Industrial Crops and Products*, 156(November 2019). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112851>
134. Balabhaskar, R., & Vijayalakshmi, K. (2021). Identification of Secondary Metabolites from the Ethanol extract of the leaves of *Bauhinia tomentosa* by GC-MS Analysis. *Research Journal of Pharmacy and Technology*.
135. Popović, Sanja J. (Institute of Food Technology, N. S. (Serbia)), Kostadinović, Ljiljana M. (Institute of Food Technology, N. S. (Serbia)), Brkljača, Jovana S. (Institute of Food Technology, N. S. (Serbia)), Krulj, Jelena A. (Institute of Food Technology, N. S. (Serbia)), Manojlović, Maja S. (Faculty of Agriculture, N. S. (Serbia)), & Bodroža-Solarov, Marija I. (Institute of Food Technology, N. S. (Serbia)). (2014). The development and validation of HPLC method for quantification of DL- α -tocopherol in quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* willd.). *Food and Feed Research*, 41(2), 147–152. <http://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/2217-5369/2014/2217-53691402147P.pdf>
136. Surya, P. R. A., Wijaya, M. D., & Udiyani, D. P. C. (2024). Phytochemical Screening and Antioxidant Activity Analysis of N-Hexane Extract of *Sonneratia alba* Mangrove Leaves. *Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry*, 12(2), 631–635. <https://doi.org/10.14421/biomedich.2023.122.631-635>
137. Gurr, M. I., Robinson, M. P., James, A. T., Morris, L. J., & Howling, D. (1972). The substrate specificity of desaturases: The conversion of cis-12-octadecenoic acid into linoleic acid in different animal and plant species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 280(3), 415–421. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(72\)90247-0](https://doi.org/10.1016/0005-2760(72)90247-0)
138. Sudharsan, S., Saravanan, R., Shanmugam, A., Vairamani, S., & kumar, R. M. (2011). Isolation and Characterization of Octadecanoic Acid from The Ethyl Acetate Root Extract of *Trigonella foenum graecum* L. by Using Hydroponics Method. *Journal of Bioterrorism & Biodefense*, 2(1). <https://doi.org/10.4172/2157-2526.1000105>
139. Chaudhary, A., Choudhary, S., Sharma, U., Vig, A. P., & Arora, S. (2016). In vitro evaluation of Brassica sprouts for antioxidant and antiproliferative potential. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(5), 615–623. <https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000160>

140. Zhang, Z., Han, X., Wei, J., Xue, J., Yang, Y., Liang, L., Li, X., Guo, Q., Xu, Y., & Gao, Z. (2014). *Compositions and Antifungal Activities of Essential Oils from Agarwood of Aquilaria sinensis (Lour.) Gilg Induced by Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon. & Maubl.* 25(1), 20–26. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20130263>
141. LOTUS: *Natural Products Online*. (n.d.). Retrieved June 27, 2024, from <https://lotus.naturalproducts.net/search/simple/Phytane>
142. Eid, H. H., Shehab, N. G., & El Zalabani, S. M. (2014). GC-MS profile and cytotoxicity of the hydrodistilled and extracted volatiles of the buds and flowers of *Spathodea campanulata* P. Beauv. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 4(3), 196–208. <https://doi.org/10.1080/22311866.2014.936899>
143. Tapfuma, K. I., Nchabeleng, E. K., Adebo, O. A., Hussan, R., Williams, R. D., Ravuluvulu, A. B., Ndinteh, D. T., Gan, R. Y., Habimana, O., Niemann, N., Muganza, F. M., Mekuto, L., & Mavumengwana, V. (2020). Antibacterial activity and gas chromatography mass spectrometry (GC–MS)-based metabolite profiles of *Celtis africana* and its endophytic extracts. *Industrial Crops and Products*, 157(July), 112933. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112933>
144. Zhang, J., Gu, X., Yan, W., Lou, L., Xu, X., & Chen, X. (2022). Characterization of Differences in the Composition and Content of Volatile Compounds in Cucumber Fruit. *Foods*, 11(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/foods11081101>
145. Abdullah, A. Y. B., Wong, L. S., Samling, B., & Sim, S. F. (2024). Grading of Agarwood Based on Their Chemical Profiles Using GC-MS Incorporating Chemometric Approaches. *Malaysian Journal of Chemistry*, 26(2), 86–95. <https://doi.org/10.55373/mjchem.v26i2.86>
146. Siswadi, S., & Saragih, G. S. (2021). Phytochemical analysis of bioactive compounds in ethanolic extract of *Sterculia quadrifida* R.Br. *AIP Conference Proceedings*, 2353. <https://doi.org/10.1063/5.0053057>
147. Tyagi, T., & Agarwal, M. (2017). Phytochemical screening and GC-MS analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(1), 195–206. <https://www.phytojournal.com/archives/2017.v6.i1.1079/phytochemical-screening-and-gc-ms-analysis-of-bioactive-constituents-in-the-ethanolic-extract-of-pistia-stratiotes-l-and-eichhornia-crassipes-mart-solms>
148. Vijayashalini, P., Yamuna, P., Abirami, P., & Sharmila, M. (2017). GC-MS analysis of bioactive compounds in the entire plant parts of ethanolic extract of *Gomphrena decumbens* Jacq. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 5(3), 31–37.
149. Musa, A., Ibrahim, M., Aliyu, A., Abdullahi, M., Tajuddeen, N., Ibrahim, H., & Oyewale, A. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of hexane leaf extract of *Anisopus mannii* (Asclepiadaceae). *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(2), 129. <https://doi.org/10.5455/jice.20150106124652>

150. *glyceryl 1-linoleate* - Wikidata. (n.d.). Retrieved June 28, 2024, from <https://www.wikidata.org/wiki/Q27881752>
151. *Glyceryl monolinoleate* | C₂₁H₃₈O₄ | CID 5283469 - PubChem. (n.d.). Retrieved June 28, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5283469>
152. *1-monolinolein* (CHEBI:75568). (n.d.). Retrieved June 28, 2024, from <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:75568>
153. Chanda, S., Baravalia, Y., & Nagani, K. (2013). Spectral analysis of methanol extract of *Cissus quadrangularis* L. stem and its fractions. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(4), 149–157.
154. Edewor, T. I., Owa, S. O., Ologun, A. O., & Akinfemi, F. (2016). Quantitative determination of the saponin content and GC-MS study of the medicinal plant *Cassipourea filiformis* (linn.) leaves. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(2), 154–156. <https://doi.org/10.12980/jclm.4.2016j5-210>
155. *Rutin* | C₂₇H₃₀O₁₆ | CID 5280805 - PubChem. (n.d.). Retrieved June 30, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280805>
156. *rutin* (CHEBI:28527). (n.d.). Retrieved June 30, 2024, from <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:28527>
157. Stojković, D., Petrović, J., Soković, M., Glamočlija, J., Kukić-Marković, J., & Petrović, S. (2013). In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3205–3208. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6156>
158. Scapinello, J., Müller, L. G., Schindler, M. S. Z., Anzollin, G. S., Siebel, A. M., Boligon, A. A., Niero, R., Saraiva, T. E. S., Maus, N. P., Betti, A. H., Oliveira, J. V., Magro, J. D., & de Oliveira, D. (2019). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl (Araceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 236(January), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.037>
159. Roopashree, K. M., & Naik, D. (2019). Advanced method of secondary metabolite extraction and quality analysis. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 1829–1842.
160. *Epicatechin* | C₁₅H₁₄O₆ | CID 72276 - PubChem. (n.d.). Retrieved June 30, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72276>
161. Zahir, A. A., Rahuman, A. A., Bagavan, A., Geetha, K., Kamaraj, C., & Elango, G. (2012). Evaluation of medicinal plant extracts and isolated compound epicatechin from *Ricinus communis* against *Paramphistomum cervi*. *Parasitology Research*, 111(4), 1629–1635. <https://doi.org/10.1007/S00436-011-2589-8/METRICS>
162. Abdullah, A. Y. B., Wong, L. S., Samling, B., & Sim, S. F. (2024). Grading of Agarwood Based on Their Chemical Profiles Using GC-MS Incorporating Chemometric Approaches. *Malaysian Journal of Chemistry*, 26(2), 86–95. <https://doi.org/10.55373/mjchem.v26i2.86>

163. (-)-epicatechin (CHEBI:90). (n.d.). Retrieved June 30, 2024, from <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:90>
164. Lee, G.-L., Shim, C.-J., Chang, Y.-I., Choi, S.-H., Oh, H.-R., & Oh, M.-J. (2001). Antimicrobial Activities of (-)Epicatechin from *Ulmus davidiana* var. *japonica* Cortex. In *Journal of Food Science & Nutrition* (Vol. 6, Issue 4, pp. 230–234).
165. Bae, Y.-I., Jeong, C.-H., & Shim, K.-H. (2005). Antioxidative and Antimicrobial Activity of Epicatechin Isolated from Leaves of Loquat (*Eriobotrya japonica*). In *Preventive Nutrition and Food Science* (Vol. 10, Issue 2, pp. 118–121). <https://doi.org/10.3746/jfn.2005.10.2.118>
166. María Monogas Juan, Fernando Sánchez Patán, Jesús Eduardo Quintanilla López, Rosa Lebrón Aguilar, Begoña Bartolomé Sualdea, Mirtha Navarro Hoyos (2013) Extracto fenólicos de *Uncaria tomentosa* L. (uña de gato) que contienen procianidinas, propelargonidinas y flavanolignanos, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.
167. Liu, C., Long, H., Wu, X., Hou, J., Gao, L., Yao, S., Lei, M., Zhang, Z., Guo, D. an, & Wu, W. (2021). Quantitative and fingerprint analysis of proanthocyanidins and phenylpropanoids in *Cinnamomum verum* bark, *Cinnamomum cassia* bark, and *Cassia* twig by UPLC combined with chemometrics. *European Food Research and Technology*, 247(11), 2687–2698. <https://doi.org/10.1007/S00217-021-03795-X/METRICS>
168. Procyanidin B1 | C30H26O12 | CID 11250133 - PubChem. (n.d.). Retrieved June 30, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11250133>
169. 5,7-Dihydroxy-2-(2-hydroxyphenyl)-3-[3,4,5-trihydroxy-6-[(3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one | C27H30O15 | CID 5883291 - PubChem. (n.d.). Retrieved July 1, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5883291>
170. Mahmoud, H. N. S., El-Shazly, M. A. M., Saad, A. M., Refahy, L. A., Ghareeb, M. A., & Rizk, S. (2023). UPLC-QTOF/MS-assisted chemical profiling of *Daucus carota* leaf extract and evaluation of its antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activities: Evidence from in vitro and in silico studies. *Egyptian Journal of Chemistry*, 66(13), 2175–2190. <https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2023.209102.7935>
171. Shehata, M. G., Awad, T. S., Asker, D., El Sohaimy, S. A., Abd El- Aziz, N. M., & Youssef, M. M. (2021). Antioxidant and antimicrobial activities and UPLC-ESI-MS/MS polyphenolic profile of sweet orange peel extracts. *Current Research in Food Science*, 4, 326–335. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2021.05.001>
172. Krasteva, D., Ivanov, Y., Chengolova, Z., & Godjevargova, T. (2023). *Antimicrobial Potential , Antioxidant Activity , and Phenolic Content of Grape Seed Extracts from Four Grape Varieties*.
173. Api, A. M., Belmonte, F., Belsito, D., Biserta, S., Botelho, D., Bruze, M., Burton, G. A., Buschmann, J., Cancellieri, M. A., Dagli, M. L., Date, M., Dekant, W., Deodhar, C., Fryer, A. D., Gadhia, S., Jones, L., Joshi, K., Lapczynski, A., Lavelle, M., ... Tsang, S. (2019). RIFM fragrance ingredient safety

- assessment, cinnamaldehyde, CAS Registry Number 104-55-2. *Food and Chemical Toxicology*, 134(June), 110710. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110710>
174. Shete, C. C., Wadkar, S. S., Gaikwad, N. B., & Patil, K. S. (2014). Antioxidant activity and antibacterial screening of tubers of *amorphophallus konkanensis* and *amorphophallus bulbifer* (Araceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(11), 431–436.
 175. Rodríguez-Rodríguez, R., Médica, B., CIATEJ, F., García-Fajardo, A. J. A., & Espinosa-Andrews, H. (2016). *Ácidos grasos : Clasificación e importancia en la salud humana*. Editores : H . Espinosa Andrews . E . Gastélum Martínez . (Issue December).https://ciatej.mx/files/el_ciatej/comunicacion/divulgacion/compuestos_bioactivos.pdf#page=16
 176. Escalona-Arranz, J. C., Pérez-Rosés, R., Urdaneta-Laffita, I., Morris-Quevedo, H., Camacho-Pozo, M. I., Rodríguez-Amado, J., & Sierra González, G. (2013). Role of polyphenols in the antimicrobial activity of ethanol *Tamarindus indica* L leaves fluid extract. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 12(5), 516–522.
 177. Yu, R., Li, X., Yi, P., Wen, P., Wang, S., Liao, C., Song, X., Wu, H., He, Z., & Li, C. (2023). Isolation and Identification of Chemical Compounds from *Agaricus blazei* Murrill and Their In Vitro Antifungal Activities. *Molecules*, 28(21), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules28217321>
 178. Rodríguez-Valdovinos, K. Y., Salgado-Garciglia, R., Vázquez-Sánchez, M., Álvarez-Bernal, D., Oregel-Zamudio, E., Ceja-Torres, L. F., & Medina-Medrano, J. R. (2021). Quantitative analysis of rutin by hptlc and in vitro antioxidant and antibacterial activities of phenolic-rich extracts from *verbena sphaerocephala*. *Plants*, 10(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants10030475>
 179. Singh, M., Govindarajan, R., Rawat, A. K. S., & Khare, P. B. (2008). Antimicrobial flavonoid rutin from *Pteris vittata* L. against pathogenic gastrointestinal microflora. *American Fern Journal*, 98(2), 98–103. [https://doi.org/10.1640/0002-8444\(2008\)98\[98:AFRFPV\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1640/0002-8444(2008)98[98:AFRFPV]2.0.CO;2)
 180. Al-majmaie, S., Nahar, L., Sharples, G. P., & Wadi, K. (2019). *LJMU Research Online Isolation and Antimicrobial Activity of Rutin and its derivatives from Ruta chalepensis (Rutaceae) growing in Iraq*.
 181. Singh, A., Gupta, R., & Pandey, R. (2016). Rice seed priming with picomolar rutin enhances rhizospheric *Bacillus subtilis* CIM colonization and plant growth. *PLoS ONE*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146013>
 182. Górniak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 18, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>
 183. Kauffmann, A. C., & Castro, V. S. (2023). Phenolic Compounds in Bacterial Inactivation: A Perspective from Brazil. *Antibiotics* 2023, Vol. 12, Page 645, 12(4), 645. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12040645>

184. Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., Rivas, C. L., Requena, T., Rodríguez, J. M., & Bartolomé, B. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 161(5), 372–382. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.04.006>
185. Makarewicz, M., Drożdż, I., Tarko, T., & Duda-Chodak, A. (2021). The interactions between polyphenols and microorganisms, especially gut microbiota. *Antioxidants*, 10(2), 1–70. <https://doi.org/10.3390/antiox10020188>
186. Vatter, D. A., Lin, Y. T., Labbe, R. G., & Shetty, K. (2004). Phenolic antioxidant mobilization in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using food grade fungus *Lentinus edodes* and effect on antimicrobial activity against select food borne pathogens. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5(1), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2003.09.002>
187. Meyer, K. J., & Nodwell, J. R. (2021). Biology and applications of co-produced, synergistic antimicrobials from environmental bacteria. *Nature Microbiology* 2021 6:9, 6(9), 1118–1128. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00952-6>
188. Challis, G. L., & Hopwood, D. A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14555–14561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1934677100>
189. Griffin, S. G., Wyllie, S. G., Markham, J. L., & Leach, D. N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(5), 322–332. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199909/10\)14:5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199909/10)14:5)
190. Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, 24(13), 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>
191. Dias, K. J. S. D. O., Miranda, G. M., Bessa, J. R., Araújo, A. C. J. De, Freitas, P. R., Almeida, R. S. De, Paulo, C. L. R., Neto, J. B. D. A., Coutinho, H. D. M., & Ribeiro-Filho, J. (2022). Terpenes as bacterial efflux pump inhibitors: A systematic review. *Frontiers in Pharmacology*, 13(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.953982>
192. Gallucci, M. N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygodlo, J., & Demo, M. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(6), 348–354. <https://doi.org/10.1002/FFJ.1948>
193. dos Santos Barbosa, C. R., Scherf, J. R., de Freitas, T. S., de Menezes, I. R. A., Pereira, R. L. S., dos Santos, J. F. S., de Jesus, S. S. P., Lopes, T. P., de Sousa Silveira, Z., de Moraes Oliveira-Tintino, C. D., Júnior, J. P. S., Coutinho, H. D. M., Tintino, S. R., & da Cunha, F. A. B. (2021). Effect of Carvacrol and Thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus*

strains. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 53(4), 489–498.
<https://doi.org/10.1007/s10863-021-09906-3>

194. C. Bhuvaneswari, C. B., & R. Sivasubramanian, R. S. (2023). Phytochemical Analysis of *Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson and Its Standardisation by HPLC and HPTLC. *Oriental Journal Of Chemistry*, 39(1), 56–68. <https://doi.org/10.13005/ojc/390107>

