



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DE PLANTAS USADAS PARA COMBATIR EL COVID-19 EN
COMUNIDADES KICHWA DE LA AMAZONÍA ECUATORIANA**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: JEFFERSON VLADIMIR PASTUÑA FASSO

TUTORA: PhD. ZULAY MARINA NIÑO RUIZ

COTUTORA: PhD. NOROSKA GABRIELA SALAZAR MOGOLLON

Napo – Ecuador

2022

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 29 de noviembre de 2022

Yo, **Jefferson Vladimir Pastuña Fasso** con documento de identidad N° **0504058371**, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título **Ingeniero en Biotecnología** son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

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

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Jefferson Vladimir Pastuña Fasso

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Yo, **Jefferson Vladimir Pastuña Fasso**, con documento de identidad N° **0504058371**, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: **Caracterización química y actividad antimicrobiana de plantas usadas para combatir el COVID-19 en comunidades Kichwa de la Amazonía ecuatoriana**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ÓRGANICO 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.

Tena, 29 de noviembre de 2022

Jefferson Vladimir Pastuña Fasso

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: **Caracterización química y actividad antimicrobiana de plantas usadas para combatir el Covid-19 en comunidades Kichwa de la Amazonía ecuatoriana**, en la modalidad de: tesis, fue realizado por: **Jefferson Vladimir Pastuña Fasso**, bajo mi dirección.

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

Tena, 29 de noviembre de 2022



Firmado digitalmente por:
**ZULAY
MARINA**

.....
Zulay Marina Niño Ruiz
C.I: 1157560303



Firmado digitalmente por:
**NOROSKA GABRIELA
SALAZAR MOGOLLON**

.....
Noroska Gabriela Salazar Mogollon
C.I: 1757494453

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto “Reactivación económica del Cantón Arajuno post-COVID basado en la consolidación del Sistema Agroproductivo Tradicional Amazónico Chakra y la creación de valor agregado local e integración al mercado de sus productos” por el financiamiento de la tesis. Al Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) Municipal Intercultural y Plurinacional Arajuno por contribuir con el transporte y personal capacidad durante el muestreo en campo de las comunidades Chuyayaku, Nushinu Ishpinku y Shiwa Kucha. A la Fundación Pachamama por coordinar las salidas de campo realizadas en las comunidades Chuyayaku, Nushinu Ishpinku y Shiwa Kucha. Al técnico del Laboratorio de Química 1 Roxana Llve por el apoyo en los ensayos químicos cualitativos y cuantitativos. Al técnico del Laboratorio de Productos Naturales Joel Medina por el apoyo en los análisis de cromatografía líquida. Al técnico del Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica Nina Espinosa por el apoyo en los ensayos antimicrobianos. A mis tutoras Zulay Niño y Gabriela Salazar por permanecer siempre pendiente de los diferentes acontecimientos surgidos durante el desarrollo de la tesis.

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicado a mis padres, tíos y abuelos por el apoyo incondicional brindada durante toda mi vida académica. En especial a mis abuelos por el apoyo durante mi infancia, a la familia de mi tío Xavier Fasso por el apoyo durante mi formación en el colegio y a mis padres por el apoyo desmesurado en mi formación universitaria.

ÍNDICE GENERAL

CARÁTULA

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad	ii
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
Antecedentes.....	1
Planteamiento del problema	2
Justificación de la investigación	3
Objetivos de la investigación	3
<i>Objetivo general</i>	3
<i>Objetivos específicos</i>	3
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	5
Etnofarmacología recolección y tratamiento de datos	5
Recolección de muestra vegetal.....	5
Preparación de los extractos vegetales	6
Ensayos químicos cualitativos	7
<i>Determinación cualitativa de flavonoides</i>	7
<i>Determinación cualitativa de polifenoles</i>	7
<i>Determinación cualitativa de alcaloides</i>	7
<i>Determinación cualitativa de terpenoides</i>	8
Ensayos químicos cuantitativos	8
<i>Cuantificación de flavonoides totales</i>	8
<i>Cuantificación de polifenoles totales</i>	9

<i>Cuantificación de Alcaloides totales</i>	10
Ensayo antimicrobiano.....	10
<i>Dilución del EAL y controles positivos</i>	10
<i>Activación de cepas microbianas</i>	11
<i>Siembra y antagonismo microbiano</i>	11
<i>Medición del diámetro de los halos de inhibición</i>	12
Identificación de moléculas presentes en los extractos de plantas	13
<i>Extracción en Fase Sólida (SPE)</i>	13
<i>Preparación de estándares</i>	13
<i>Acondicionamiento del UPLC-MS/MS</i>	14
<i>Tratamiento de datos</i>	14
Tratamiento estadístico de datos	15
CAPÍTULO II: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	17
Etnofarmacología del cantón Arajuno	17
Resultado de los ensayos químicos cualitativos	18
Resultado de los ensayos químicos cuantitativos	19
Resultado del ensayo antimicrobiano	20
Moléculas identificadas en los extractos de plantas.....	22
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....	32
<i>Aspidosperma</i> sp.	32
<i>Couroupita guianensis</i> Aubl.	37
<i>Monteverdia laevis</i> (Reissek) Biral.....	40
<i>Protium sagotianum</i> Marchand.	44
Metabolitos antimicrobianos	46
Metabolitos antivirales	47
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
Conclusiones	49
Recomendaciones	50
REFERENCIAS.....	51
ANEXOS... ..	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Factor de Consenso Cultural (ICF) de las plantas usadas en preparados medicinales para el tratamiento del COVID-19.....	17
Tabla 2.	Ensayo químico cualitativo de extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de las plantas del cantón Arajuno usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.	18
Tabla 3.	Contenido de metabolitos totales presentes en extracto acuoso liofilizado de las plantas del cantón Arajuno usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.....	19
Tabla 4.	Parámetros analíticos de calidad para la validación del método verificados en la cuantificación de metabolitos de interés mediante espectrofotometría.	20
Tabla 5.	Antagonismo microbiano de extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de las plantas del cantón Arajuno usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.....	21
Tabla 6.	Estándar de polifenoles verificados en la biblioteca mediante el software MSDIAL.	23
Tabla 7.	Metabolitos con nivel 2 de identificación presentes en extracto acuoso liofilizado de plantas del cantón Arajuno usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.	23
Tabla 8.	Metabolitos reportados en la bibliografía para la planta <i>Couroupita guianensis</i> Aubl.....	39
Tabla 9.	Metabolitos reportados en la bibliografía para la planta <i>Monteverdia laevis</i> (Reissek) Biral.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Número de metabolitos de interés identificados en extracto acuoso liofilizado de plantas usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.....30
- Figura 2.** Metabolitos relacionados en las plantas del cantón Arajuno usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.....31

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Entrevista realizada a los sabios de las tres comunidades del cantón Arajuno.
- Anexo 2.** Sistematización de la información etnobotánica recopilada sobre las plantas usadas en preparados medicinales para el tratamiento del COVID-19.
- Anexo 3.** Secado bajo sombra de las estructuras morfológicas de las plantas usadas en preparados medicinales para el tratamiento del COVID-19.
- Anexo 4.** Ensayo NaOH/HCl y Shinoda para la determinación de flavonoides en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo.
- Anexo 5.** Ensayo cloruro férrico (FeCl₃) para la determinación de polifenoles en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo.
- Anexo 6.** Ensayo Dragendorff y Wagner para la determinación de alcaloides en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo.
- Anexo 7.** Ensayo Salkowski para la determinación de terpenoides en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo.
- Anexo 8.** Curva de calibración de Quercetina para cuantificación de flavonoides totales presentes en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de las plantas del cantón Arajuno.
- Anexo 9.** Curva de calibración de Ácido Gálico para cuantificación de polifenoles totales presentes en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de las plantas del cantón Arajuno.
- Anexo 10.** Curva de calibración de Atropina para cuantificación de alcaloides totales presentes en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de las plantas del cantón Arajuno.
- Anexo 11.** Ensayo antimicrobiano mediante halos de inhibición de extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de la planta *C. guianensis*.
- Anexo 12.** Ensayo antimicrobiano mediante halos de inhibición de extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de la planta *M. laevis*.
- Anexo 13.** Ensayo antimicrobiano mediante halos de inhibición de extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de la planta *P. sagotianum*.
- Anexo 14.** Ensayo antimicrobiano mediante halos de inhibición de extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de la planta *Aspidosperma* sp.

- Anexo 15.** Grupos de metabolitos presentes en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de plantas usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.
- Anexo 16.** Cromatograma de Iones Totales (TIC) de las 4 plantas del cantón Arajuno usadas en preparados medicinales para el tratamiento del COVID-19 obtenidos en UPLC-MS/MS.
- Anexo 17.** Cromatogramas de coincidencia con compuestos presentes en la biblioteca.

RESUMEN

La principal fuente de medicina de la mayoría de las comunidades amazónicas son las plantas. El COVID-19 fue una enfermedad que constituyó una amenaza grave para la vida de muchas personas de las comunidades amazónicas debido a su vulnerabilidad. Sin embargo, zonas como el cantón Arajuno mostraron baja tasa de mortalidad, en principio atribuido al uso de plantas medicinales en forma de jarabes preparados artesanalmente. El objetivo del trabajo fue caracterizar químicamente extractos de cuatro especies vegetales usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19 por tres comunidades Kichwa del cantón Arajuno. En campo se registraron 13 plantas usadas en los jarabes anti-COVID-19, de las cuales se caracterizaron extractos acuosos liofilizados de las cuatro más utilizadas: corteza de tallo de *Aspidosperma* sp., *C. guianensis*, *M. laevis* y *P. sagotianum*. Se encontró la presencia cualitativa y/o cuantitativa de: alcaloides, flavonoides, polifenoles y terpenoides en *Aspidosperma* sp.; flavonoides, polifenoles y terpenoides en *M. laevis*; flavonoides y polifenoles en las especies *C. guianensis* y *P. sagotianum*. Resultados complementados con la identificación de 59 moléculas conocidas mediante UPLC-MS/MS. Además, se encontró actividad antimicrobiana en *C. guianensis*, *M. laevis* y *P. sagotianum*. En general las plantas presentaron grupos de metabolitos reportados en bibliografía como antagonistas de SARS-CoV-2, el lignano antiviral Arctigenin (**30**) y moléculas con propiedades antimicrobianas.

Palabras claves: *Aspidosperma* sp., *C. guianensis*, *M. laevis*, *P. sagotianum*, COVID-19, plantas medicinales amazónicas.

ABSTRACT

The main source of medicine for most Amazonian communities are plants. COVID-19 was a disease that constituted a serious threat to the lives of many people in Amazonian communities due to their vulnerability. Instead, places such as Arajuno showed a low mortality rate, probably for the medicinal plants used. Therefore, the present investigation aimed to chemically characterize four plant species extracts used in medicinal recipes for the treatment of COVID-19 by three Kichwa communities in Arajuno. In the countryside, 13 plants used in anti-COVID-19 syrups were found, of which lyophilized aqueous extracts (EAL, Spanish acronyms) of the four most used were characterized: stem bark of *Aspidosperma* sp., *C. guianensis*, *M. laevis* and *P. sagotianum*. Qualitative and/or quantitative presence of: alkaloids, flavonoids, polyphenols and terpenes were found in *Aspidosperma* sp.; flavonoids, polyphenols and terpenes were found in *M. laevis*; flavonoids and polyphenols were found in the species *C. guianensis* and *P. sagotianum*. Results complemented by the identification of 59 known molecules by UPLC-MS/MS. Additionally, antimicrobial activity was found in *C. guianensis*, *M. laevis*, and *P. sagotianum*. In sum, plants showed groups of metabolites reported in the literature as SARS-CoV-2 antagonists, the antiviral lignan Arctigenin (**30**), and molecules with antimicrobial properties.

Keywords: *Aspidosperma* sp., *C. guianensis*, *M. laevis*, *P. sagotianum*, COVID-19, Amazonian medicinal plants.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Antecedentes

Ecuador representa menos del 0.2 % de la superficie terrestre, sin embargo, es uno de los 17 países megadiversos con aproximadamente el 10 % de todas las especies de plantas en el mundo [1]. El 42 % del territorio ecuatoriano corresponde a la Amazonía caracterizada por contener un alto número de especies de plantas [2]. Muchas de las cuales son la principal fuente de medicina para decenas de miles de habitantes que dependen de los bosques [3,4]. Una investigación realizada en el Alto Napo de la Amazonía ecuatoriana encontró 101 especies de plantas medicinales, a las cuales se les atribuyó sus propiedades terapéuticas por los grupos de metabolitos presentes en otras plantas de la misma familia [5]. Otro estudio realizado en la provincia de Pastaza encontró que cerca del 80% de las 540 especies de plantas útiles eran empleadas en la medicina tradicional [2].

Arajuno es uno de los cantones de la provincia de Pastaza habitado principalmente por las nacionalidades Kichwa (74%), Waorani (15%) y Shuar (3%) [6]. Investigaciones en etnomedicina de estas nacionalidades muestran que el uso y la experimentación con plantas aumenta frente a nuevos eventos epidemiológicos [7,8]. Por ejemplo, aquellas poblaciones que durante la colonización estuvieron más expuestas a nuevas enfermedades (poliomielitis, sarampión, viruela, entre otras) desarrollaron en mayor medida su farmacopea [8]. El COVID-19 fue el acontecimiento epidemiológico más reciente que constituyó una grave amenaza a la salud de las poblaciones amazónicas debido a la poca o nula existencia de infraestructuras de salud, difícil acceso, susceptibilidad inmunológica, entre otras razones [9]. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estas poblaciones empíricamente usaron plantas para el tratamiento del COVID-19, tal es el caso de los Kichwa del cantón Arajuno [10]. Hasta el momento, la efectividad de estas plantas se fundamenta en hechos empíricos; sin embargo, según reportes epidemiológicos ninguna persona falleció a causa de COVID-19 en el cantón Arajuno [11], donde la pandemia se hizo generalizada y la población se protegió ingiriendo diariamente el jarabe en base a plantas medicinales (comunicación personal: W. Franco). Además, investigaciones *in vitro* e *in silico* sobre metabolitos de plantas mostraron que andamios moleculares de flavonoides (del tipo flavonol y chalcona),

polifenoles, alcaloides, terpenos y terpenoides tuvieron interacciones antagonistas frente a estructuras virales de la familia de los coronavirus [12–14].

El estudio de metabolitos en plantas se puede realizar de dos maneras, mediante el cribado vegetal de plantas recolectadas al azar o estudiando aquellas plantas que son usadas en la medicina tradicional, este último método ha sido muy empleado en la Amazonía [15]. La caracterización química de plantas permite evaluar la posible presencia de actividad biológica dependiendo de los compuestos identificados, pues un número significativo de fármacos utilizados en la medicina moderna son moléculas derivadas de plantas. Entre 1981 y 2010 el 34% de los fármacos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE.UU. (FDA) fueron productos naturales o derivados directos de los mismos [16]. De esta manera se entendería que muchas de las plantas medicinales que aún no han sido estudiadas podrían ser recursos importantes de nuevos medicamentos.

Planteamiento del problema

Alrededor del 48% de los ecuatorianos usan plantas medicinales que en la mayoría de los casos no tienen estudios científicos comprobados [17]. Las investigaciones sobre plantas medicinales en la Amazonía ecuatoriana han sido mayoritariamente en etnomedicina, reportando principalmente la especie y su uso tradicional [5,7]. Tan solo una investigación ha respaldado el uso tradicional de las especies *Siparuna aspera*, *Siparuna macrotepala*, *Piper leticianum*, *Piper augustum* y *Hedychium coronarium* mediante la caracterización química de extractos de aceites esenciales [1]. Tres trabajos referentes a plantas medicinales han sido encontrados para el cantón Arajuno, en los cuales se reportan principalmente actividad biológica de extractos de plantas y reporte de uso [18–20]. La necesidad de la validación científica mediante la caracterización química de plantas se ve impulsada aún más por la reciente emergencia sanitaria causada por el COVID19, debido al consumo de preparados medicinales a base de plantas que pudieran poner en peligro la salud de las personas [17]. Por otro lado, estudios en etnomedicina de la Amazonía atribuyen la pronta recuperación del COVID-19 por el consumo de plantas medicinales [17,21]. Sin embargo, hasta el momento no se ha presentado evidencia científica que respalde el uso de dichas plantas en el tratamiento del COVID-19 [22].

Justificación de la investigación

La caracterización química del extracto de plantas medicinales permitirá que en futuras investigaciones se pueda identificar el componente activo en la planta a través de ensayos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. También se podría realizar ajustes a moléculas potenciales, esto consiste en realizar modificaciones químicas con el fin de optimizar el compuesto en intensidad y selectividad [23]. A fin de abordar el problema epidemiológico de plantas medicinales empleadas en el tratamiento del COVID-19, la caracterización química de extractos de estas plantas podría validar su uso mediante la actividad de metabolitos previamente reportados en bibliografía [24]. Finalmente, los metabolitos que se reporten en esta investigación pueden ser usados en ensayos *in silico* para la identificación de moléculas con potencial antiviral [25].

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Caracterizar químicamente extractos de plantas usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19 por los habitantes de las comunidades Chuyayaku, Nushinu Ishpinku y Shiwa Kucha del cantón Arajuno provincia de Pastaza, Ecuador y determinación de su actividad antimicrobiana.

Objetivos específicos

Determinar mediante etnofarmacología cuantitativa las plantas con mayor consenso cultural en el tratamiento del COVID-19 para la caracterización química y ensayo antimicrobiano.

Determinar cualitativa y cuantitativamente flavonoides, polifenoles, alcaloides y terpenoides en extracto de plantas de interés farmacológico seleccionadas mediante la etnofarmacología de las comunidades del cantón Arajuno.

Identificar las moléculas presentes en los extractos de plantas de interés farmacológico mediante metabolómica no dirigida, a través de Cromatografía Líquida de Ultra

Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (UPLC-MS/MS, por sus siglas en inglés).

Determinar la actividad antimicrobiana (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*) de los extractos de plantas de interés farmacológico mediante halos de inhibición en agar por difusión en pocillos.

Validar el uso tradicional de las plantas de interés farmacológico en el tratamiento del COVID-19 mediante una revisión bibliográfica de la actividad biológica de las biomoléculas identificadas en esta investigación.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

Etnofarmacología recolección y tratamiento de datos

El muestreo fue del tipo no probabilístico dirigido al “conocimiento experto”, también conocido como saberes ancestrales de chamanes, curanderos o sanadores [26]. Se realizaron entrevistas estructuradas sobre las plantas usadas en el tratamiento de COVID-19 (**Anexo 1**). El 21 de septiembre de 2021 se visitó la comunidad de Chuyayaku donde se entrevistó al sabio Edgar Vargas. Al día siguiente (22/09/2021), se visitó las comunidades Shiwa Kucha y Nushinu Ishpinku; en la primera comunidad se entrevistó a un equipo conformado por los sabios, Jorge Alvarado, Remigio Andi y Marcia Calapucha; en la segunda comunidad se entrevistó al sabio Hector Lopez. La información recopilada fue sistematizada para su respectivo tratamiento (**Anexo 2**). Se usó el índice cuantitativo Factor de Consenso Cultural (ICF, por sus siglas en inglés) para determinar las plantas con mayor valor terapéutico a nivel de etnofarmacología.

$$ICF = \frac{n_{ur} - n_{spp.usada}}{n_{ur} - 1}$$

Donde, n_{ur} , es el número de reportes de uso por categoría de uso y $n_{spp.usada}$, es el número de especies usadas por categoría de uso [27].

Debido a que la investigación se centró en plantas empleadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19, dicha categoría de uso no fue considerada en el cálculo del ICF. Las categorías de uso consideradas para el análisis fueron aquellos relacionados con los síntomas del COVID-19 publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [28].

Recolección de muestra vegetal

El recurso vegetal de las comunidades fue recolectado y estudiado con autorización No. 1144 emitido por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAE). Las muestras vegetales para fines experimentales fueron recolectadas de acuerdo con los métodos tradicionales de las comunidades. Las cortezas de tallo se obtuvieron mediante

el uso de un machete (cuchillo grande con hoja ancha), con el cual se realizaron cuatro cortes formando un cuadrado sobre la corteza del tallo a aproximadamente un metro de altura sobre el nivel del suelo. Adicionalmente, en algunos casos fue necesario el uso de un formón (o escoplo, herramienta manual de corte libre utilizada en carpintería) para la separación de la corteza del tallo de la planta. Las muestras vegetales recolectadas fueron colocadas en fundas papel Kraft tipo panadería (PT4, 15 x 27 cm), las cuales fueron etiquetadas con el nombre común de la planta, comunidad y fecha de recolección. Antes de su uso, las cortezas de tallo fueron secadas bajo sombra por una semana (**Anexo 3**).

Las muestras vegetales para el herbario fueron recolectadas por el equipo botánico del proyecto integrado por los botánicos Gabriel Picón, Gabriel Grefa y la estudiante María José Sánchez, quienes realizaron la colección, descripción e identificación taxonómica de las plantas, y posteriormente prepararon los ejemplares botánicos para el envío al herbario de la Universidad Estatal Amazónica. Los ejemplares de verificación botánica fueron registrados con los códigos MB8390, MB8397, MB8404, MB8412, MB8440, MB8446, MB8449 y MB8451.

Preparación de los extractos vegetales

Se prepararon extractos acuosos con 25 g de material vegetal en relación 1:5 de acuerdo con los métodos detallados en Aragão et al. (2018) y Stintzing et al. (2004) [29,30]. La maceración fue de 15 días bajo sombra con 20 minutos de ultrasonido una vez por día. Posteriormente, los extractos fueron filtrados en un colador plástico para luego ser filtrados al vacío con papel filtro (MicroLAB Scientific). Alrededor de 35 ml de los extractos filtrados fueron colocados en tubos Falcón de 50 ml, congelados a -80 °C por un día y colocadas en el liofilizador (BenchTop pro with Omnitronics) por dos semanas. El polvo liofilizado (extracto acuoso liofilizado) se conservó a -16 °C hasta su uso. El cálculo del rendimiento de extracción se realizó mediante el uso de la ecuación descrita en Truong et al. (2019) [31].

$$\text{Rendimiento de extracción (\%)} = \frac{\text{Masa del extracto liofilizado}}{\text{Masa seca de la muestra}} \times 100$$

Ensayos químicos cualitativos

Determinación cualitativa de flavonoides

Ensayo NaOH/HCl: aproximadamente 5 mg de extracto acuoso liofilizado fue disuelta en 2 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 4 % (m/v). Se usó 5 gotas agua destilada como blanco control y 5 mg de Quercetina (Sigma-Aldrich) como control positivo para flavonoides, los controles recibieron el mismo tratamiento de las muestras durante el ensayo. Luego, a cada una de las mezclas se le añadió 5 gotas de ácido clorhídrico concentrado (HCl). Una solución amarilla que se tornó incolora al agregar HCl indicó la presencia de flavonoides. [32]

Ensayo Shinoda: Alrededor de 2,5 mg de extracto acuoso liofilizado fue disuelto en 1 ml de HCl concentrado con una pequeña cantidad de magnesio metálico (Mg). Se usó 5 gotas de agua destilada como blanco control y 5 mg de Quercetina como control positivo para flavonoides, los controles recibieron el mismo tratamiento de las muestras durante el ensayo. La mezcla se dejó en reposo por 5 minutos, se añadió 1 ml alcohol isoamílico, se homogeneizó mediante vortex y se dejó en reposo por una noche para la separación de fases. El ensayo fue considerado positivo cuando el alcohol isoamílico adoptó una de las siguientes coloraciones, amarillo, naranja, carmelita o rojo, intenso en todos los casos. [33]

Determinación cualitativa de polifenoles

Ensayo de cloruro férrico (FeCl_3): un aproximado de 5 mg extracto acuoso liofilizado se disolvió en 1 ml agua destilada. Se usó 5 gotas de agua destilada como blanco control y 5 mg de Quercetina como control positivo, los controles recibieron el mismo tratamiento de las muestras durante el ensayo. Luego se colocó unas gotas de solución de FeCl_3 al 1% (m/v). La coloración intensa de las muestras en verde, púrpura, azul o negro mostró la presencia de polifenoles. [34]

Determinación cualitativa de alcaloides

Ensayo Dragendorff y Wagner: aproximadamente 12 mg de extracto acuoso liofilizado fue disuelto en 2 ml HCl al 10 % (v/v). Se usó agua destilada como blanco control y

alrededor de 5 mg de Atropina (Sigma Life Science) como control positivo para alcaloides, los controles recibieron el mismo tratamiento de las muestras durante el ensayo. Los extractos ácidos fueron centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm y se recuperó el sobrenadante. El pH del sobrenadante recuperado fue ajustado a 6 con una solución de amoníaco diluido (NH_3). Finalmente, se colocó gotas del reactivo comercial Dragendorff (Sigma-Aldrich) y el preparado de Wagner según corresponda, un marrón rojizo en ambos casos indicó la presencia de alcaloides. [32]

El reactivo Wagner se preparó de acuerdo con los métodos detallados en el trabajo de Villagomez (2007) [35]. Para una solución Wagner de 25 ml, se midió en una balanza analítica (Ohaus) 317.5 mg de yodo (I) y 500 mg de yoduro de potasio (KI). El KI fue disuelto en 1.250 ml de agua destilada y colocada en un balón aforado de 25 ml junto con el yodo pesado anteriormente. Luego, el balón fue aforado con agua destilada y se homogeneizó mediante inmersión. Posteriormente, el balón fue cubierto con papel aluminio para proteger de la luz y conservado a 20 °C hasta su uso.

Determinación cualitativa de terpenoides

Ensayo Salkowski: aproximadamente 5 mg de extracto acuoso liofilizado fue disuelta en 1 ml de metanol, la mezcla se homogeneizó mediante vortex, se dejó en reposo por alrededor de 1 hora y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante recuperado fue mezclado con 1 ml de cloroformo mediante vortex. Luego, se adicionó cuidadosamente por las paredes ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Se usó agua destilada como blanco control y alrededor de 5 mg de Alcanfor (Walrus Brand) como control positivo, los controles recibieron el mismo tratamiento de las muestras durante el ensayo. Una coloración marrón rojiza en la interfase mostró la presencia de terpenoides. [36,37]

Ensayos químicos cuantitativos

Cuantificación de flavonoides totales

El método fue estandarizado en el Laboratorio de Química 1 de la Universidad Regional Amazónica Ikiám. Se usaron los métodos descritos en Wang et al. (2019) con modificaciones detalladas a continuación [38]. Los extractos acuosos liofilizados fueron disueltos en agua destilada y metanol. Se prepararon 9 niveles de Quercetina en un

intervalo de trabajo de 1-16 $\mu\text{g/ml}$ (nivel 1 = 1 $\mu\text{g/ml}$, nivel 2 = 2 $\mu\text{g/ml}$, nivel 3 = 3 $\mu\text{g/ml}$, nivel 4 = 4 $\mu\text{g/ml}$, nivel 5 = 5 $\mu\text{g/ml}$, nivel 6 = 7 $\mu\text{g/ml}$, nivel 7 = 10 $\mu\text{g/ml}$, nivel 8 = 13 $\mu\text{g/ml}$ y nivel 9 = 16 $\mu\text{g/ml}$), se usaron dos controles positivos (Quercetina disuelta en metanol a concentraciones de 3.5 $\mu\text{g/ml}$ y 11 $\mu\text{g/ml}$), uno después del nivel 3 y otro tras el nivel 7, dos blancos control de metanol, uno luego del nivel 5 y otro después del último nivel. Exactamente, 1 ml de muestra y cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% (m/v) fueron mezclados en un tubo de ensayo, se dejó reposar en oscuridad por 10 minutos. Inmediatamente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 438 nm en un espectrofotómetro (SHIMADZU UV-1280), en paralelo se midió la absorbancia de la muestra preparada con metanol en reemplazo de AlCl_3 . La absorbancia empleada para los cálculos fue la diferencia de la muestra con y sin AlCl_3 . El contenido de flavonoides fue expresado en μg de flavonoides totales con base en Quercetina (FTQ) por mg de extracto acuoso liofilizado (EAL).

Cuantificación de polifenoles totales

El método fue estandarizado en el Laboratorio de Química 1 de la Universidad Regional Amazónica Ikiám. Se usaron los métodos descritos en Lartey et al. (2020) con modificaciones detalladas a continuación [39]. Los extractos acuosos liofilizados fueron disueltos en agua destilada, el estándar de Ácido Gálico en agua-metanol 1:1 y se usó agua destilada como blanco control. Se prepararon 6 niveles de Ácido Gálico en un intervalo de trabajo de 25-500 $\mu\text{g/ml}$ (nivel 1 = 25 $\mu\text{g/ml}$, nivel 2 = 50 $\mu\text{g/ml}$, nivel 3 = 100 $\mu\text{g/ml}$, nivel 4 = 200 $\mu\text{g/ml}$, nivel 5 = 400 $\mu\text{g/ml}$ y nivel 6 = 500 $\mu\text{g/ml}$) y un control positivo (Ácido Gálico disuelta en agua-metanol 1:1 a concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$) luego del tercer nivel. Exactamente, 100 μl de la muestra se mezcló con 860 μl de agua destilada, 40 μl del reactivo comercial Folin-Ciocalteu (Supelco®) y se dejó en reposo por 5 minutos. Luego, se añadió 100 μl de agua destilada, 100 μl carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7% (m/v) y se dejó reposar por 60 minutos. Inmediatamente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm. El contenido de polifenoles fue expresado en μg de polifenoles totales con base en Ácido Gálico (PTAG) por mg de extracto acuoso liofilizado (EAL).

Cuantificación de Alcaloides totales

El método fue estandarizado en el Laboratorio de Química 1 de la Universidad Regional Amazónica Ikiám. Se usaron los métodos descritos en Truong et al. (2019) con modificaciones detalladas a continuación [31]. Los extractos acuosos liofilizados y el estándar de Atropina fueron disueltos en agua destilada. Exactamente, 1 ml de la muestra se mezcló con 2,5 ml de tampón fosfato (K_2HPO_4 al 3,5 % m/v a pH 4,7 ajustado con ácido cítrico $C_6H_8O_7$), seguido de 2,5 ml de solución de verde de bromocresol ($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$) al 3,5 % m/v y 5 ml de cloroformo. La mezcla fue homogeneizada mediante vortex por 1 minuto y se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm para la separación de fases. Luego, se eliminó el sobrenadante (fase superior) y se leyó la absorbancia de la fase inferior en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm. El contenido de alcaloides fue expresado en μg de alcaloides totales con base en Atropina (ATA) por mg de extracto acuoso liofilizado (EAL).

Ensayo antimicrobiano

Dilución del EAL y controles positivos

Las muestras y los controles fueron preparados de acuerdo con los métodos detallados en Manandhar et al. (2019) [40]. Los extractos acuosos liofilizados (EAL) fueron disueltos en Dimetilsulfóxido (DMSO) a concentraciones de 20, 40 y 80 mg/ml. Se usaron los métodos descritos en Gavriil et al. (2021) para eliminar posibles insolubles presentes en los extractos disueltos anteriormente [41]. El cual consistió en la homogeneización de la mezcla mediante vortex, ultrasonido y centrifugación por 5 minutos a 10000 rpm. Luego, se recuperó el sobrenadante para su uso posterior en ensayos antimicrobianos. Por otro lado, los fármacos comerciales Ampicilina, Gentamicina y Fluconazol fueron diluidos en agua ultra pura (H_2O tipo I esterilizada mediante autoclave) a 1 mg/ml de concentración. Hasta su posterior uso, los sobrenadantes de los extractos vegetales fueron conservados a $-16\text{ }^{\circ}C$, mientras que, los controles positivos se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}C$.

Activación de cepas microbianas

El método fue estandarizado en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica Ikiám. Se usaron los métodos descritos en Manandhar et al. (2019) con algunas variaciones [40]. El ensayo consistió en el uso de cinco cepas de microorganismos del Tipo Colección Americana de Cultivo (ATCC, por sus siglas en inglés), tres susceptibles a medicamentos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*) y dos resistentes a ampicilina (*Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*). Microorganismos usados por ser de interés para la salud pública, pues, éstos son patógenos humanos considerados de prioridad según la OMS debido al surgimiento de cepas resistentes a antibióticos, por ende, el desarrollo y/o descubrimiento de nuevos antimicrobianos para los mismos se han considerado como una urgencia inmediata [42]. Los materiales y los medios de cultivos detallados en adelante previamente fueron esterilizados mediante autoclave. Se preparó 280 ml de medio de cultivo Mueller Hinton Broth (MHB) de acuerdo con las especificaciones del producto, 20 ml del medio MHB fue dispensado en tubos de vidrio con tapa y en botellas de vidrio de 100 ml. La activación de microorganismos se realizó mediante la inoculación de 100 µl de inóculo crio preservados en tubos con 20 ml de medio MHB, incubación por una noche a 37 °C y 125 rpm en una incubadora con agitación. Luego, 500 µl de microorganismos activados fueron pasados a botellas con 20 ml de medio MHB. Luego, los pases fueron incubadas a las mismas condiciones anteriores durante 2 horas en el caso de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, 2,5 horas en el caso de *S. aureus* y 6 horas en el caso de *C. albicans*. Tiempo necesario para que las cepas bacterianas alcancen un crecimiento exponencial de 10⁸ UFC/ml (unidades formadoras de colonia por mililitros de medio de cultivo) y el hongo un crecimiento exponencial de 10⁶ UFC/ml.

Siembra y antagonismo microbiano

Se preparó 500 ml de medio de cultivo Mueller Hinton Agar (MHA) de acuerdo con las especificaciones del producto. Alrededor de 20 ml de medio MHA derretido fue vertido en cajas Petri para la siembra de microorganismos. Trascorrido el adecuado tiempo de incubación de las bacterias (2 horas en el caso de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*; y, 2,5 horas en el caso de *S. aureus*), el inóculo bacteriano (no aplica para *C. albicans*) se preparó diluyendo 200 µl de microorganismos en crecimiento exponencial 10⁸ UFC/ml en 19,8 ml de medio de cultivo MHB, dilución realizada para

llegar a un crecimiento exponencial de 10^6 UFC/ml. La técnica de siembra usada fue mediante hisopo a partir de 150 μ l de inóculo. El cual consistió en arrastrar el inóculo con un hisopo de manera horizontal sobre toda la superficie del agar (MHB). Luego, las cajas de Petri sembradas fueron dejadas entre abiertas bajo una campana de bioseguridad con flujo encendido por 15 minutos, actividad que permitió acelerar el secado del inóculo líquido colocado sobre el agar.

Previamente las cajas Petri fueron divididas en 4 secciones, dos áreas/secciones para testear concentraciones de 40 y 80 mg/ml del EAL de las cortezas de tallo de las especies de interés (en el caso de la especie *C. guianensis* se usó concentraciones de 20 y 40 mg/ml), una sección para el control positivo y otra para el blanco control DMSO. En cada división se realizaron 3 perforaciones mediante succión con pipeta Pasteur de vidrio, generando pocillos en agar de alrededor de 1.3 mm de diámetro. Posteriormente, en cada perforación se colocó 2 μ l de muestra y controles según corresponda. Luego, las cajas Petri con los extractos y controles fueron dejadas entre abiertas bajo una campana de bioseguridad con flujo encendido por 15 minutos, con el fin de acelerar el secado de los extractos y controles colocados en los pocillos. Finalmente, las cajas Petri fueron tapadas completamente, selladas con Parafilm e incubadas a 37 °C por 18 horas. Los halos de inhibición fueron determinados mediante el software de análisis de imagen ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). El antagonismo microbiano fue expresado en milímetros (mm) de diámetro de los halos de inhibición observables y medibles.

Medición del diámetro de los halos de inhibición

Se usó el software ImageJ 1.53v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Maryland, USA) anteriormente aplicado en la medición de perímetros circulares presentes en imágenes de origen biológico [43]. Para análisis de imagen en ImageJ se tomaron fotos de las cajas Petri con resultados del ensayo antimicrobiano junto con una regla milimétrica usada como escala. La imagen fue cargada (File → New → Open) y calibrada para la medición del perímetro de los halos de inhibición. Para ello, se usó la regla milimétrica presente en la imagen de análisis; se realizaron 10 mediciones con la herramienta Straight desde 0 cm hasta 1 cm sobre la imagen de la regla milimétrica, se presionó la letra M para registrar el resultado de la medición; se obtuvo el promedio y la desviación estándar de las mediciones realizadas, para lo cual, se ubicó el cursor sobre

la tabla de mediciones, clic en Results → Summarize; el promedio de las distancias medidas anteriormente se usó para calibrar la imagen, para ello, se colocó sobre la barra de herramientas principal del programa, clic en Analyze → Set Scale, luego en “Distance in pixels:” se colocó el promedio de las mediciones realizadas anteriormente, en “Known distance:” se colocó 10 (milímetros medidos sobre la imagen de la regla), en “Pixel aspect ratio:” se colocó 1.0 (convierte pixeles a una unidad de medida conocida), en “Unit of length” se colocó milímetros (mm) y clic en OK. El perímetro de los halos de inhibición se midió con la herramienta Oval, se usó la fórmula $\text{Perímetro}/\pi$ para calcular el diámetro de los halos de inhibición. El resultado fue expresado como el promedio de tres repeticiones y su desviación estándar ($\bar{x} \pm \sigma$).

Identificación de moléculas presentes en los extractos de plantas

Extracción en Fase Sólida (SPE)

El tratamiento de muestra y acondicionamiento del equipo se realizó de acuerdo con los métodos descritos en Bajkacz et al. (2018) con modificaciones detalladas a continuación [44]. Exactamente 5 mg de EAL fue disueltos en 10 ml de agua tipo I acidificada con HCl (pH 3,5). Las columnas SPE consistieron en émbolos de jeringas (MedicLife®) de 5 ml con una capa de algodón purificado con hexano en la base y 600 mg de silica gel (Sigma-Aldrich) en la parte superior. Las columnas fueron acondicionadas con 15 ml de metanol seguido de 6 ml de agua acidificada con HCl (pH 3,5). Luego, el extracto fue pasado por la columna a un caudal de 1 ml/min. Seguidamente, se pasó 6 ml de metanol por la columna, fracción que fue recuperada, concentrada hasta la sequedad y reconstituida con agua tipo I. Se prepararon 500 mg/ml de muestras individuales y un pool de muestras para lectura en equipo UPLC-MS/MS.

Preparación de estándares

Se prepararon 50 ml de soluciones madre de Ácido Gálico, Catequina y Quercetina a una concentración de 100000 ng/ml. A partir de las cuales se preparó 10 ml de solución estándar de polifenoles (mezcla de Ácido Gálico, Catequina y Quercetina) a 10000 ng/ml. El estándar de polifenoles se usó para optimizar los parámetros del equipo UPLC-MS/MS (caudal, volumen de inyección, energía de colisión, entre otras), para ello se testearon concentraciones de entre 50 y 500 ng/ml.

Acondicionamiento del UPLC-MS/MS

La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0.1% en agua como disolvente A y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo como disolvente B. El perfil de gradiente fue de 1% B (0 min.), 99% B (1 min.), 20% B (10 min), 25% B (20 min), 35% B (25 min), 50% B (35 min), 20% B (10 min) y B al 1% (41 min.), a un caudal de 0.25 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 µl. La ionización por electro pulverización (ESI) se realizó en modo negativo para análisis de masas. Las condiciones de identificación usadas fueron: voltaje de AT 3,5 kV; capilar 7 µA; 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 unidades; modo de adquisición de datos MS^E con tres energías de colisión 0eV para MS1 y rampa de 20 a 30 eV para MS2.

Tratamiento de datos

Los datos (**Anexo 16**) fueron tratados en el software MSDIAL versión 4.90 (<http://prime.psc.riken.jp/>) para metabolómica no dirigida de datos MS del tipo Fragmentación de Todos los Iones (AIF, por sus siglas en inglés) o MS^E. Algunos de los parámetros usados en el software fueron, altura mínima del pico MS1 de 3000 amplitud, corte de abundancia de MS/MS de 17 amplitud, corte del puntaje de identificación del 80 % y se eliminaron los picos del blanco presentes en las muestras con maximum sample intensity/average blank intensity > 5 [45]. Para la identificación de metabolitos se usó la biblioteca de MSDIAL en la que incluyen diferentes bases de datos (MassBank, ReSpect, RIKEN, entre otras) “ESI(-)-MS/MS from authentic standards” para cromatografía líquida actualización el 16 de julio de 2022 (<http://prime.psc.riken.jp/compms/index.html>).

La identidad de metabolitos sin estándar de referencia fue determinada mediante la coincidencia del ion molecular y los espectros MS/MS con la biblioteca, una identificación de nivel 2 según Sumner et al., (2007) [46]. En cambio, la identificación de nivel 1 se realizó mediante la verificación del tiempo de retención (RT) con el estándar de referencia (Ácido Gálico, Catequina o Quercetina), así como su ion molecular y fragmentos MS/MS. El estándar de polifenoles fue usado para determinar la intensidad de pico mínimo a la que los estándares (Ácido Gálico, Catequina y Quercetina) pueden

ser identificados correctamente en la biblioteca. Los picos cromatográficos identificadas con el software fueron depurados mediante la verificación de que su intensidad sea igual o mayor al estándar de polifenoles, que el metabolito sea el mismo en las tres energías de colisión (0, 20 y 30 eV) y que el porcentaje de puntaje total con la librería sea igual o superior al 80%.

Posteriormente los metabolitos identificados fueron agrupados de acuerdo con la clasificación asignada por las bases de datos MassBank of North America (MoNA, <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>) y PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los flavonoides fueron separados del grupo de polifenoles mediante criterios basados en los trabajos de Creus (2004) y Harborne (1984) [34,47].

Tratamiento estadístico de datos

Los ensayos de cuantificación de metabolitos totales en espectrofotometría, la lectura de muestras en UPLC-MS/MS y la actividad antimicrobiana fueron realizados por triplicado para la presentación de resultados en promedio y desviación estándar ($\bar{x} \pm \sigma$), en el caso de los metabolitos identificados en biblioteca se usó la precisión de medición de masa media absoluto (error de masa). En espectrofotometría los parámetros analíticos de calidad para la validación de método verificados fueron el límite de detección (LD), límite de cuantificación (LQ) y porcentaje de recuperación (%R). Los límites de detección y cuantificación fueron expresados en concentración, como el producto de 3 veces (10 veces para el límite de cuantificación) la desviación estándar de 10 absorbancias del blanco por la pendiente de la curva de calibración. El porcentaje de recuperación se calculó mediante el cociente de la concentración obtenida mediante absorbancia y la concentración real del estándar de referencia preparado por 100, cuyo parámetro óptimo de acuerdo con Cádiz y García (2015) debería de estar entre valores de 85 y 115 % [48].

$$LD = \frac{3\sigma}{m}; LQ = \frac{10\sigma}{m}; \%R = \frac{\text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración real}} * 100$$

Donde, LD, límite de detección, LQ, límite de cuantificación, σ , desviación estándar y m, pendiente de la curva de calibración.

La precisión de medición de masa de los metabolitos identificados fue expresada en ppm y calculado mediante el promedio de valor absoluto del error de masa de una sola lectura [49]. El error de masa de una sola lectura expresada en ppm corresponde a la diferencia de la masa medida y la masa exacta teórica en modo negativo, sobre la misma por 10^6 .

$$\Delta m_i = \frac{m_i - (m_a - 1)}{(m_a - 1)} \times 10^6$$

$$\text{ppm} = \frac{\sum_i |\Delta m_i|}{n}$$

Donde, Δm_i , error de masa de una sola lectura expresada en partes por millón, ppm, precisión de medición de masa media absoluta, m_i , masa experimental en modo negativo, m_a , masa exacta teórica o masa mono isotópica teórica y n , número de mediciones.

CAPÍTULO II: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

Etnofarmacología del cantón Arajuno

Se documentó un total de 13 plantas usadas en preparados medicinales para el tratamiento del COVID-19: Anís de monte e Intiangu (sin identificación botánica), *Aristolochia* sp., *Aspidosperma* sp., *Couroupita guianensis* Aubl., *Cymbopogon citratus* Stapf., *Monteverdia laevis* (Reissek) Biral., *Myroxylon balsamum* Harms., *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm., *Piper* sp., *Protium sagotianum* Marchand., *Sloanea synandra* Spruce ex Benth. y *Tynanthus panurensis* (Bureau) Sandwith. Las plantas Anís de monte e Intiangu no fueron consideradas en análisis posteriores. Las plantas *Cymbopogon citratus* Stapf. y *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. fueron usadas como ingredientes aromatizantes en preparados medicinales (**Anexo 2**), por lo que estas plantas tampoco fueron consideradas en análisis posteriores.

Tabla 1. Factor de Consenso Cultural (ICF) de las plantas usadas en preparados medicinales para el tratamiento del COVID-19.

Especie	Uso*	ICF
<i>C. guianensis</i>	Dolor de cabeza	1,00
<i>Aspidosperma</i> sp. <i>M. laevis</i>	Diarrea	0,80
<i>M. balsamum</i> <i>Piper</i> sp.	Problemas respiratorios ^Ω	0,75
<i>M. balsamum</i> <i>Piper</i> sp.	Fiebre	0,67
<i>Aspidosperma</i> sp. <i>C. guianensis</i> <i>M. balsamum</i> <i>M. laevis</i> <i>P. sagotianum</i>	Dolor del cuerpo	0,60

*Categoría de uso relacionados a los síntomas de COVID-19 reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). ^ΩCategoría de uso que comprende, dolor de garganta, congestión nasal, tos y gripe. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

Además del COVID-19 se registraron otros 20 usos medicinales, de los cuales 8 tuvieron relación con los síntomas reportados por la OMS para COVID-19 [28]. De esta manera se obtuvo un factor de consenso cultural de 1,00 en el uso de *C. guianensis* para el

tratamiento del dolor de cabeza. El otro ICF de interés fue de 0,80, obtenido en el uso de las especies *Aspidosperma* sp. y *M. laevis* para el tratamiento de la diarrea. Los demás ICF relacionados a los síntomas de COVID-19 fueron 0,75, 0,67 y 0,60 para problemas respiratorios, fiebre y dolor del cuerpo, respectivamente. De esta manera, con base en la **Tabla 1** se consideró a las plantas *Aspidosperma* sp., *C. guianensis*, *M. laevis* y *P. sagotianum* ideales para la caracterización química y ensayo antimicrobiano. Además, la etnofarmacología de estas especies seleccionadas reveló que la estructura morfológica de la planta usada en preparados medicinales fue la corteza de tallo y que sus propiedades medicinales pueden ser obtenidas mediante extracción con alcohol o agua (**Anexo 2**).

Resultado de los ensayos químicos cualitativos

El rendimiento de maceración acuosa de corteza de tallo de las plantas *Aspidosperma* sp., *C. guianensis*, *M. laevis* y *P. sagotianum* fueron de $3,399 \pm 0,005$, $1,449 \pm 0,003$,

Tabla 2. Ensayo químico cualitativo de extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de las plantas del cantón Arajuno usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.

Ensayo	<i>Aspidosperma</i> sp.	<i>Protium</i> <i>sagotianum</i>	<i>Monteverdia</i> <i>laevis</i>	<i>Couroupita</i> <i>guianensis</i>
Flavonoides				
NaOH/HCl	-	+	+	++
Shinoda	+	+	++	+++
Polifenoles				
Cloruro férrico	+	+	++	+++
Alcaloides				
Dragendorff	-	-	-	-
Wagner	++	-	-	-
Terpenoides				
Salkowski	+++	-	+++	-

Donde, +++, abundante, ++, moderado, +, escaso y -, ausente. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

$2,739 \pm 0,003$ y $2,992 \pm 0,007$ %, respectivamente. Los ensayos cualitativos realizados para la determinación de metabolitos especializados de interés mostraron que todos los EAL de corteza de tallo de las plantas estudiadas (*Aspidosperma* sp., *C. guianensis*, *M. laevis* y *P. sagotianum*) contienen polifenoles y flavonoides. Las plantas *Aspidosperma* sp. y *M. laevis* además contienen terpenoides. Los alcaloides únicamente estuvieron presentes en la planta *Aspidosperma* sp. (**Tabla 2**).

La decoloración/transparencia de los EAL en NaOH al 4% luego de añadir gotas de HCl concentrado reveló la presencia de flavonoides en las muestras. Resultados que fueron corroborados con el ensayo Shinoda, donde la coloración del alcohol isoamílico en amarillo (*C. guianensis*), carmelita (*P. sagotianum* y *M. laevis*) y naranja (*Aspidosperma* sp.) demostró la presencia de flavonoides en las muestras (**Anexo 4**). El color púrpura (en la planta *Aspidosperma* sp. y *M. laevis*), negro (*C. guianensis*) y verde musgo (*P. sagotianum*) tras añadir gotas de FeCl₃ al 1% (m/v) mostró la presencia de polifenoles en las muestras (**Anexo 5**). La coloración rápida de un marrón rojizo a un precipitado oscuro tras añadir gotas de reactivo Wagner reveló la presencia de alcaloides en el EAL de la corteza de tallo de la planta *Aspidosperma* sp., resultado que fue verificado con el control positivo de Atropina (**Anexo 6**). Una coloración marrón y marrón rojizo en la interfase del ensayo Salkowski mostró la presencia de terpenoides en las muestras de *Aspidosperma* sp. y *M. laevis* respectivamente (**Anexo 7**).

Resultado de los ensayos químicos cuantitativos

La planta con mayor contenido de flavonoides fue *C. guianensis* con $5,5 \pm 0,1$ µg FTQ/mg-EAL, seguida de *M. laevis* con $1,5 \pm 0,1$ µg FTQ/mg-EAL, *P. sagotianum* con

Tabla 3. Contenido de metabolitos totales presentes en extracto acuoso liofilizado de las plantas del cantón Arajuno usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.

Especie	Flavonoides [◊]	Polifenoles*	Alcaloides [□]
<i>Aspidosperma</i> sp.	$0,79 \pm 0,01$	$38,4 \pm 0,6$	$18,54 \pm 0,07$
<i>C. guianensis</i>	$5,5 \pm 0,1$	213 ± 7	-
<i>M. laevis</i>	$1,5 \pm 0,1$	135 ± 4	-
<i>P. sagotianum</i>	$0,82 \pm 0,04$	56 ± 2	-

[◊]Contenido de flavonoides expresados en µg de flavonoides totales con base en Quercetina (FTQ) por mg de extracto acuoso liofilizado (EAL). *Contenido de polifenoles expresado en µg de polifenoles totales con base en Ácido Gálico (PTAG) por mg de extracto acuoso liofilizado (EAL). [□]Contenido de alcaloides expresado en µg de alcaloides totales con base en Atropina (ATA) por mg de extracto acuoso liofilizado (EAL). En todos los casos el resultado fue expresado como el promedio de tres repeticiones y desviación estándar ($\bar{x} \pm \sigma$). **Realizado por:** Pastuña, 2022.

$0,82 \pm 0,04$ µg FTQ/mg-EAL y *Aspidosperma* sp. con $0,79 \pm 0,01$ µg FTQ/mg-EAL (**Tabla 3**). Resultado obtenido mediante una curva de calibración de Quercetina con ecuación de la recta $Y = 0,0497X - 0,0415$ y $R^2 = 0,9951$ (**Anexo 8**). El límite de detección fue de

0,028 µg/ml, el límite de cuantificación de 0,092 µg/ml y los porcentajes de recuperación de los controles positivos fueron de 103,2 % y 102,4% (**Tabla 4**).

La planta con mayor contenido de polifenoles fue *C. guianensis* con 213 ± 7 µg PTAG/mg-EAL, seguida de *M. laevis* con 135 ± 4 µg PTAG/mg-EAL, *P. sagotianum* con 56 ± 2 µg PTAG/mg-EAL y *Aspidosperma* sp. con $38,4 \pm 0,6$ µg PTAG/mg-EAL (**Tabla 3**). Resultado obtenido mediante una curva de calibración de Ácido Gálico con ecuación de la recta $Y = 0,0045X - 0,0458$ y $R^2 = 0,9952$ (**Anexo 9**). El límite de detección fue de 0,255 µg/ml, el límite de cuantificación de 0,851 µg/ml y el porcentaje de recuperación del control positivo fue de 97,2 % (**Tabla 4**).

Tabla 4. Parámetros analíticos de calidad para la validación del método verificados en la cuantificación de metabolitos de interés mediante espectrofotometría.

Parámetros	Flavonoides	Polifenoles	Alcaloides
LD (µg/ml)	0,028	0,255	0,01
LQ (µg/ml)	0,092	0,851	0,05
%R (%)	103,2 102,4	97,2	-

Donde, LD, límite de detección, LQ, límite de cuantificación y %R porcentaje de recuperación. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

El contenido de alcaloides presentes en la planta *Aspidosperma* sp. fue de $18,54 \pm 0,07$ µg ATA/mg-EAL (**Tabla 3**). Resultado obtenido mediante una curva de calibración de Atropina con ecuación de la recta $Y = 0,0248X - 0,1096$ y $R^2 = 0,996$ (**Anexo 10**). El límite de detección fue de 0,01 µg/ml y el límite de cuantificación de 0,05 µg/ml (**Tabla 4**).

Resultado del ensayo antimicrobiano

El extracto acuoso liofilizado de la corteza de tallo de la planta *C. guianensis* a concentración de 40 mg/ml presentó halos de inhibición en todos los microorganismos testeados (**Tabla 5**). Esta planta tuvo mayor antagonismo microbiano con la cepa bacteriana grampositiva *S. aureus* con diámetro de halo de inhibición de $9,0 \pm 0,5$ mm, seguido de la bacteria gramnegativa resistente a ampicilina *k. pneumoniae* con un diámetro de halo de inhibición de $8,8 \pm 0,7$ mm, el hongo *C. albicans* con diámetro de halo de inhibición de $8,2 \pm 0,8$ mm, la bacteria gramnegativa resistente a ampicilina *P.*

aeruginosa con diámetro de halo de inhibición de $4,9 \pm 0,3$ mm y la bacteria gramnegativa *E. coli* con un diámetro de halo de inhibición de $4,1 \pm 0,6$ mm. También se pudo observar halos de inhibición en concentración de 20 mg/ml del EAL de corteza de tallo de la planta (**Anexo 11**).

El extracto acuoso liofilizado de la corteza de tallo de la planta *M. laevis* a concentración de 80 mg/ml presentó halos de inhibición en los microorganismos susceptibles a medicamentos (*E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*) más no en aquellos resistentes a Ampicilina (*k. pneumoniae* y *P. aeruginosa*) (**Tabla 5**). Se observó mayor actividad en la bacteria grampositiva *S. aureus* con diámetro de halo de inhibición de $6,1 \pm 0,7$ mm, seguido de la bacteria gramnegativa *E. coli* con diámetro de halo de inhibición de $4,9 \pm 0,5$ mm y el hongo *C. albicans* con diámetro de halo de inhibición de $4,4 \pm 0,9$ mm. También se observó halos de inhibición en los microorganismos antes mencionados a concentración de 40 mg/ml del EAL de corteza de tallo de la planta (**Anexo 12**).

Tabla 5. Antagonismo microbiano de extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de las plantas del cantón Arajuno usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.

Antagonista	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	------(mm de inhibición)*-----				
<i>Aspidosperma</i> sp.	0	0	0	0	0
<i>C. guianensis</i>	$4,1 \pm 0,6$	$9,0 \pm 0,5$	$8,2 \pm 0,8$	$8,8 \pm 0,7$	$4,9 \pm 0,3$
<i>M. laevis</i>	$4,9 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,7$	$4,4 \pm 0,9$	0	0
<i>P. sagotianum</i>	0	0	$1,4 \pm 0,5$	0	0
Ampicilina	21 ± 1	15 ± 2	-	-	-
Fluconazol	-	-	17 ± 3	-	-
Gentamicina	-	-	-	15 ± 1	19 ± 3
DMSO	0	0	0	0	0

*Diámetro en milímetro (mm) del halo de inhibición expresado como el promedio de tres repeticiones y desviación estándar ($\bar{x} \pm \sigma$). -, muestra o antibiótico no testeado. El extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de la planta *C. guianensis* fue disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) a concentración de 40 mg/ml y las otras plantas (*Aspidosperma* sp., *P. sagotianum* y *M. laevis*) a 80 mg/ml. Los fármacos Ampicilina, Fluconazol y Gentamicina fueron disueltas en agua ultrapura a 1 mg/ml de concentración. Se usó DMSO al ~100 % como blanco control. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

La especie con menos antagonismo microbiano fue *P. sagotianum* pues solo presentó actividad antifúngica, esta planta presentó diámetro de halo de inhibición inferior en

relación a las demás plantas testeadas. Se observó actividad en el hongo *C. albicans* con diámetro de halo de inhibición de $1,4 \pm 0,5$ mm a 80 mg/ml de concentración de EAL de corteza de tallo de *P. sagotianum* (**Tabla 5**). También se observaron pequeños halos de inhibición a concentración de 40 mg/ml del EAL de corteza de tallo de esta planta (**Anexo 13**). Por otro lado, el extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de la planta *Aspidosperma* sp. no presentó antagonismo microbiano con ninguna de las cepas microbianas testeadas a concentraciones de 40 y 80 mg/ml (**Tabla 5** y **Anexo 14**).

La planta con mayor antagonismo microbiano fue *C. guianensis*, por mostrar halos de inhibición en todas las cepas microbianas testeadas y por presentar mayores diámetros de halos de inhibición en relación con las demás plantas (**Tabla 5**). En la **Tabla 5** se puede observar que para la bacteria *E. coli*, la planta *M. laevis* presentó mayor diámetro de halo de inhibición que *C. guianensis*, sin embargo, la concentración de extracto de *C. guianensis* usada (40 mg/ml) fue inferior a la concentración del extracto de *M. laevis* (80 mg/ml). La segunda planta con mayor antagonismo microbiano fue *M. laevis*, seguida de la planta *P. sagotianum*, por otro lado, la planta *Aspidosperma* sp no presentó antagonismo microbiano.

Moléculas identificadas en los extractos de plantas

Se encontraron 58 metabolitos en total con nivel 2 de identificación y un metabolito con nivel 1 de identificación en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de las plantas de Arajuno usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19 (**Tabla 7** y **Anexo 17**). La planta con mayor número de metabolitos conocidos fue *Aspidosperma* sp., presentando 27 moléculas con nivel 2 de identificación. Después de la planta *C. guianensis* con 23 metabolitos de nivel 2 más un metabolito de nivel 1 de identificación, el cual fue corroborado con el tiempo de retención (RT) del estándar de Ácido Gálico. Las otras dos plantas *M. laevis* y *P. sagotianum* presentaron 11 y 7 metabolitos conocidos respectivamente.

Los metabolitos de referencia presentes en el estándar de polifenoles (mezcla de Ácido Gálico, Catequina y Quercetina) a concentraciones de 50, 250 y 500 ng/ml fueron identificados correctamente en la biblioteca mediante MSDIAL (**Tabla 6**). La intensidad de pico del estándar de polifenoles a 50 ng/ml fue usado como base para que un pico

cromatográfico en la muestra pueda ser considerado como metabolito. De esta manera se consideró como metabolito aquellos picos cromatográficos igual o mayor a 258780

Tabla 6. Estándar de polifenoles verificados en la biblioteca mediante el software MSDIAL.

Estándar	RT	Puntaje	Precursor	Fragmentos	ppm
Ácido Gálico	1,973	91	169,0185	169,0132	18
				125,0236	
				81,0337	
Catequina	5,858	88	289,0789	289,066	3
				245,083	
				205,047	
				125,022	
Quercetina	14,015	93	301,0428	301,0343	6
				229,0470	
				178,9975	

Donde, RT, tiempo de retención en minutos y ppm, precisión de medición de masa media expresado en partes por millón. Todos los valores corresponden al promedio de 6 lecturas de estándar de polifenoles, las concentraciones de 50, 250 y 500 ng/ml leídos al inicio y al final de la corrida cromatográfica. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

unidades de intensidad. Esto permitió filtrar los 1777 metabolitos identificados inicialmente en las muestras a 424 moléculas candidatas. Posteriormente, la verificación de que el metabolito identificado sea el mismo en las tres energías de colisión y que el puntaje total con la biblioteca sea igual o superior al 80 % permitió determinar los metabolitos presentes en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Metabolitos con nivel 2 de identificación presentes en extracto acuoso liofilizado de plantas del cantón Arajuno usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.

ID	Muestra	Metabolito	MS1	MS2	ppm
1	<i>P. sagotianum</i>	(1R,6R,10S,11R,13S,15R)-1,6-dihydroxy-8-(hydroxymethyl)-4,12,12,15-tetramethyl-5-oxotetracyclo[8.5.0.0.0 ² ,6.0 ¹¹ ,13]pentadec a-3,8-dien-13-yl hexadecanoate	585,2488	540,54 255,24	298
2	<i>Aspidosperma</i> sp.	(1S,4aS,5R,7S)-1-(beta-D-Glucopyranosyloxy)-4a,5-dihydroxy-7-methyl-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[c]pyran-7-yl (2Z)-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate	555,1763	509,1685 329,1021 163,0398	9

3	<i>C. guianensis</i>	(3-Pentadecylphenoxy)acetic acid	361,2824	361,2733 303,2688	5
4	<i>Aspidosperma</i> sp.	(3S,6R,6aS,7S)-6,6a,7,8-tetrahydroxy-3-methyl-3,4,5,6,7,12a-hexahydro-2H-benzo[a]anthracene-1,12-dione	343,0211	246,78	306
5	<i>Aspidosperma</i> sp.	(Z)-5-[(1S,2R,4aR,8aR)-5-(hydroxymethyl)-1,2,4a-trimethyl-2,3,4,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]-3-(hydroxymethyl)pent-2-enoic acid	381,2242	335,228 255,2144 187,1515	12
6	<i>M. laevis</i>	[(1R,6R,10S,11R,13S,15R)-1,6-dihydroxy-8-(hydroxymethyl)-4,12,12,15-tetramethyl-5-oxo-13-tetracyclo[8.5.0.0.2,6.0]pentadeca-3,8-dienyl] hexadecanoate	585,2511	540,54 255,24	237
7	<i>M. laevis</i>	[(2R,3R,4S,5R,6R)-6-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]-3,5-dihydroxy-4-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]methyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoate	637,2321	912,8275 637,2169 461,1624 175,0378	141
8	<i>Aspidosperma</i> sp.	[(4E,10E)-13,20-dihydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3-oxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,10,18(22),19-pentaen-9-yl] carbamate	563,2853	474,2874 262,1064 190,086	23
9	<i>C. guianensis</i>	[3,4,5-trihydroxy-6-[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl] 2,6,6-trimethylcyclohexene-1-carboxylate	537,2285	491,2138 323,1001 167,1073	20
9	<i>P. sagotianum</i>	[3,4,5-trihydroxy-6-[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl] 2,6,6-trimethylcyclohexene-1-carboxylate	537,2269	491,2138 323,1001 167,1073	16
10	<i>Aspidosperma</i> sp.	1,2Alpha-Epoxydeacetoxidydrogedunin	455,1921	445,2075 387,2177 311,1684 61,987	50
11	<i>Aspidosperma</i> sp.	10-Hydroxydecanoic acid	187,1397	187,1341 169,1254 141,1291	8

12	<i>Aspidosperma</i> sp.	12H-3,5a-Epoxy-5H-furo[3,4- i]oxepino[4,3-a]xanthen-12-one, 1,2,3,6,7,7a,10,14,14a,14b- decahydro-6-hydroxy-5- (hydroxymethyl)-3,13-dimethoxy- 5,7a,9,14b-tetramethyl-	535,2119	489,2143 409,169 311,1289 191,0405	13
12	<i>C. guianensis</i>	12H-3,5a-Epoxy-5H-furo[3,4- i]oxepino[4,3-a]xanthen-12-one, 1,2,3,6,7,7a,10,14,14a,14b- decahydro-6-hydroxy-5- (hydroxymethyl)-3,13-dimethoxy- 5,7a,9,14b-tetramethyl-	535,2115	489,2143 409,169 311,1289 191,0405	14
13	<i>M. laevis</i>	2,3,14-trihydroxy-10,13-dimethyl-17- (2,3,6,7-tetrahydroxy-5,6- dimethylheptan-2-yl)- 2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahydro- 1H-cyclopenta[a]phenanthren-6-one	555,3170	509,3114 319,1873 189,1136 74,6622	6
14	<i>C. guianensis</i>	2,4-Dimethylbenzenesulfonic acid	185,0298	185,0277	28
15	<i>M. laevis</i>	2,5-Dimethylresorcinol	137,0654	510,8152 281,3335 137,0408	20
16	<i>C. guianensis</i>	2-[(5S,8R,11S,12S,13S,21R)- 13,17,18-trihydroxy-2,10,14-trioxo- 5,21-bis(3,4,5-trihydroxybenzoyloxy)- 7-[(3,4,5- trihydroxybenzoyloxy)methyl]-3,6,9,15- tetraoxatetracyclo[10.7.1.1.,0(1),(2)]he- nicosan-1(20),16,18-trien-11-yl]acetic acid	955,0947	465,0675 275,0199 169,0133	19
17	<i>C. guianensis</i>	2-[(6,7-dimethoxy-3,4- dihydroisoquinolin-1-yl)methyl]-3-ethyl- 9,10-dimethoxy-2,3,4,6,7,11b- hexahydro-1H-benzo[a]quinolizine	477,2688	464,2312 314,0432 174,0551 94,9795	30
18	<i>Aspidosperma</i> sp.	2-[5,7-dihydroxy-3-oxo-6-[(2E,6E)- 3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trienyl]- 1H-isoindol-2-yl]pentanedioic acid	498,2424	454,2623 274,0782 162,0159	29
19	<i>M. laevis</i>	2-Naphthalenesulfonic acid	207,0164	207,0122 143,0502 79,9575	15
20	<i>C. guianensis</i>	3-(3,3,3- Trifluoropropylsulfanyl)propanoic acid	201,0258	201,02 105,002	9

21	<i>C. guianensis</i>	3-(5-phenylthiophen-2-yl)prop-2-ynyl Acetate	255,1527	141,9	380
22	<i>Aspidosperma</i> sp.	3,5-dihydroxydecanoic acid	255,1527	203,1283 99,0803 85,0282 59,0125	10
22	<i>M. laevis</i>	3,5-dihydroxydecanoic acid	203,1342	203,1283 99,0803 85,0282 59,0125	10
23	<i>C. guianensis</i>	3-Rha(1-2)Gal(1-2)GluA-Soyasaponenol B	941,5017	941,5124 615,381 113,0245	18
24	<i>C. guianensis</i>	4-Methylumbelliferone	175,0296	175,0395 133,0312	101
25	<i>C. guianensis</i>	6-Hydroxyflavanone	239,0668	239,0705 195,0821 135,0064 107,0123	50
26	<i>C. guianensis</i>	6-Phospho-D-gluconic acid	275,0267	275,0179 177,0397 96,9683	8
27	<i>Aspidosperma</i> sp.	9-hydroxy-2,6,12-trimethyl-12-[2-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyethyl]-15-oxatetracyclo[8.4.1.01,10.02,7]pentadecane-6-carboxylic acid	513,2675	513,2701 452,2453 351,2178 101,026	20
28	<i>Aspidosperma</i> sp.	9-hydroxy-5b,8,11a-trimethyl-1-prop-1-en-2-yl-1,2,3,4,5,6,7,7a,9,10,11,11b,12,13,13a,13b-hexadecahydrocyclopenta[a]chrysene-3a,5a,8-tricarboxylic acid	515,3153	515,3013	13
29	<i>Aspidosperma</i> sp.	Aloesin	393,1200	393,1184 273,0769	16
30	<i>Aspidosperma</i> sp.	Arctigenin	371,1451	371,1485 235,0965 136,0521 83,0123	33
30	<i>C. guianensis</i>	Arctigenin	371,1451	371,1485 235,0965	33

				136,0521	
				83,0123	
30	<i>M. laevis</i>	Arctigenin	371,1451	371,1485	33
				235,0965	
				136,0521	
				83,0123	
30	<i>P. sagotianum</i>	Arctigenin	371,1451	371,1485	33
				235,0965	
				136,0521	
				83,0123	
31	<i>Aspidosperma</i> sp.	Curvularin	291,1581	263,04	93
				203,04	
				145,92	
				122,9	
32	<i>M. laevis</i>	Derrustone	325,0653	325,1841	42
				183,0113	
				91,0208	
33	<i>Aspidosperma</i> sp.	Epanorin	434,1487	434,1596	45
				263,0696	
				191,0856	
				117,0341	
34	<i>P. sagotianum</i>	Eriodictyol	575,1235	575,119	173
				460,9779	6
				287,0551	
				151,0033	
35	<i>Aspidosperma</i> sp.	Eudesmin	385,1603	343,0092	33
				300,9984	
				169,0131	
				125,0231	
				61,9869	
36	<i>C. guianensis</i>	Fludioxonil	247,0312	247,0322	35
				180,0326	
				126,0346	
37	<i>C. guianensis</i>	Fluorotelomeric sulfonic acid	192,9857	192,979	2
				168,989	
				118,993	
				79,957	
38	<i>Aspidosperma</i> sp.	Fumiquinazoline C	488,1476	470,1433	23
				424,3034	
				240,0788	
				145,0442	

39	<i>C. guianensis</i>	Ginkgolide C	439,1189	439,122 383,1315 321,1299 125,0231	30
40	<i>Aspidosperma</i> sp.	Harmalol	199,1008	199,0892 158,0604 54,7674	29
41	<i>Aspidosperma</i> sp.	Harman	181,0831	181,0772 165,0459 140,05	7
42	<i>Aspidosperma</i> sp.	Hydramethylnon	493,1833	493,1858 347,1478 296,1387 237,0657 145,0258	15
42	<i>C. guianensis</i>	Hydramethylnon	493,1833	493,1858 347,1478 296,1387 237,0657 145,0258	15
43	<i>Aspidosperma</i> sp.	Kynurenine	207,099	145,95	69
44	<i>M. laevis</i>	Medicagenic acid	501,3354	501,32 437,3043	12
45	<i>Aspidosperma</i> sp.	Methyl 2-(9-hydroxy-1-methyl-5,10-dioxo-3,4-dihydro-1H-benzo[g]isochromen-3-yl)acetate	315,0958	315,0876 242,0582 2016,042 2	4
46	<i>Aspidosperma</i> sp.	Methyl 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[[4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]methyl]-4-methoxy-5-oxofuran-2-carboxylate	453,224	409,18 379,14 246,98	135
47	<i>Aspidosperma</i> sp.	Mussaendoside S	809,3249	713,34	142
47	<i>C. guianensis</i>	Mussaendoside S	809,3249	713,34	142
47	<i>M. laevis</i>	Mussaendoside S	809,3249	713,34	142
47	<i>P. sagotianum</i>	Mussaendoside S	809,3229	713,34	145
48	<i>M. laevis</i>	N-2-Fluorenylacetamide	222,0823	222,0882 180,0659 138,0549	78

				111,044	
				83,0236	
49	<i>C. guianensis</i>	Perfluorodecane sulfonamido acetic acid	655,9373	655,945 64,97	23
50	<i>C. guianensis</i>	PFCA-H	479,0508	479,07 191,011	55
51	<i>C. guianensis</i>	PFSM-ammonio	492,0653	492,058 64,97	5
52	<i>Aspidosperma</i> sp.	Robustic acid	379,1043	335,1289	57
53	<i>Aspidosperma</i> sp.	Selaginpulvilin M	523,1959	523,1914 400,1086 196,0519	5
54	<i>Aspidosperma</i> sp.	Silybin	481,2416	443,15 353,2 273,01 239,04 178,89	250
55	<i>C. guianensis</i>	Tegaserod	300,1753	300,192 156,0306	50
56	<i>C. guianensis</i>	Teucroside	377,1705	284,98 249,14	7
57	<i>P. sagotianum</i>	Trehalose-6-Phosphate	421,0573	421,0761 241,0118 138,979 78,9578	60
58	<i>P. sagotianum</i>	Xanthosine-5'-monophosphate	363,0479	363,0342 211,0015 151,026 78,9602	16

Donde, MS1 Masa del ion molecular en modo negativo expresado como el promedio de lecturas realizadas, MS2, principales fragmentos de coincidencia con la biblioteca, ppm, precisión de medición de masa media absoluta (error de masa) expresado en partes por millón. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

Se identificaron varias moléculas de polifenoles, alcaloides, flavonoides y terpenoides en EAL de corteza de tallo de las plantas de Arajuno (**Figura 1**). Se encontraron 9 moléculas de polifenoles presentes en las plantas *Aspidosperma* sp. (**29, 30, 45, 46 y 53**), *C. guianensis* (**16, 30 y 24**) y *M. laevis* (**7, 30 y 15**); 4 moléculas de alcaloides presentes en las plantas *Aspidosperma* sp. (**38, 40 y 41**) y *C. guianensis* (**17**); 6 moléculas de flavonoides presentes en las plantas *Aspidosperma* sp. (**52, y 54**), *C.*

guianensis (25, y 39), *M. laevis* (32) y *P. sagotianum* (34); 10 moléculas de terpenoides presentes en las plantas *Aspidosperma* sp. (2, 5, 10, 28 y 47), *C. guianensis* (23, 47 y 56), *M. laevis* (6, 44 y 47) y *P. sagotianum* (1 y 47). Las plantas también presentaron otros grupos de metabolitos tales como amidas aromáticas, benzenoides, carbohidratos, compuestos carbonilo, derivados de aminoácidos, indoles, lípidos, macrolactamas, macrólidos, nucleótidos, sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas (PFAS, por sus siglas en inglés), tetralinas, tiofenos y xantenos (**Anexo 15**).

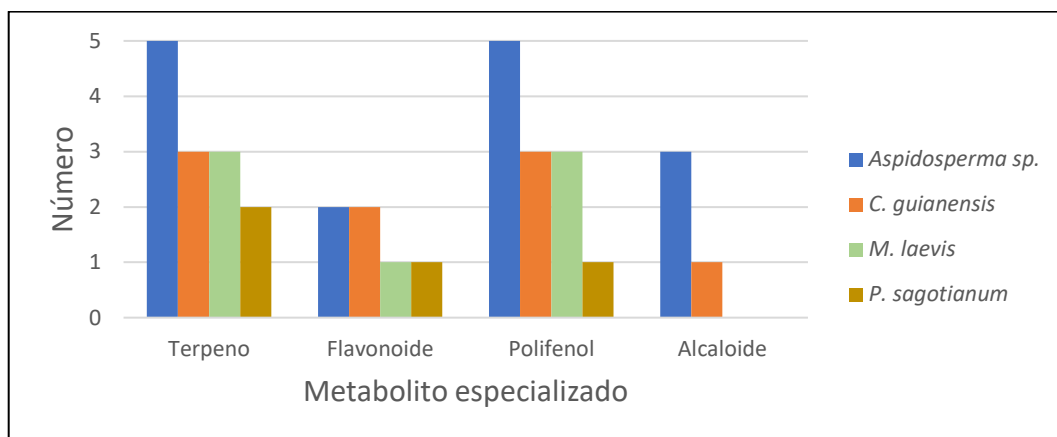


Figura 1. Número de metabolitos de interés identificados en extracto acuoso liofilizado de plantas usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.

Realizado por: Pastuña, 2022.

Se pudo observar la coincidencia de algunas moléculas en varias especies de plantas (**Figura 2**). Es así que, las moléculas de Arctigenin (30) y Mussaendoside S (47) estuvieron presentes en las tres especies de plantas estudiadas. Un metabolito de tipo xanteno (12) y otro del tipo benzenoide (42) fueron las moléculas que tuvieron en común las especies *Aspidosperma* sp. y *C. guianensis*. Las especies *Aspidosperma* sp. y *M. laevis* estuvieron relacionados por el compuesto 3,5-dihydroxydecanoic acid (22) y las especies *C. guianensis* y *P. sagotianum* por un carbohidrato (9).

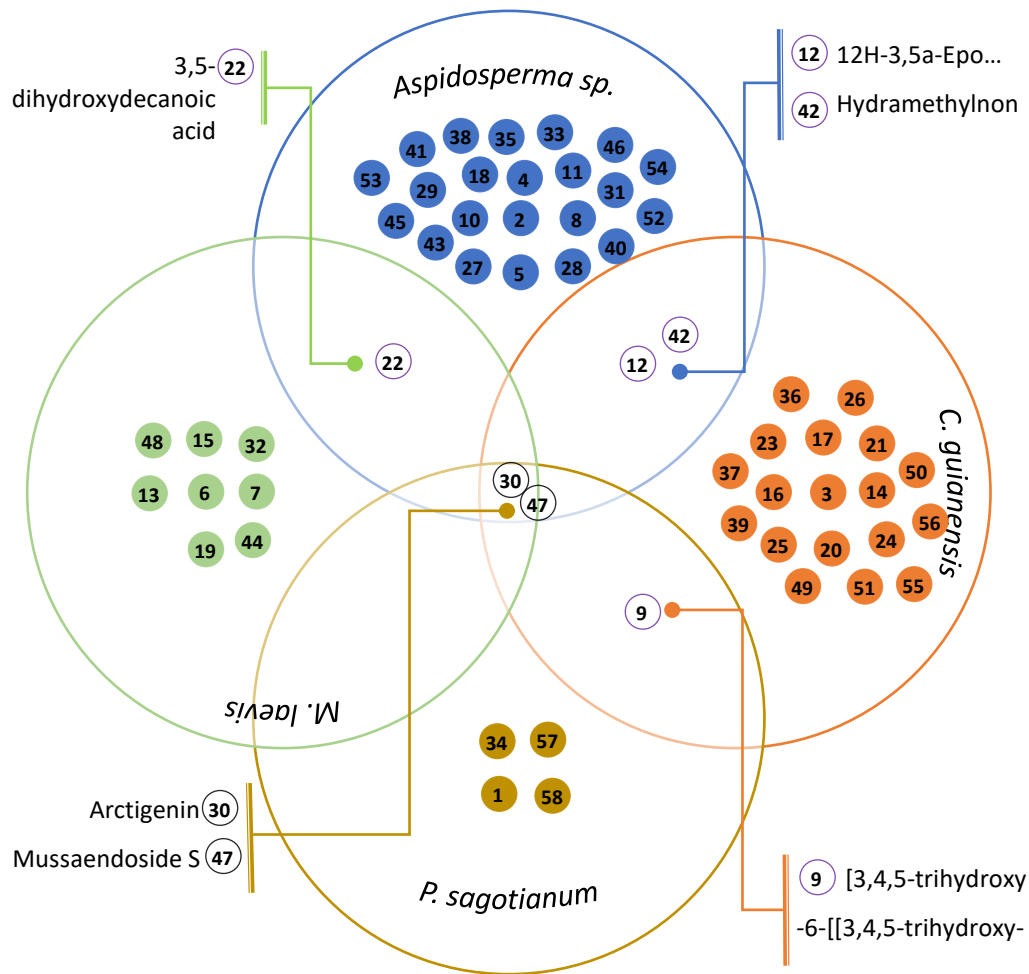


Figura 2. Metabolitos relacionados en las plantas del cantón Arajuno usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.

Realizado por: Pastuña, 2022.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

Se encontró que las plantas *Aspidosperma* sp., *C. guianensis*, *M. laevis* y *P. sagotianum*, usadas en las comunidades del cantón Arajuno para el tratamiento del COVID-19, contienen grupos de metabolitos reportados en la literatura como antagonistas del SARS-CoV-2. El estudio exploratorio de metabolitos de interés mostró que las plantas del cantón Arajuno contienen polifenoles, alcaloides, flavonoides y terpenoides (**Tabla 2**). Luego, mediante la técnica de espectrofotometría se pudo medir la cantidad de estos metabolitos presentes en cada planta (**Tabla 3**). Posteriormente se identificaron 58 metabolitos incluidos 9 moléculas de polifenoles, 4 alcaloides, 6 flavonoides y 10 terpenoides (**Tabla 7**). Por otra parte, se pudo demostrar que las plantas *C. guianensis*, *M. laevis* y *P. sagotianum* tienen actividad antimicrobiana.

***Aspidosperma* sp.**

El género *Aspidosperma* (familia Apocynaceae), al que pertenece la planta estudiada, posee alrededor de 52 especies distribuidas entre Argentina y México [50]. En las comunidades del cantón Arajuno, a más del COVID-19, esta planta tradicionalmente se ha usado en el tratamiento de la diarrea, diabetes, gastritis, paludismo y dolor del cuerpo (**Tabla 1** y **Anexo 2**). Una revisión bibliográfica realizada por Paula et al. (2014) encontró que 24 especies del género *Aspidosperma* son tradicionalmente usados en el tratamiento del paludismo y/o fiebre [50]. También se ha reportado el uso tradicional de algunas especies del género *Aspidosperma* en el tratamiento de la diabetes, gastritis y dolor del cuerpo [51]. Sin embargo, no se encontró una descripción explícita del uso tradicional de esta planta en el tratamiento de la diarrea, pero podría estar incluida dentro la categoría “enfermedades asociadas al tracto digestivo” descrita por Almeida et al. (2019).

Los ensayos químicos cualitativos demostraron la variedad de metabolitos presentes en la planta *Aspidosperma* sp., siendo de esta manera la única planta en presentar todos los metabolitos de interés; polifenoles, alcaloides, flavonoides y terpenoides (**Tabla 2**). La ausencia de información disponible sobre la fitoquímica cualitativa de extracto acuoso de corteza de tallo de especies del género *Aspidosperma* limitó el contraste de resultados, ya que la obtención de metabolitos puede variar de acuerdo con el solvente

extractor usado [52]. Aun así, se corroboró la presencia de algunos metabolitos presentes en extracto etanólico y metanólico de corteza de tallo de dos especies del género *Aspidosperma*. El extracto etanólico de la especie *Aspidosperma subincanum* Mart. mostró la presencia cualitativa de alcaloides, terpenoides entre otros y los ensayos realizados para polifenoles (ensayo de FeCl_3) y flavonoides (ensayo Shinoda) resultaron negativos [53]. Por otro lado, el extracto metanólico de la planta *Aspidosperma pyrifolium* Mart. presentó alcaloides, flavonoides, terpenoides, polifenoles (reportado por los ensayos positivos en cumarinas, derivados cinámicos, flavonoides, proantocianidinas y taninos gálicos) entre otros [54].

Conociendo la presencia cualitativa de los metabolitos de interés se procedió con la cuantificación de estos mediante espectrofotometría obteniendo $0,79 \pm 0,01 \mu\text{g FTQ/mg-EAL}$ de flavonoide, $38,4 \pm 0,6 \mu\text{g PTAG/mg-EAL}$ de polifenoles y $18,54 \pm 0,07 \mu\text{g ATA/mg-EAL}$ de alcaloides (**Tabla 3**). Los cuales fueron valores inferiores a los encontrados en el trabajo de Messiadés (2014) donde para extracto etanólico de corteza de tallo de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. mediante maceración se reportó $3,27 \pm 0,03 \mu\text{g FTQ/mg-Extracto}$ de flavonoides y $106 \pm 1 \mu\text{g PTAG/mg-Extracto}$ de polifenoles [55]. Por otro lado, Salazar-Díaz et al. (2021) para extracto etanólico de corteza de tallo de *Aspidosperma excelsum* Benth. mediante maceración reportó $1,79 \pm 0,06 \mu\text{g FTQ/mg-Extracto}$ de flavonoides y $16 \pm 2 \mu\text{g PTAG/mg-Extracto}$ de polifenoles [56]. Estos datos muestran que el contenido de flavonoides y polifenoles pueden variar en diferentes especies del género *Aspidosperma*. Además, el solvente extractor empleado podría explicar la diferencia de resultados, pues teóricamente la relativa polaridad de los compuestos fenólicos hace que se disuelvan mejor en soluciones acuosas de etanol [52]. En cuanto a los alcaloides, de manera general, las especies del género *Aspidosperma* pueden contener alrededor del 6 % (m/m) de alcaloides totales [57]. Un valor elevado en relación al encontrado de $1,85 \pm 0,01 \%$ (m/m), el cual se podría explicar debido a que generalmente los alcaloides se extraen con solventes orgánicos [52].

En la planta *Aspidosperma* sp. se encontraron 27 moléculas con nivel 2 de identificación (**Tabla 7**) de las cuales 5 fueron polifenoles (**29, 30, 45, 46 y 53**), 3 alcaloides (**38, 40 y 41**), 2 flavonoides (**52, y 54**) y 5 terpenoide (**2, 5, 10, 28 y 47**) (**Figura 1**). El género *Aspidosperma* ha sido ampliamente estudiado y sus especies se han caracterizado por presentar moléculas de alcaloides del tipo indol [58]. Es así que el alcaloide Harman

(41) ya ha sido reportado en las especies *Aspidosperma exalatum*, *Aspidosperma pruinosum* y *Aspidosperma polyneuron*. Este compuesto también se ha encontrado en la planta *Ophiopogon* sp. (Asparagaceae), en corteza de las especies *Strychnos johnsonii* (Loganiaceae), *Sickingia rubra* (Rubiaceae), *Symplocus racemosa* (Symplocaceae), *Passiflora incarnata* (Passifloraceae), *Peganum harmala* (Nitrariaceae), *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae) y *Tribulus terrestris* (Zygophyllaceae) [59]. El segundo alcaloide de *Aspidosperma* sp. Harmalol (40) ha sido encontrado en las plantas *Passiflora incarnata* (Passifloraceae), *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) y *Peganum harmala* (Nitrariaceae) [60,61]. El tercer alcaloide Fumiquinazoline C (38) no ha sido reportado en plantas, pero sí en su simbionte fúngico del género *Aspergillus*, en corteza de *Erythrophleum fordii* (Fabaceae), en la raíz de *Astragalus membranaceus* (Fabaceae) y probablemente en corteza de tallo de *Aspidosperma* sp. [62]. Esto muestra que los alcaloides encontrados en *Aspidosperma* sp. se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes familias de plantas.

Aunque se han reportado algunos flavonoides en dos especies del género *Aspidosperma* (isorhamnetin en *Aspidosperma tomentosum*; kaempferol y aromadendrin en *Aspidosperma cylindrocarpon*) ninguno coincidió con los encontrados en este estudio en *Aspidosperma* sp. [63,64]. Sin embargo, algunos de los flavonoides encontrados fueron reportados en otras especies de plantas, tal es el caso del flavonoide Robustic acid (52) se encontró principalmente en las especies *Deguelia hatschbachii*, *Erythrina variegata* y *Millettia thonningii* de la familia Fabaceae [65,66]. Y, finalmente, el flavonoide silybin (54) fue encontrado en la especie *Silybum marianum* de la familia Asteraceae [67]. Esto muestra que las moléculas de flavonoides encontrados en *Aspidosperma* sp. (Apocynaceae) pueden estar presentes en diferentes familias de plantas.

La ausencia de información disponible en la web para la especie *Aspidosperma* sp. sobre reportes de moléculas de polifenoles no flavonoides impidió el contraste de información. Sin embargo, algunos de los polifenoles encontrados en *Aspidosperma* sp. también estuvieron presentes en otras plantas. El polifenol Arctigenin (30) se ha encontrado en las plantas *Centaurea cineraria* (Asteraceae), *Forsythia suspensa* (Oleaceae), *Bardanae fructus* (Asteraceae), *Arctium lappa* (Asteraceae), *Saussurea medusa* (Asteraceae), *Torreya nucifera* (Cephalotaxaceae) e *Ipomea cairica*

(Convolvulaceae) [68,69]. El polifenol aloesin (**29**) se ha encontrado en especies de la familia Asphodelaceae, *Aloe africana* y *Aloe castanea* [70]. El polifenol Selaginpulvilin M (**53**) fue reportado en la especie *Selaginella Tamariscina* (Selaginellaceae) [71]. En *Aspidosperma* sp. también se encontró los polifenoles methyl 2-(9-hydroxy-1-methyl-5,10-dioxo-3,4-dihydro-1H-benzo[g]isochromen -3-yl)acetate (**45**) y methyl 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[[4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl) phenyl]methyl]-4-methoxy-5-oxofuran-2-carboxylate (**46**) sin información disponible encontrada. Esto muestra que algunos de los polifenoles encontrados en *Aspidosperma* sp. (Apocynaceae) pueden estar presentes en diferentes familias de plantas, mientras otros están siendo reportados por primera vez en este estudio.

Algunos terpenoides han sido reportados en la especie *Aspidosperma cylindrocarpon* (stigmast-5-en-3-ol, stigmasta-5,22-dien-3-ol, ergost-5-en-3-ol y cholest-5-en-3-ol), pero ninguna de estos coincidió con los encontrados en *Aspidosperma* sp. Sin embargo, se les puede encontrar en otras familias de plantas, como el terpenoide (Z)-5-[(1S,2R,4aR,8aR)-5-(hydroxymethyl)-1,2,4a-trimethyl-2,3,4,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]-3-(hydroxymethyl)pent-2-enoic acid (**5**) en especies de la familia Asteraceae, *Acritopappus confertus* y *Acritopappus heterolepis* [72], y el terpenoide Mussaendoside S (**47**) encontrado en especies de la familia Rubiaceae, *Mussaenda pubescens* y *Mussaenda pilosissima* [73,74]. *Aspidosperma* sp. también presentó los terpenoides (1S,4aS,5R,7S)-1-(beta-D-Glucopyranosyloxy)-4a,5-dihydroxy-7-methyl-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[c]pyran-7-yl (2Z)-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate (**2**), 1,2Alpha-Epoxydeacetoxydihydrogedunin (**10**) y 9-hydroxy-5b,8,11a-trimethyl-1-prop-1-en-2-yl-1,2,3,4,5,6,7,7a,9,10,11,11b,12,13,13a,13b-hexadeca hydrocyclopenta[a]chrysene-3a,5a,8-tricarboxylic acid (**28**) sin información disponible encontrada. Esto muestra que algunos de los terpenoides encontrados en *Aspidosperma* sp. (Apocynaceae) pueden estar presentes en diferentes familias de plantas, mientras otros fueron mencionados de manera preliminar para esta especie de planta.

El extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de *Aspidosperma* sp. a concentraciones de 40 y 80 mg/ml (en masa representa 0.08 mg y 0.16 mg por pocillo, respectivamente) no presentó halos de inhibición en las cepas microbianas de *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *k. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (**Tabla 5** y **Anexo 14**). Sin embargo, el extracto metanólico de corteza de *Aspidosperma pyrifolium* a 1, 2 y 3 mg/disco mostró halos de

inhibición en *S. aureus* y otros microorganismos [54]. Por otro lado, mediante Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) a partir de extracto etanólico de corteza de tallo de *Aspidosperma dispernum*, *Aspidosperma olivaceum*, *Aspidosperma pyriformium*, *Aspidosperma pyricolum*, *Aspidosperma polyneuron*, *Aspidosperma ramiflorum* se encontró que ninguno mostró actividad ante *E. coli* (a diferencia de *Aspidosperma ramiflorum*), *S. aureus* (a diferencia de *Aspidosperma ramiflorum*) y *P. aeruginosa* a concentración de 1 mg/ml de extracto [75]. Esto muestra que algunas de las especies del género *Aspidosperma* podrían no tener actividad antimicrobiana, aunque la comparación es limitada debido a las diferencias en métodos y solventes extractores usados. La técnica de evaluación de la actividad antimicrobiana en este trabajo fue mediante halos de inhibición por difusión en pocillos, mientras que, en las fuentes disponibles se usaron los métodos de difusión en disco y la concentración mínima inhibitoria (MIC). Por otro lado, el solvente extractor usado en *Aspidosperma* sp. fue agua, mientras que, las fuentes disponibles fueron metanol y etanol. El solvente extractor usado es importante por la influencia que tiene éste en la obtención de metabolitos y, por ende, está relacionado con la actividad que el extracto podría tener [76].

Estudios más recientes en especies del género *Alstonia* de la familia Apocynaceae mostraron actividad antimicrobiana [77]. El extracto acuoso de corteza de tallo de la especie *Alstonia boonei* mostró actividad antimicótica a 1000 mg/ml de concentración [78]. Una concentración de extracto bastante alta en comparación con los 80 mg/ml testeados en *Aspidosperma* sp., lo cual podría explicar la ausencia de actividad antimicrobiana registrada en la **Tabla 5**. De manera similar, se encontró mejores resultados a altas concentraciones de extracto acuoso de corteza de tallo de *Alstonia scholaris* [79]. Donde, concentraciones a partir de 75 mg/ml (otras concentraciones usadas fueron 100 y 125 mg/ml) mostraron actividad antimicrobiana en *S. aureus*, *P. Aeruginosa* y en otras tres cepas microbianas. De esta manera, con base en estas investigaciones se podría decir que, la ausencia de actividad antimicrobiana reportada en la **Tabla 5** se podría deber a la baja concentración de EAL de corteza de tallo de *Aspidosperma* sp usada en los ensayos.

***Couroupita guianensis* Aubl.**

Esta planta del género *Couroupita* pertenece a la familia Lecythidaceae y es nativa de la región amazónica [80]. En las comunidades del cantón Arajuno, a más del COVID-19, esta planta tradicionalmente se ha usado para el tratamiento de la inflamación, cicatrización, hipertensión, dolores de cabeza, cuerpo y huesos (**tabla 1** y **Anexo 2**). Usos tradicionales que previamente ya han sido descritos a excepción de la cicatrización, el cual se podría homologar con el uso “heridas” [81].

Los ensayos químicos cualitativos mostraron que el extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de *C. guianensis* contiene polifenoles y flavonoides (**Tabla 2**). Resultados semejantes fueron encontrados para extracto acuoso de tallo, donde además de polifenoles y flavonoides se reportó terpenoides [82]. En contraste con los resultados obtenidos en la **Tabla 2**, los ensayos Dragendorff y Wargner para alcaloides resultaron negativos. En general, extractos en diferentes solventes de corteza de tallo de *C. guianensis* han mostrado la presencia cualitativa de alcaloides, azúcares reductores, esteroides, polifenoles, flavonoides, glucósidos, saponinas, taninos, terpenoides y aminoácidos [82–85].

Conociendo la presencia cualitativa de los metabolitos se procedió con la cuantificación de estos mediante espectrofotometría obteniendo $5,5 \pm 0,1 \mu\text{g FTQ/mg-EAL}$ de flavonoide y $213 \pm 7 \mu\text{g PTAG/mg-EAL}$ de polifenoles (**Tabla 3**). El reporte de resultados de cuantificación de metabolitos totales en la bibliografía a partir de extractos obtenidos de diferentes solventes (generalmente etanol y metanol), diferentes estándares de referencia y método de cuantificación limitó el contraste de resultados. Por ejemplo, para extracto metanólico de corteza de tallo se estimó alrededor de $0,1 \mu\text{g}$ de flavonoides con base en quercetina, pero no se especifica sobre cuanto material vegetal está expresado dicho resultado [83]. Otro estudio a partir de extracto metanólico de corteza (extracción en frío y caliente) reportó $417,52 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ ($386,24 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ en caliente) de polifenoles con base en estándar de Catecol y $57,12 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$ ($76,16 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ en caliente) de flavonoides con base en estándar de Quercetina, donde de igual manera que el trabajo anterior no está claro sobre cuanto material vegetal está expresado el resultado; además, de que en el caso de los polifenoles se usó Catecol como estándar de referencia [86]. Obviando el solvente extractor se podría decir que las hojas tienen

mayor contenido de polifenoles con 0,329 g PTAG/g-Extracto *versus* los 0,213 g PTAG/g-EAL de polifenoles reportados en la **Tabla 3** para corteza de tallo [87].

En la planta *C. guianensis* se encontraron 23 moléculas con nivel 2 de identificación (**Tabla 7**) de las cuales 3 fueron polifenoles (**16**, **24** y **30**), 1 alcaloide (**17**), 2 flavonoides (**25** y **39**) y 3 terpenoides (**23**, **47** y **56**) (**Figura 1**). Además, se encontró Ácido Gálico con nivel 1 de identificación corroborado con el tiempo de retención del estándar de referencia (RT = 1,973) y espectro de fragmentación en la biblioteca (**Anexo 16**). Se han encontrado varias moléculas en la especie *C. guianensis* tales como polifenoles, flavonoides, terpenoides, esteroides y compuestos de indol (**Tabla 8**), sin embargo, ninguna de estas moléculas coincidió con los resultados obtenidos [87–91]. Por otro lado, algunos de los metabolitos encontrados fueron previamente reportados en otras especies de plantas. El flavonoide Ginkgolide C (**39**) fue reportado en la especie *Ginkgo biloba* de la familia Ginkgoaceae [92]. El polifenol Arctigenin (**30**) que también estuvo presente en *Aspidosperma* sp., anteriormente descrita. El polifenol 4-Methylumbelliferone (**24**) se ha encontrado en las plantas *Ferula fukanensis* (Apiaceae), *Dalbergia volubilis* (Fabaceae) y *Dalbergia monetaria* (Fabaceae) [93]. El terpenoide 3-Rha(1-2)Gal(1-2)GluA-Soyasaponenol B (**23**) se ha encontrado la especie *Pharbitis nil* de la familia Convolvulaceae. El terpenoide Mussaendoside S (**47**) también presente en *Aspidosperma* sp. y ya descrito anteriormente. El terpenoide Teucroxide (**56**) se puede encontrar en plantas de la familia Lamiaceae, *Teucrium chamaedrys* y *Teucrium salviastrum* [94–96]. En cuanto al polifenol (**16**), el alcaloide (**17**) y el flavonoide (**25**) no se encontró información disponible. Esto muestra que algunos de los metabolitos encontrados en *C. guianensis* (Lecythidaceae) pueden estar presentes en diferentes familias de plantas, mientras otras fueron mencionadas de manera preliminar para esta especie de planta.

El extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de *C. guianensis* a concentraciones de 20 y 40 mg/ml (en masa representa 0.04 mg y 0.08 mg por pocillo, respectivamente) presentó halos de inhibición en las cepas microbianas de *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *k. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (**Tabla 5** y **Anexo 11**). Anteriormente extractos metanólicos de corteza de tallo de *C. guianensis* mostraron actividad antimicrobiana [83,84,86], siendo éste el primer reporte preliminar de extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo con actividad antimicrobiana. El extracto metanólico y sus fracciones (gasolina, diclorometano, acetato de etilo y butanol) a cantidades de 4 mg/disco y 20

mg/disco mostraron halos de inhibición en *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *k. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y en otras cepas microbianas [84]. Los extractos metanólicos en frío y caliente de corteza de esta misma especie de planta mostraron halos de inhibición en *S. aureus* y *C. albicans*, el resultado en *E. coli* fue negativo y los otros dos microorganismos de interés no fueron usados [86].

Tabla 8. Metabolitos reportados en la bibliografía para la planta *Couroupita guianensis* Aubl.

Compuesto	Tipo	Parte*	Bibliografía
22-tetraen3-one	Esterol	Corteza	[88]
Ergosta-4,6,8(14)	Esterol	Corteza	[88]
Stigmasta-4,23(E)-dien-3-one1	Esterol	Corteza	[88]
Stigmasterol	Esterol	Corteza	[88]
β -sitosterol	Esterol	Corteza	[88]
2',4'dihydroxy-6'-methoxy-3', 5'-dimethylchalcone	Flavonoide	Flor y hoja.	[87,90]
7-hydroxy-5-methoxy-6, 8-dimethylflavanone	Flavonoide	Flor y hoja	[87,90]
Indigo	Indol	Fruto	[91]
Indirubin	Indol	Fruto	[91]
Isatin	Indol	Fruto	[91]
12-dioxindolo[2,1-b]quiñazoline/Tryptanthrin	Indol	Fruto	[91]
6,12-dihydro-6/Tryptanthrin	Indol	Fruto	[91]
4-hydroxybenzoic acid	Polifenol	Flor y hoja	[87,90]
Betulin-3 β -caffeate	Terpenoide	Corteza de tallo	[89]
Upeol-3 β -caffeate	Terpenoide	Corteza de tallo	[89]
β -amyrin	Terpenoide	Corteza de tallo y corteza	[88,89]
β -amyrin acetate	Terpenoide	Corteza	[88]
β -amyrone	Terpenoide	Corteza	[88]

*Estructura morfológica de la planta. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

En el primer trabajo antes mencionado se usó el método de difusión en disco para la evaluación de halos de inhibición, mientras que, en el otro trabajo no se detalló el método antimicrobiano usado, particularidades que limitaron el adecuado contraste de resultados. El solvente fue otra limitante, ya que, como se ha mencionado anteriormente éste puede influir en la obtención de metabolitos y, por ende, en la posible actividad que

el extracto pueda tener. Obviando las limitantes, se podría decir que, en promedio, el diámetro de halo de inhibición encontrado en la bibliografía (> 10 mm) fue superior al reportado en la **Tabla 5**. Mismo que se podría explicar por la cantidad superior de extracto usado en la literatura, los cuales fueron de 4 y 20 mg/disco, en relación a los 0.04 y 0.08 mg/pocillo usados en este trabajo. Pues, la concentración del extracto (específicamente, la concentración del antibiótico presente en el extracto) está relacionado con el diámetro del halo inhibición [97], es así que, a mayor concentración del extracto mayor zona de inhibición será observado.

Investigaciones recientes en otras estructuras morfológicas de la planta *C. guianensis* han mostrado actividad antimicrobiana. Fracciones del extracto etanólico de hojas mostraron actividad antibacteriana en cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y en otras bacterias [98]. El extracto metanólico de hojas de esta planta también mostró actividad antibacteriana en cepas de *S. aureus*, *E. coli*, otras bacterias y se observó inhibición en el crecimiento del micelio de 3 especies de hongos [99]. De esta manera, las hojas de esta planta también mostraron potencial antimicótico. Otro ejemplo similar se reportó en el trabajo de Veeramani et al. (2017), donde los extractos de hojas obtenidas a partir de metanol, butano, hexano y agua inhibieron el crecimiento del micelio hasta en un 100 % en *C. albicans* y en otros hongos [100]. Las flores fueron otra estructura morfológica de la planta *C. guianensis* que mostró actividad antimicrobiana. Fracciones del extracto metanólico de flores de esta planta mostró actividad antimicótica en *C. albicans* [101]. También, el extracto metanólico de flores de esta planta mostró actividad antibacteriana en cepas de *S. aureus*, *E. coli*, otras bacterias y se observó inhibición en el crecimiento del micelio de 3 especies de hongos [99]. Estas investigaciones muestran el potencial que tiene la planta entera (corteza, hojas y flores) como fuente de posibles nuevos antibióticos y antimicóticos.

***Monteverdia laevis* (Reissek) Biral.**

Esta planta del género *Monteverdia* de la familia Celastraceae anteriormente considerada dentro del género *Maytenus* fue conocida como *Maytenus laevis* Reissek., actualmente el género *Monteverdia* comprende alrededor de 120 especies distribuidas por el Neotrópico [102]. En las comunidades del cantón Arajuno, a más del COVID-19, esta planta tradicionalmente se ha usado en el tratamiento de la diarrea, purificación de la sangre, cólicos, dolor abdominal y del cuerpo (**Tabla 1** y **Anexo 2**). Medicina

tradicional corroborada por Salazar-Llumiluz (2013), los que señalan que, a diferencia de los usos “purifica la sangre” y “dolor del cuerpo” aparecen los usos “reconstituyente”, “analgésico” y “limpiar el interior del organismo” como relacionados [103].

Los ensayos químicos cualitativos mostraron que el extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de *M. laevis* contiene polifenoles, flavonoides y terpenoides (**Tabla 2**). Resultados similares fueron encontrados por Siccha-Sanchez (2018) para extracto acuoso de corteza, con la diferencia de que el ensayo Dragendorff para alcaloides resultó positivo y en vez del ensayo Salkowski para terpenoides se usó Liebermann-Burchard, el cual resultó negativo [104]. En general, extractos etanólicos de corteza de tallo de *M. laevis* han mostrado la presencia cualitativa de alcaloides, compuestos reductores, esteroides, polifenoles, flavonoides, heterósidos cardiotónicos, quinonas, saponinas, taninos, terpenoides y aminoácidos [103–105].

Conociendo la presencia cualitativa de los metabolitos se procedió con la cuantificación de estos mediante espectrofotometría obteniendo $1,5 \pm 0,1 \mu\text{g FTQ/mg-EAL}$ de flavonoide y $135 \pm 4 \mu\text{g PTAG/mg-EAL}$ de polifenoles (**Tabla 3**). Resultado preliminar en cuanto a flavonoides debido a la ausencia de información disponible. Por otro lado, el contenido de polifenoles reportado para extractos etanólicos (no se especificó la estructura morfológica usada) de *M. laevis* fue de entre 59,27 y 84,04 mg PTAG/g-Muestra [106]. Donde se observó como el solvente influye en el contenido de polifenoles totales presentes en la muestra. Aunque no está claro si la muestra es el extracto seco o el material vegetal inicial, este último valor fue relativamente similar a los reportados en la **Tabla 3** para extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de *M. laevis*. El contenido de flavonoides previamente fue reportado para otra planta de la misma familia, donde en extracto etanólico de corteza de tallo de *Maytenus macrocarpa* se encontró $2,123 \pm 0.001 \text{ mg FTQ/g-muestra}$ y en extracto acuoso $1,811 \pm 0.001 \text{ mg FTQ/g-muestra}$ [107]. Es muy probable que el contenido de flavonoides esté expresado sobre el material vegetal inicial usado, sin embargo, el segundo resultado es muy similar a los reportados en la **Tabla 3** para extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de *M. laevis*.

En la planta *M. laevis* se encontraron 11 moléculas con nivel 2 de identificación (**Tabla 7**) de las cuales 2 fueron polifenoles (**7**, **15** y **30**), 1 flavonoides (**32**) y 3 terpenoides (**6**, **44** y **47**) (**Figura 1**). Se han reportado varias moléculas en la especie *M. laevis* tales

como alcaloides, polifenoles, flavonoides, terpenoides, entre otros (**Tabla 9**), sin embargo, ninguna de estas moléculas coincidió con los resultados obtenidos [108–110].

Tabla 9. Metabolitos reportados en la bibliografía para la planta *Monteverdia laevis* (Reissek) Biral.

Compuesto	Tipo	Parte*	Bibliografía
Isoverbascoside	Carbohidrato	Corteza	[109]
3',4'-di-O-methyl(-)-epicate- chin	Esterol	Corteza	[109]
Stigmast-4-en-3-one	Esterol	Corteza de tallo	[108]
β -Sitosterol	Esterol	Corteza de tallo y Corteza	[108,109]
(-)-4'-O-methylepigallocatechin	Flavonoide	Corteza	[109]
(-)-secoisolariciresinol 4-O- β -D-(6-O-veratroyl)glucopyranoside	Flavonoide	Corteza	[109]
(2R,3S)-4'-O-methyl-2,3-dihydromyricetin	Flavonoide	Corteza	[109]
Ent-isolariciresinol	Flavonoide	Corteza	[109]
Mearnsetin	Flavonoide	Corteza	[109]
Ouratea-proanthocyanidin A	Flavonoide	Corteza	[109]
(\pm) mellein	Polifenol	Corteza de tallo	[108]
p-hydroxybenzaldehyde	Polifenol	Corteza de tallo	[108]
p-hydroxybenzoic acid	Polifenol	Corteza	[109]
28-hydroxy-12-ursene-3 β -yl-caffeate	Terpenoide	Corteza	[109]
1,3-dioxocorredor-14,26-ene	Terpenoide	Corteza de tallo	[108]
15(β)-acetoxfriedelane-1,3-dione	Terpenoide	Corteza de tallo	[108]
22 β -hydroxy-3-oxoolean-12-en-oic acid	Terpenoide	Corteza	[109]
28-hydroxyfriedelane-1,3-dione	Terpenoide	Corteza de tallo	[108]
3,22-dihydroxyolean-12-en-29-oic acid	Terpenoide	Corteza	[109]
3-epiabuslactone A	Terpenoide	Corteza	[109]
3-oxoolean-12-en-oic acid	Terpenoide	Corteza	[109]
3 β ,22 β -dihydroxyolean-12-en-29-oic acid, también conocido como 22-epi-maytenfolic acid	Terpenoide	Corteza	[109]
6-O-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)ajugol	Terpenoide	Corteza	[109]

6-O-3',4'-dimethoxybenzoyl ajugol	Terpenoide	Corteza	[109]
6-O-4"-hydroxy-3"-methoxybenzoyl ajugol	Terpenoide	Corteza	[109]
7-(acetyloxy)-O11-benzoyl-O2,11-deacetyl-7-deoxoevonin	Terpenoide	Corteza	[109]
Abruslactone A	Terpenoide	Corteza	[109]
Ajugol	Terpenoide	Corteza	[109]
Canophyllol	Terpenoide	Corteza de tallo y Corteza	[108,109]
Celastrol	Terpenoide	Corteza de tallo	[108]
Ebenifoline E-II	Terpenoide	Corteza	[109]
Ebenifoline E-III	Terpenoide	Corteza	[109]
Epikatonic acid	Terpenoide	Corteza	[109]
Friedelane-1,3-dione	Terpenoide	Corteza de tallo	[108]
Jujuborreal	Terpenoide	Corteza de tallo	[108]
Laevisines A	Terpenoide	Corteza	[110]
Laevisines B	Terpenoide	Corteza	[110]
Lambertic acid	Terpenoide	Corteza	[109]
Mayteine	Terpenoide	Corteza	[109]
Maytenfolic acid	Terpenoide	Corteza	[109]
Regeol A	Terpenoide	Corteza de tallo	[108]
Salaquinone A	Terpenoide	Corteza de tallo	[108]
Salaspermic acid	Terpenoide	Corteza	[109]
Triptocallic acid A	Terpenoide	Corteza	[109]
Triptocallic acid D	Terpenoide	Corteza	[109]
Wilforlide B	Terpenoide	Corteza	[109]

*Estructura morfológica de la planta. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

Por otro lado, algunos de los metabolitos encontrados fueron previamente reportados en otras especies de plantas: a) El flavonoide Derrustone (**32**) se ha encontrado en la especie *Derris robusta*, una planta de la familia Fabaceae [111]; b) El polifenol Arctigenin (**30**), que también estuvo presente en *Aspidosperma* sp. y *C. guianensis* anteriormente ya descritos; c) El polifenol (**7**) se ha encontrado en las especies *Plantago asiática* (Plantaginaceae), *Plantago major* (Plantaginaceae) y *Buddleja davidii* (Scrophulariaceae) [112]; d) El polifenol 2,5-Dimethylresorcinol (**15**) se ha encontrado en la especie *Taxus wallichiana* de la familia Taxaceae [113]; e) El terpenoide Medicagenic acid (**44**) se ha encontrado en las especies *Gladiolus italicus* (Crocoideae),

Trigonella calliceras (Fabaceae) y *Medicago sativa* (Fabaceae) [114,115]; y f) El terpenoide Mussaendoside S (**47**) también presente en *Aspidosperma* sp. y *C. guianensis* anteriormente descrito. Por otro lado, no se encontró información disponible del terpenoide (**6**). Esto muestra que algunos de los metabolitos encontrados en *M. laevis* (Celastraceae) pueden estar presentes en diferentes familias de plantas, mientras otros fueron mencionados de manera preliminar para esta especie de planta.

El extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de *M. laevis* a concentraciones de 40 y 80 mg/ml (en masa representa 0.08 mg y 0.16 mg por pocillo, respectivamente) presentó halos de inhibición en las cepas microbianas de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* (**Tabla 5** y **Anexo 12**). Estudios previos mostraron la ausencia de actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de esta planta. El extracto etanólico de *M. laevis* (no se especificó la estructura morfológica usada) fue usado en las técnicas de difusión en disco y en pocillo para testear 1 mg de extracto por disco y 10 mg de extracto por pocillo, donde se encontró la ausencia de actividad antimicrobiana en *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y en otros microorganismos [116]. El resultado de este último microorganismo (*P. aeruginosa*) corrobora la ausencia del halo de inhibición reportado en la **Tabla 5**, donde se muestran resultados a 0,16 mg de extracto por pocillo. En otro trabajo se ensayó extracto etanólico de corteza de tallo de *M. laevis* a concentraciones de entre 0.001 y 1 mg/ml obteniendo resultados negativos para *C. albicans* [117]. Este resultado podría deberse a la baja concentración de extracto utilizado, pues a concentraciones de 40 y 80 mg/ml se pudo observar halos de inhibición (**Tabla 5** y **Anexo 12**). Los resultados negativos encontrados en la bibliografía podrían deberse al solvente extractor usado, ya que, como se mencionó anteriormente, éste puede influir en la obtención de metabolitos y, por ende, en la posible actividad biológica del extracto.

***Protium sagotianum* Marchand.**

El género *Protium* de la familia Burseraceae al que pertenece esta planta cuenta con 90 especies distribuidas por los países tropicales del mundo [118]. En particular la especie *P. sagotianum* es nativa del Ecuador [119]. En las comunidades del cantón Arajuno, a más del COVID-19, esta planta tradicionalmente se ha usado en el tratamiento del dolor del cuerpo y abdomen (**Tabla 1** y **Anexo 2**). Anteriormente *P. sagotianum* fue considerada como una planta útil pero no se incluyó el uso medicinal, siendo éste, de manera preliminar, el primer reporte de uso de la planta en la medicina tradicional

ecuatoriana [119,120]. Sin embargo, el trabajo de Santos et al. (2020) reportó mucho más antes el uso de la planta *P. sagotianum* en la medicina tradicional brasileña, pero no se detalló los usos específicos de la planta [121]. De esta manera la ausencia de información disponible limitó el contraste de resultados.

La especie *P. sagotianum* se caracterizó por la ausencia de información en la literatura, siendo este el primer trabajo en reportar la presencia cualitativa de alcaloides, flavonoides, polifenoles y terpenoides (**Tabla 2**); la cuantificación de flavonoides y polifenoles totales mediante espectrofotometría (**Tabla 3**); la identificación de metabolitos conocidos mediante un enfoque metabolómico en UPLC-MS/MS (**Tabla 7**); la actividad antimicrobiana del extracto de planta en cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *k. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (**Tabla 5**).

El extracto metanólico de corteza de tallo de otra especie del mismo género (*Protium aracouchini*) corroboró la presencia cualitativa de flavonoides y polifenoles, la ausencia de alcaloides, pero no se ratificó la ausencia de terpenoides [122]. Dicho trabajo también cuantificó metabolitos totales, sin embargo, los valores reportados fueron bastantes inferiores (< 0.01 mg) a los presentados en la **Tabla 3** para flavonoides y polifenoles totales. En esta planta se encontraron 7 moléculas con nivel 2 de identificación (**Tabla 7**), de las cuales uno fue flavonoide (**34**), otro fue polifenol (**30**) y 2 fueron terpenoides (**1** y **47**) (**Figura 1**). De manera preliminar se identificaron compuestos orgánicos volátiles (terpenoides principalmente) en *P. sagotianum*, sin embargo, el estudio incluyó otras especies, por lo que no está claro que molécula pertenece a cada especie [123,124]. Por otro lado, varias moléculas de otras especies del género *Protium* han sido previamente reportadas tales como flavonoides, polifenoles, terpenoides, entre otros, sin embargo, ninguna de éstas coincidió con los resultados obtenidos en la **Tabla 7** [125]. Por el contrario, algunas de las moléculas reportadas en la **Tabla 7** fueron encontradas en plantas de diferentes familias. El flavonoide Eriodictyol (**34**) se puede encontrar en plantas de la familia Asteraceae, *Eutrochium fistulosum* y *Eupatorium álbum* [126]. El polifenol Arctigenin (**30**) que también estuvo presente en las plantas *Aspidosperma* sp., *C. guianensis* y *M. laevis* anteriormente ya descrito. El terpenoide Mussaendoside S (**47**) anteriormente mencionado en las plantas *Aspidosperma* sp., *C. guianensis* y *M. laevis*.

El extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de *P. sagotianum* a concentraciones de 40 y 80 mg/ml (en masa representa 0.08 mg y 0.16 mg por pocillo, respectivamente)

presentó halos de inhibición en la cepa de *C. albicans* (**Tabla 5** y **Anexo 13**). Estudios anteriores en otras especies del mismo género corroboraron la ausencia de actividad antibacteriana en *P. sagotianum*. Por ejemplo, la actividad antibacteriana de la mayoría de los extractos de *Protium hebetatum* realizados en *E. coli*, *S. aureus*, *k. pneumoniae* y *P. aeruginosa* resultaron negativo [127]. El extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de *P. sagotianum* tampoco mostró actividad antibacteriana (**Tabla 5**), resultados que se podrían interpretar como la posible ausencia de antibióticos en algunas especies del género *Protium*. Sin embargo, extracto metanólico de corteza de tallo de la planta *Boswellia dalzielii*, una especie perteneciente a la misma familia (*Burseraceae*) de *P. sagotianum*, mostró actividad antimicrobiana a partir de 25 mg de extracto por pocillo [128]. Una concentración bastante elevada en comparación a los 0.16 mg por pocillo reportado en la **Tabla 5** para este trabajo. Por lo tanto, la otra posible explicación a la ausencia de actividad antimicrobiana observada en *P. sagotianum* podría deberse a la baja cantidad de extracto usado en los ensayos.

Metabolitos antimicrobianos

La planta con mayor actividad antimicrobiana fue *C. guianensis* (**Tabla 5**). Descartando la posible contaminación de muestras, la actividad antifúngica de esta planta podría deberse a la presencia de un compuesto similar al fungicida comercial Fludioxonil (**36**), ya que, aunque hay una alta similitud de fragmentos con la biblioteca (**Anexo 17**), el error de masa es alto 35 ppm (**Tabla 7**) [129]. La segunda planta con mayor actividad antimicrobiana fue *M. laevis* (**Tabla 5**). La actividad antifúngica de esta planta probablemente se deba al terpenoide Medicagenic acid (**44**), pues derivados del mismo han mostrada actividad antimicótica [115]. La planta *Aspidosperma* sp. no presentó actividad antimicrobiana, sin embargo, algunos de los metabolitos identificados tuvieron actividad antimicrobiana reportada en la bibliografía.

Las posibles explicaciones a la ausencia de actividad antimicrobiana de *Aspidosperma* sp. podrían ser, por una parte, la baja concentración de metabolitos en la planta lo cual de alguna manera se refleja en la **Tabla 3**, y, por la otra, que los microorganismos testeados fueron resistentes a estos metabolitos antimicrobianos. Entre los metabolitos con actividad antimicrobiana encontrados en *Aspidosperma* sp. y que en la literatura mostraron actividad antimicrobiana se tienen: el metabolito Fumiquinazoline C (**38**) que mostró actividad antimicrobiana ante cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *P.*

aeruginosa, entre otros [62]; Robustic acid (**52**) fue otro metabolito presente en el extracto de *Aspidosperma* sp., el cual presentó actividad antimicrobiana en *S. aureus* y *Salmonella typhi* [65]; El metabolito Curvularin (**31**) mostró actividad antimicrobiana ante cepas de *S. aureus*, *E. coli*, entre otros [130]. Por otro lado, ninguno de los metabolitos identificados justificó la actividad antifúngica del extracto de *P. sagotianum*, por lo que, es probable que el metabolito responsable de la actividad aún no se elucide o que su cromatograma no estuvo disponible en la biblioteca de identificación.

De manera general, los metabolitos antes mencionados pueden justificar la actividad antimicótica de las especies *C. guianensis* y *M. laevis*, sin embargo, no se encontró información disponible con base en los metabolitos que justifique su actividad antimicrobiana. Por lo que, es probable que los metabolitos responsables de la actividad antibacteriana aún no hayan sido descubiertos o que su cromatograma no esté disponible en la biblioteca de espectros de Cromatografía Líquida acoplada a Masas (CL-MS/MS). El interés por conocer la/las molécula(s) responsable de la actividad antimicrobiana radica en, por ejemplo, la especie *C. guianensis* mostró halos de inhibición en dos cepas bacterianas resistentes a Ampicilina (**Tabla 5**), lo cual muestra la probable existencia algún antibiótico diferente a la molécula de la Ampicilina, por ende, una posible alternativa para el tratamiento de enfermedades bacterianas resistentes.

Metabolitos antivirales

El COVID-19 es una enfermedad vírica causada por el Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2 (SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés) responsable de la reciente pandemia categorizada como enfermedad respiratoria aguda [131]. Debido a la ausencia de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad en ese entonces, las plantas fueron el primer recurso medicinal en algunos lugares, como por ejemplo la Amazonía [21]. Recientemente se recomendó el uso de algunas plantas en el tratamiento del COVID-19 con base en la actividad de sus metabolitos, el informe no incluyó las plantas investigadas en este trabajo [22]. Anteriormente, una investigación en otro virus de la misma familia (Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio por sus siglas en inglés MERS-CoV) mostró la posibilidad de inhibir la enzima viral 3CL_{pro} mediante los flavonoides helicryetina, herbacetina, isobavacalcona y quercetina 3-β-D-glucósido. Posteriormente, un estudio *in silico* comprobó que los

andamios moleculares de los flavonoides del tipo flavonol y chalcona tienden a unirse al sitio catalítico de la enzima viral MERS-CoV 3CLpro, la cual es la principal proteasa de los coronavirus implicada en la replicación viral [14]. Recientemente, un ensayo *in silico* enfocada hacia receptor celular ACE2 (Enzima Convertidora de Angiotensina 2) del SARS-CoV-2 encontró que algunos lignanos (baicalina, hesperetina, escutelarina, glicirricina y nicotianamina) podrían impedir la entrada del virus en la célula huésped. En particular todas las plantas caracterizadas químicamente en este trabajo contienen el lignano Arctigenin (**30**), el cual fue considerado como un polifenol de acuerdo con su estructura química (**Figura 2**) [47]. Este compuesto mostró potencial actividad antiviral contra el virus de la influenza A *in vitro* y en ratones modelos, recomendándose como una opción más en el tratamiento de la gripe [132]. De esta manera, este compuesto, al ser un lignano y mostrar actividad antiviral relacionado al sistema respiratorio, podría justificar el uso tradicional de las plantas *Aspidosperma* sp., *C. guianensis*, *M. laevis* y *P. sagotianum* en el tratamiento del COVID-19.

En general se consideró a los alcaloides, flavonoides, polifenoles, terpenoides, entre otros, como antagonista del SARS-CoV-2 [13]. De esta manera los alcaloides impiden la unión del virus en la célula huésped limitando su propagación y disminuyendo la carga viral, especialmente en los pulmones. La planta con esta probable propiedad sería *Aspidosperma* sp., ya que ensayos cualitativos (**Tabla 2**) y cuantitativos (**Tabla 3**) mostraron, respectivamente, la presencia y cantidad de alcaloides presentes en la planta. Los flavonoides inhiben la actividad de la transcriptasa reversa del virus. Todas las plantas podrían tener esta actividad, pues ensayos cualitativos y cuantitativos mostraron la presencia de flavonoides en las plantas (**Tabla 2 y Tabla 3**), considerando la posible relación entre la cantidad de flavonoides totales y la probabilidad de que algún compuesto tenga actividad antiviral, la planta más prometedora sería *C. guianensis*, seguida de *M. laevis*, *P. sagotianum* y *Aspidosperma* sp. Los polifenoles pueden desestabilizar la estructura viral mediante interacción directa o a través de la intervención en la expresión del material genético viral. En general, las plantas del cantón Arajuno mostraron alta concentración de polifenoles y tendrían la misma interpretación detalla anteriormente para flavonoides. Los terpenos/terpenoides pueden inhibir la replicación viral. De acuerdo con los ensayos cualitativos, las plantas con esta probable propiedad serían *Aspidosperma* sp. y *M. laevis*.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Se encontró el uso de 13 plantas en preparados medicinales para el tratamiento del COVID-19, de las cuales *C. guianensis*, *Aspidosperma* sp. y *M. laevis* fueron las especies con más alto consenso cultural en los usos tradicionales relacionados a los síntomas de COVID-19, dolor de cabeza (1,00) y diarrea (0,80). Las otras especies con usos tradicionales relacionadas a los síntomas del COVID-19 (problemas respiratorios, fiebre y dolor del cuerpo) fueron *M. balsamum*, *Piper* sp. y *P. sagotianum*.

Además de las tres plantas con más alto consenso cultural se realizó la caracterización química preliminar de la especie *P. sagotianum* por ser la planta con menor consenso cultural y tener solo un uso tradicional relacionado a los síntomas del COVID-19 (dolor del cuerpo, ICF = 0.60). De esta manera, se encontró de manera cualitativa la presencia de alcaloides, flavonoides, polifenoles y terpenoides en la especie *Aspidosperma* sp.; flavonoides, polifenoles y terpenoides en la especie *M. laevis*; flavonoides y polifenoles en la especie *C. guianensis* al igual que en la especie *P. sagotianum*. Conociendo la presencia cualitativa de los metabolitos se procedió con la cuantificación de metabolitos totales presentes en los extractos de las plantas de interés, encontrando $18,54 \pm 0,07$ μg ATA/mg-EAL de alcaloides (cantidad de alcaloides en la muestra expresado como microgramo de alcaloides totales con base en Atropina por cada miligramo de extracto acuoso liofilizado), $0,79 \pm 0,01$ μg FTQ/mg-EAL de flavonoides (cantidad de flavonoides en la muestra expresado como microgramo de flavonoides totales con base en Quercetina por cada miligramo de extracto acuoso liofilizado) y $38,4 \pm 0,6$ μg PTAG/mg-EAL de polifenoles (cantidad de polifenoles en la muestra expresado como microgramo de polifenoles totales con base en Ácido Gálico por cada miligramo de extracto acuoso liofilizado) en la especie *Aspidosperma* sp.; $1,5 \pm 0,1$ μg FTQ/mg-EAL de flavonoides y 135 ± 4 μg PTAG/mg-EAL de polifenoles en la especie *M. laevis*; $5,5 \pm 0,1$ μg FTQ/mg-EAL de flavonoides y 213 ± 7 μg PTAG/mg-EAL de polifenoles en la especie *C. guianensis*; $0,82 \pm 0,04$ μg FTQ/mg-EAL de flavonoides y 56 ± 2 μg PTAG/mg-EAL de polifenoles en la especie *P. sagotianum*.

Los resultados de los ensayos cualitativos y cuantitativos fueron complementados mediante la identificación de moléculas conocidas. De manera que se comprobó la presencia de varias moléculas alcaloides, flavonoides, polifenoles, terpenoides, entre otras. La planta con mayor número de moléculas conocidas fue *Aspidosperma* sp. (27 moléculas), seguida de *C. guianensis* (24 moléculas), *M. laevis* (11 moléculas) y especie *P. sagotianum* (7 moléculas). Moléculas que previamente fueron reportadas en la misma especie y/o en otras especies del mismo género o de diferentes familias.

La planta *C. guianensis* presentó actividad antibacteriana (en las cepas *E. coli*, *S. aureus*, *k. pneumoniae* y *P. aeruginosa*) y antimicótica (en la cepa *C. albicans*), este último se justificó por la presencia de un metabolito semejante al antimicótico Fludioxonil (36) identificada en la planta. De manera semejante la planta *M. laevis* presentó actividad antibacteriana (en las cepas *E. coli* y *S. aureus*) y antimicótica (en la cepa *C. albicans*), este último se justificó por la presencia del metabolito Medicagenic acid (44). La planta *Aspidosperma* sp. no presentó actividad antimicrobiana y *P. sagotianum* solo presentó actividad antimicótica.

De manera general las cuatro plantas usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19 presentaron metabolitos reportados en la bibliografía como antagonistas del virus SARS-CoV-2. Los cuales también presentaron el metabolito Arctigenin (30), que anteriormente mostró actividad antiviral en el virus de la influenza A y que probablemente también presente actividad con el virus SARS-CoV-2, pues algunos taninos pueden impedir la adherencia del virus a la célula huésped.

Recomendaciones

Teniendo en cuenta que el solvente influye en la obtención de metabolitos, en este trabajo se usó agua como solvente extractor. En las comunidades estudiadas a más del agua usan etanol para la extracción de metabolitos, por lo que se recomienda la caracterización química a partir del extracto etanólico de la planta.

El extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de la planta *P. sagotianum* tiende a humedecerse muy fácilmente al aire libre, por lo que se recomienda conservar el extracto en un desecador. Se debe tener en cuenta que la conservación de los extractos a largo plazo se debe realizar mediante refrigeración.

REFERENCIAS

1. Noriega P, Guerrini A, Sacchetti G, Grandini A, Ankuash E, Manfredini S. Chemical Composition and Biological Activity of Five Essential Oils from the Ecuadorian Amazon Rain Forest. *Molecules*. 2019;24: 1–12. doi:10.3390/molecules24081637
2. Gavilanes-Montoya A v., Castillo-Vizuette DD, Ricaurte-Yepez CB, Marcu M v. Known and Newly Documented uses of Rainforest Plant Species in the Pastaza Region, Ecuador. *Bulletin of the Transilvania University of Brasov Series II: Forestry • Wood Industry • Agricultural Food Engineering*. 2019;12: 35–42. doi:10.31926/BUT.FWIAFE.2019.12.61.1.3
3. Shanley P, da Serra Silva M, Melo T, Carmenta R, Nasi R. From conflict of use to multiple use: Forest management innovations by small holders in Amazonian logging frontiers. *For Ecol Manage*. 2012;268: 70–80. doi:10.1016/J.FORECO.2011.05.041
4. Innerhofer S, Bernhardt KG. Ethnobotanic garden design in the Ecuadorian Amazon. *Biodivers Conserv*. 2011;20: 429–439. doi:10.1007/S10531-010-9984-9
5. Robles Arias DM, Cevallos D, Gaoue OG, Fadiman MG, Hindle T. Non-random medicinal plants selection in the Kichwa community of the Ecuadorian Amazon. *J Ethnopharmacol*. 2020;246: 1–8. doi:10.1016/J.JEP.2019.112220
6. GADM Arajuno. Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Arajuno al año 2025. Sistema Nacional de Información (SNI). Cantón Arajuno; 2018. Available: <https://multimedia.planificacion.gob.ec/PDOT/descargas.html>
7. Giovannini P. Medicinal plants of the Achuar (Jivaro) of Amazonian Ecuador: Ethnobotanical survey and comparison with other Amazonian pharmacopoeias. *J Ethnopharmacol*. 2015;164: 78–88. doi:10.1016/J.JEP.2015.01.038
8. Davis EW, Yost JA. The ethnomedicine of the waorani of Amazonian Ecuador. *J Ethnopharmacol*. 1983;9: 273–297. doi:10.1016/0378-8741(83)90036-3

9. Ramírez JD, Sordillo EM, Gotuzzo E, Zavaleta C, Caplivski D, Navarro JC, et al. SARS-CoV-2 in the Amazon region: A harbinger of doom for Amerindians. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14: 1–10. doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0009118
10. Benarroch EL. “El remedio de Arajuno”, el saber ancestral indígena frente a la COVID-19. *EFEverde*. 10 Jul 2020. Available: <https://www.efeverde.com/noticias/arajuno-ecuador-saber-ancestral/>. Accessed 27 Apr 2021.
11. Ministerio de Salud Pública. Comportamiento Covid-19 (PCR) Ecuador. In: Gobierno de la República del Ecuador [Internet]. 11 Jun 2020 [cited 27 Apr 2021]. Available: <https://www.coronavirusecuador.com/data/>
12. Marrelli M. Medicinal Plants. *Plants* 2021. 2021;10: 1355. doi:10.3390/plants10071355
13. Pal S, Chowdhury T, Paria K, Manna S, Parveen S, Singh M, et al. Brief survey on phytochemicals to prevent COVID-19. *Journal of the Indian Chemical Society*. 2022;99: 100244. doi:10.1016/J.JICS.2021.100244
14. Fu Z, Menéndez-Arias L, Liu X, Zhan P. Advances in Natural Products-Based Antiviral Agents. 1st ed. In: Shahid-ul-Islam, Banday JA, editors. *Chemistry of Biologically Potent Natural Products and Synthetic Compounds*. 1st ed. Beverly: John Wiley & Sons, Ltd; 2021. pp. 21–42. doi:10.1002/9781119640929.CH2
15. Skiryicz A, Kierszniowska S, Méret M, Willmitzer L, Tzotzos G. Medicinal Bioprospecting of the Amazon Rainforest: A Modern Eldorado? *Trends Biotechnol*. 2016;34: 781–790. doi:10.1016/j.tibtech.2016.03.006
16. de Moura RS, Resende ÂC. Cardiovascular and Metabolic Effects of Açaí, an Amazon Plant. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2016;68. Available: https://journals.lww.com/cardiovascularpharm/Fulltext/2016/07000/Cardiovascular_and_Metabolic_Effects_of_A_a_,_an.3.aspx
17. López G. Etnomedicina aplicada en época covid en el Cantón Puyo. Universidad de Guayaquil. 2021. Available: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/56710>

18. Tupuy Andy AP, Andy Shiguango JA. Elaboración de una guía de manejo de la medicina natural de plantas anticonceptivas existentes en el cantón Arajuno, provincia de Pastaza - 2011. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2013. Available: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2493>
19. Simbaña Rojas M de los Á. Uso de extractos vegetales de plantas amazónicas para el diseño de programas de manejo integrado de plagas (MIP) en Ecuador. Universidad de Sevilla. 2018. Available: https://idus.us.es/handle/11441/73735#.YlkkTgB_PWs.mendeley
20. Valarezo García C, Jaramillo Abril D, Djabayan Djibeyan P, Vásquez Andrade P, Falconí Ontaneda F. La amazonia ecuatoriana y sus saberes ancestrales; el uso del extracto de corteza del árbol de Piwi (*Pictocoma discolor*) un saber singular en el accidente ofídico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2016;47: 26–34. Available: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57956612002>
21. Sirén A, Uzendoski M, Swanson T, Negrete IJ, Gualinga ES, Tapia A, et al. Resiliencia contra la pandemia de covid-19 en comunidades indígenas kichwa en la Amazonía ecuatoriana. *Mundos Plurales - Revista Latinoamericana de Políticas y Acción Pública*. 2020;7: 101–107. doi:10.17141/MUNDOSPLURALES.2.2020.4738
22. Llivisaca-contreras SA, Naranjo-morán J, Pino-acosta A, Pieters L, vanden Berghe W, Manzano P, et al. Plants and Natural Products with Activity against Various Types of Coronaviruses: A Review with Focus on SARS-CoV-2. *Molecules*. 2021;26. doi:10.3390/MOLECULES26134099
23. Dandawate PR, Subramaniam D, Padhye SB, Anant S. Bitter melon: A panacea for inflammation and cancer. *Chinese Journal of Natural Medicines*. Chinese Journal of Natural Medicines Editorial Board; 2016. pp. 81–100. doi:10.1016/S1875-5364(16)60002-X
24. Taylor JLS, Rabe T, McGaw LJ, Jäger AK, van Staden J. Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. *Plant Growth Regul*. 2001;34: 23–37. doi:10.1023/A:1013310809275

25. Hariyono P, Patramurti C, Candrasari DS, Hariono M. An integrated virtual screening of compounds from *Carica papaya* leaves against multiple protein targets of SARS-Coronavirus-2. *Results Chem.* 2021;3: 100113. doi:10.1016/j.rechem.2021.100113
26. Heinrich M, Edwards S, Moerman DE, Leonti M. Ethnopharmacological field studies: A critical assessment of their conceptual basis and methods. *J Ethnopharmacol.* 2009;124: 1–17. doi:10.1016/J.JEP.2009.03.043
27. Leonti M, Weckerle CS. Quantitative and Comparative Methods in Ethnopharmacology. In: Heinrich M, K. Jäger A, editors. *Ethnopharmacology.* John Wiley & Sons, Ltd; 2015. pp. 29–40. doi:10.1002/9781118930717.CH4
28. OMS. Coronavirus - Síntomas. In: WHO [Internet]. 2021 [cited 3 Oct 2021]. Available: https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#tab=tab_3
29. Aragão TP, dos Prazeres LDKT, Brito SA, Neto PJR, Rolim LA, da Silva Almeida JRG, et al. Contribution of Secondary Metabolites to the Gastroprotective Effect of Aqueous Extract of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) Stem Bark in Rats. *Molecules.* 2018;23: 112. doi:10.3390/MOLECULES23010112
30. Stintzing FC, Kammerer D, Schieber A, Adama H, Nacoulma OG, Carle R. Betacyanins and Phenolic Compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhavia erecta* L. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences.* 2004;59: 1–8. doi:10.1515/ZNC-2004-1-201/MACHINEREADABLECITATION/RIS
31. Truong D-H, Nguyen H, Thuy N, Ta A, Bui AV, Do H, et al. Evaluation of the Use of Different Solvents for Phytochemical Constituents, Antioxidants, and In Vitro Anti-Inflammatory Activities of *Severinia buxifolia*. *J Food Qual.* 2019;2019: 9. doi:10.1155/2019/8178294
32. 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=S0034-77442013000100023

33. 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>
34. Harborne JB. *Phytochemical Methods*. 1st ed. Dordrecht: Springer Netherlands; 1984. doi:10.1007/978-94-009-5570-7
35. 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>
36. Eswari JS, Yadav M. New perspective of drug discovery from herbal medicinal plants: *Andrographis paniculata* and *Bacopa monnieri* (terpenoids) and novel target identification against *Staphylococcus aureus*. *South African Journal of Botany*. 2019;124: 188–198. doi:10.1016/J.SAJB.2019.05.013
37. 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>
38. Wang W, Li J, Zhang H, Wang X, Fan J, Zhang X. Phenolic compounds and bioactivity evaluation of aqueous and methanol extracts of *Allium mongolicum* Regel. *Food Sci Nutr*. 2019;7: 779–787. doi:10.1002/FSN3.926
39. 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
40. Manandhar S, Luitel S, Dahal RK. In Vitro Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria. *J Trop Med*. 2019;2019: 1–5. doi:10.1155/2019/1895340
41. Gavriil A, Zilelidou E, Papadopoulos AE, Siderakou D, Kasiotis KM, Haroutounian SA, et al. Evaluation of antimicrobial activities of plant aqueous extracts against *Salmonella Typhimurium* and their application to improve safety of pork meat. *Sci Rep*. 2021;11: 1–14. doi:10.1038/s41598-021-01251-0

42. de Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33: 1–49. doi:10.1128/CMR.00181-19/ASSET/CBA1C1D1-CF90-43DE-A9DF-32D24A4334AC/ASSETS/GRAPHIC/CMR.00181-19-F0001.JPEG
43. Nikousefat Z, Hashemnia M, Karamyan A. Potential of the ImageJ software in the differentiation of various types of canine lymphadenopathies with fine needle aspiration cytology (FNAC). *Comp Clin Path.* 2018;27: 643–648. doi:10.1007/S00580-018-2641-5
44. Bajkacz S, Baranowska I, Buszewski B, Kowalski B, Ligor M. Determination of Flavonoids and Phenolic Acids in Plant Materials Using SLE-SPE-UHPLC-MS/MS Method. *Food Anal Methods.* 2018;11: 3563–3575. doi:10.1007/S12161-018-1332-9/FIGURES/6
45. Tada I, Chaleckis R, Tsugawa H, Meister I, Zhang P, Lazarinis N, et al. Correlation-Based Deconvolution (CorrDec) to Generate High-Quality MS2 Spectra from Data-Independent Acquisition in Multisample Studies. *Anal Chem.* 2020;92: 11310–11317. doi:10.1021/ACS.ANALCHEM.0C01980/SUPPL_FILE/ACOC01980_SI_002.XLSX
46. Sumner LW, Alexander AE, Ae A, Ae DB, Ae MHB, Beger R, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics.* 2007;3: 211–221. doi:10.1007/s11306-007-0082-2
47. Creus EG. Compuestos fenólicos. In: *Offarm* [Internet]. Elsevier; 1 Jun 2004 [cited 1 Sep 2022] pp. 80–84. Available: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13063508>
48. Cádiz-Carrasco MG, García-Alegría AM. Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultravioleta-visible. *Biocencia.* 2015;17: 32–39. doi:10.18633/BT.V17I1.15
49. Brenton AG, Godfrey AR. Accurate Mass Measurement: Terminology and Treatment of Data. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2010;21: 1821–1835. doi:10.1016/J.JASMS.2010.06.006

50. de Paula RC, Dolabela MF, de Oliveira AB. *Aspidosperma* Species as Sources of Antimalarials. Part III. A Review of Traditional Use and Antimalarial Activity. *Planta Med.* 03.03.2014. 2014;80: 378–386. doi:10.1055/s-0034-1368168
51. de Almeida VL, Silva CG, Silva AF, Campana PRV, Foubert K, Lopes JCD, et al. *Aspidosperma* species: A review of their chemistry and biological activities. *J Ethnopharmacol.* 2019;231: 125–140. doi:10.1016/J.JEP.2018.10.039
52. Roopashree KM, Naik D. Advanced method of secondary metabolite extraction and quality analysis. *J Pharmacogn Phytochem.* 2019;8: 1829–1842. Available: <https://www.phytojournal.com/archives?year=2019&vol=8&issue=3&ArticleId=8275>
53. Alves NM, Silva MAC, Parente LML, Paula JR de, Cruz A de C, Diniz JA, et al. Pharmacognostic assessment and pre-clinical toxicity of ethanolic extract from *Aspidosperma subincanum* Mart. stem bark (Guatambu). *Research, Society and Development.* 2021;10: 1–13. doi:10.33448/RSD-V10I9.17547
54. Nóbrega MGLA da. Perfil fitoquímico e farmacológico da *Aspidosperma pyriforme* Mart. ensaios pré-clínicos. Universidade Federal de Pernambuco. 2008. Available: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/3195>
55. Messiadés DM da S. Estudo das propriedades biológicas, fitoquímicas e toxicológicas de *Aspidosperma pyriforme* Mart. Universidade Estadual da Paraíba. 2014. Available: <http://tede.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/tede/2376>
56. Salazar-Díaz J, Guerrero-Marina J, Rodríguez-Espejo Y. Actividad antioxidante de *Aspidosperma excelsum* Benth, *Dracontium lorentense* Krause y *Pothemorphe peltata* (L) Miq. *Revista Agrotecnológica Amazónica.* 2021;1: 27–39. doi:10.51252/RAA.V1I2.190
57. Sampietro DA, del Huerto Sánchez Matías M, Vattuone MA, Catalán CAN. *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl. In: Máthé Á, Bandoni A, editors. *Medicinal and Aromatic Plants of South America Vol 2.* Cham: Springer, Cham; 2021. pp. 75–83. doi:10.1007/978-3-030-62818-5_4

58. Pereira MDM, Jácome RLRP, Alcântara AFDC, Alves RB, Raslan DS. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Quim Nova*. 2007;30: 970–983. doi:10.1590/S0100-40422007000400037
59. PubChem. Harman (CID: 5281404). In: National Center for Biotechnology Information [Internet]. 3 Sep 2022 [cited 3 Sep 2022]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281404>
60. el Gendy MAM, Soshilov AA, Denison MS, El-Kadi AOS. Harmaline and harmalol inhibit the carcinogen-activating enzyme CYP1A1 via transcriptional and posttranslational mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50: 353–362. doi:10.1016/J.FCT.2011.10.052
61. PubChem. Harmalol (CID: 3565). In: National Center for Biotechnology Information [Internet]. 3 Sep 2022 [cited 3 Sep 2022]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3565>
62. El-Hawary SS, Moawad AS, Bahr HS, Abdelmohsen UR, Mohammed R. Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. *RSC Adv*. 2020;10: 22058–22079. doi:10.1039/D0RA04290K
63. Guimarães HA, Vieira IJC, Braz-Filho R, Crotti AEM, dos Almeida VS, de Paula RC. Two Novel Plumeran Indole Alkaloids Isolated from *Aspidosperma cylindrocarpon* (Apocynaceae). *Helv Chim Acta*. 2013;96: 1793–1800. doi:10.1002/HLCA.201200522
64. de Aquino AB, Cavalcante-Silva LHA, da Matta CBB, Epifânio WADN, Aquino PGV, Santana AEG, et al. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). *The Scientific World Journal*. 2013;2013: 1–8. doi:10.1155/2013/218627
65. Harrison JJEK, Ayine-Tora MD, Appiagyei B, Mills-Robertson FC, Asomaning WA, Achel DG, et al. Crystal structure and in vitro antimicrobial activity studies of Robustic acid and other Alpinumisoflavones isolated from *Millettia thonningii*. *Z Kristallogr Cryst Mater*. 2019;234: 229–235. doi:10.1515/ZKRI-2018-2052/DOWNLOADASSET/SUPPL/ZKRI-2018-2052_SUPPL.ZIP

66. PubChem. Robustic acid (CID: 54677407). In: National Center for Biotechnology Information [Internet]. 3 Sep 2022 [cited 4 Sep 2022]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54677407>
67. Kren V, Walterová D. Silybin and silymarin - new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005;149: 29–41. doi:10.5507/BP.2005.002
68. Yao X, Zhu F, Zhao Z, Liu C, Luo L, Yin Z. Arctigenin enhances chemosensitivity of cancer cells to cisplatin through inhibition of the STAT3 signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2011;112: 2837–2849. doi:10.1002/JCB.23198
69. PubChem. Arctigenin (CID: 64981). In: National Center for Biotechnology Information [Internet]. 3 Sep 2022 [cited 4 Sep 2022]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64981>
70. PubChem. Aloesin (CID: 160190). In: National Center for Biotechnology Information [Internet]. 3 Sep 2022 [cited 4 Sep 2022]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/160190>
71. Woo S, Kang K bin, Kim J, Sung SH. Molecular Networking Reveals the Chemical Diversity of Selaginellin Derivatives, Natural Phosphodiesterase-4 Inhibitors from *Selaginella tamariscina*. *J Nat Prod.* 2019;82: 1820–1830. doi:10.1021/ACS.JNATPROD.9B00049/SUPPL_FILE/NP9B00049_SI_001.PDF
72. PubChem. (Z)-5-[(1S,2R,4aR,8aR)-5-(hydroxymethyl)-1,2,4a-trimethyl-2,3,4,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]-3-(hydroxymethyl)pent-2-enoic acid (CID: 25775466). In: National Center for Biotechnology Information [Internet]. 3 Sep 2022 [cited 4 Sep 2022]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25775466>
73. Thu VK, Bach NX, Hien NTT, Son HT, Quang TH, Kim YC, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory triterpene glycosides from *Mussaenda pilosissima* Valetton. *Phytochem Lett.* 2020;36: 139–143. doi:10.1016/J.PHYTOL.2020.01.023
74. Zhao W, Wang P, Xu R, Qin G, Jiang S, Wu H. Saponins from *Mussaenda pubescens*. *Phytochemistry.* 1996;42: 827–830. doi:10.1016/0031-9422(95)00028-3

75. de Oliveira AJB, Koike L, Reis FDAMH, Eguchi SY, Endo EH, Nakamura CV, et al. Preliminary studies on the antibacterial activity of crude extracts and alkaloids from species of *Aspidosperma*. *Pharm Biol.* 2009;47: 1085–1089. doi:10.3109/13880200903008633
76. Lefebvre T, Destandau E, Lesellier E. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *J Chromatogr A.* 2021;1635: 461770. doi:10.1016/J.CHROMA.2020.461770
77. Anand U, Nandy S, Mundhra A, Das N, Pandey DK, Dey A. A review on antimicrobial botanicals, phytochemicals and natural resistance modifying agents from Apocynaceae family: Possible therapeutic approaches against multidrug resistance in pathogenic microorganisms. *Drug Resistance Updates.* 2020;51: 1368–7646. doi:10.1016/J.DRUP.2020.100695
78. Igbinaduwa P, Obasuyi O. Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of stem bark Extract of *Alstonia Boonei* Dewild (Apocynaceae). *Journal of Pharmaceutical and Allied Sciences.* 2012;9: 1574–1579. doi:10.4314/jophas.v9i3.
79. Singh B, Sangwan P. Taxonomy, Ethnobotany and Antimicrobial Activity of *Alstonia scholaris* (L.) R. Br., *Carissa carandas* L. and *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *International Journal of Biotechnology and Biosciences.* 2011;1: 102–112. Available: https://www.researchgate.net/publication/269876021_Taxonomy_Ethnobotany_and_Antimicrobial_Activity_of_Alstonia_scholaris_L_R_Br_Carissa_carandas_L_and_Catharanthus_roseus_L_G_Don
80. Lim TK. *Couroupita guianensis*. 1st ed. Edible Medicinal And Non Medicinal Plants. 1st ed. Chisholm: Springer Dordrecht; 2012. pp. 133–137. doi:10.1007/978-94-007-2534-8_14
81. Sheba LA, Anuradha V. An updated review on *Couroupita guianensis* Aubl: a sacred plant of India with myriad medicinal properties. *Journal of Herbmed Pharmacology.* 2020;9: 1–11. doi:10.15171/JHP.2020.01

82. Manimegalai S, Rakkimuthu G. Phytochemical screening of stem of *Couroupita guianensis*. *Int J Pharm Sci Res.* 2012;3. Available:
[http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3\(11\).4434-37](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3(11).4434-37)
83. Akther T, Khan MS, Hemalatha S. Extraction of flavonoid from various parts of *Couroupita guianensis* and its efficacy against pathogenic bacteria. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2017;10: 354–358.
doi:10.22159/AJPCR.2017.V10I4.16864
84. Khan MR, Kihara M, Omoloso AD. Antibiotic Activity of *Couroupita guianensis*. *J Herbs Spices Med Plants.* 2003;10: 95–108. doi:10.1300/J044V10N03_10
85. Phyo H, Kyu K, Khaing A. Isolation and Structure Elucidation of Terpene Compound From the Stem Bark of *Couroupita Guianensis* Aubl.(Amyauk-San-Bin). *IEEE-SEM.* 2019;8: 221–232. Available:
<https://eoi.citefactor.org/10.11230/ieeesem.2019.07.4144>
86. Shivashankar M, Rajeshwari S, Nagananda GS, Rajath S, Chandan N. Comparative antioxidant and antimicrobial studies of cold and hot bark hydromethanolic extract of *Couroupita guianensis* Aubl. *Research in Pharmacy.* 2013;3: 6–13. Available:
<https://updatepublishing.com/journal/index.php/rip/article/view/1347>
87. Martínez A, Conde E, Moure A, Domínguez H, Estévez RJ. Protective effect against oxygen reactive species and skin fibroblast stimulation of *Couroupita guianensis* leaf extracts. *Nat Prod Res.* 2012;26: 314–322.
doi:10.1080/14786411003752094
88. Anjaneyulu ASR, Rao SS. A New Ketosteroid from the Bark of *Couropita guianensis* Aubl. *Indian J Chem.* 1998;37B: 382–386. Available:
<http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/56778/1/IJCB%2037B%284%29%20382-386.pdf>
89. Begum R, Rahman MS, Chowdhury AMS, Hasan CM, Rashid MA. Secondary metabolites (Triterpenes) from *Couroupita guianensis*. *Orient Pharm Exp Med.* 2009;9: 200–205. doi:10.3742/OPEM.2009.9.2.200

90. Gousia SK, Kumar KA, Kumar TV, Latha JNL. Biological activities and medicinal properties of *Couropita guianensis*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research*. 2013;3: 140–143. Available: https://www.researchgate.net/publication/322701175_Biological_activities_and_medicinal_properties_of_Couropita_guianensis
91. Bergman J, Lindström J-O, Tilstam U. The structure and properties of some indolic constituents in *Couroupita guianensis* aubl. *Tetrahedron*. 1985;41: 2879–2881. doi:10.1016/s0040-4020(01)96609-8
92. PubChem. ginkgolide-C (CID: 9867869). In: National Center for Biotechnology Information [Internet]. 3 Sep 2022 [cited 5 Sep 2022]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9867869>
93. PubChem. Hymecromone (CID: 5280567). In: National Center for Biotechnology Information [Internet]. 3 Sep 2022 [cited 5 Sep 2022]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280567>
94. de La Torre MC, Pascual C, Rodríguez B, Piozzi F, Savona G, Perales A. Neoclerodane diterpenoids from *Teucrium salviastrum*. *Phytochemistry*. 1986;25: 1397–1403. doi:10.1016/S0031-9422(00)81297-2
95. Elmastas M, Erenler R, Isnac B, Aksit H, Sen O, Genc N, et al. Isolation and identification of a new neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium chamaedrys* L. *Nat Prod Res*. 2016;30: 299–304. doi:10.1080/14786419.2015.1057583
96. Garcia-Alvarez MC, Lukács G, Neszmelyi A, Piozzi F, Rodriguez B, Savona G. Structure of Teucroxide. Application of Natural-Abundance ¹³C-¹³C Coupling Constants Observed via Double-Quantum Coherence. *Journal of Organic Chemistry*. 1983;48: 5123–5126. doi:10.1021/JO00173A068/ASSET/JO00173A068.FP.PNG_V03
97. Eloff JN. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complement Altern Med*. 2019;19: 1–8. doi:10.1186/S12906-019-2519-3/TABLES/1
98. Premalatha S, Ramar G. Anti-bacterial properties of fractions isolated from *Couroupita guianensis* and *Atalantia monophylla*. *The Pharma Innovation*

- Journal. 2019;8: 542–547. Available:
<https://www.thepharmajournal.com/archives/?year=2019&vol=8&issue=1&ArticleId=2962>
99. Raghavendra HL, Prashith Kekuda TR, Pushpavathi D, Shilpa M, Petkar T, Siddiqha A, et al. Antimicrobial, radical scavenging, and insecticidal activity of leaf and flower extracts of *Couroupita guianensis* Aubl. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*. 2017;11: 179. doi:10.22377/IJGP.V11I03.1122
 100. Veeramani K, Joseph D, Sivasubramaniam S. Inhibition of fungal mycelial growth and spore germination by *Couroupita guianensis* leaf extracts and its preliminary phytochemical analysis. *Indian Journal of Applied Microbiology (IJAM)*. 2017;20: 21–30. Available: <http://www.ijamicro.com/abstractview.php?ID=55&vol=20-1-2017&SNo=3>
 101. Gothai S, Vijayarathna S, Chen Y, Kanwar J, Wahab H, Sasidharan S. In vitro-scientific evaluation on anti-*Candida albicans* activity, antioxidant properties and phytochemical constituents with the identification of antifungal active fraction from traditional medicinal plant *Couroupita guianensis* Aubl. Flower. *Journal of Complementary Medicine Research*. 2018;8: 101. doi:10.5455/JCMR.20171223034127
 102. Biral L, Simmons MP, Smidt EC, Tembrock LR, Bolson M, Archer RH, et al. Systematics of New World *Maytenus* (Celastraceae) and a New Delimitation of the Genus. *Syst Bot*. 2017;42: 680–693. doi:10.1600/036364417X696456
 103. Salazar-Llumiluiza DF. Desarrollo de un medicamento analgésico tópico de *Maytenus laevis* Rissek (Chuchuguaso). UCE. 2013. Available: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1465>
 104. Siccha-Sanchez SC. Caracterización físico química del extracto fluido de *Maytenus Laevis* (Chuchuhuasi) y su toxicidad sobre *Artemia Salina*. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. 2018. Available: <https://hdl.handle.net/20.500.13032/7937>
 105. Guzmán-Pérez JI, Castro-Alcántara LS, Camones-Maldonado RD. Caracterización físico-química de la pomada de *Maytenus laevis* “Chuchuhuasi” elaborada en la

- Farmacia Natural del Hospital III EsSalud Chimbote. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*. 2020;5: 135–144. doi:10.26722/RPMI.2020.54.186
106. Uribe-Villarreal JC, Zavala-Urtecho ED, Santisteban-Miranda CS, Ganoza-Yupanqui ML. Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de *Maytenus laevis* Reissek Chuchuhuasi dispensado en el centro de atención de medicina complementaria, EsSalud, Trujillo. In: Martínez JL, editor. VI Congreso Latinoamericano De Plantas Medicinales. Trujillo: Medicinal Plant Communications; 2018. p. 8. Available: <https://solaplamed.org/mpc/>
 107. García-Castañeda IM. Determinación de metabolitos secundarios en la corteza de *Maytenus Macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. (Chuchuhuasi) y cuantificación de flavonoides totales. Universidad Católica Los Ángeles Chimbote. 2022. Available: <https://hdl.handle.net/20.500.13032/25475>
 108. Abdul-Razzaq MH. Phytomedical studies on the Amazonian traditional medicine “Chuchuguasa” (*Maytenus laevis* Reissek). University of Strathclyde. 2016. Available: <https://doi.org/10.48730/ph3m-zh27>
 109. Nakagawa H, Takaishi Y, Fujimoto Y, Duque C, Garzon C, Sato M, et al. Chemical Constituents from the Colombian Medicinal Plant *Maytenus laevis*. *J Nat Prod*. 2004;67: 1919–1924. doi:10.1021/np040006s
 110. Piacente S, Tommasi N de, Pizza C. Laevisines A and B: Two New Sesquiterpene–Pyridine Alkaloids from *Maytenus laevis*. *J Nat Prod*. 1999;62: 161–163. doi:10.1021/np970518p
 111. East AJ, Ollis WD, Wheeler RE. Natural occurrence of 3-aryl-4-hydroxycoumarins. Part I. Phytochemical examination of *Derris robusta*(roxb.) benth. *Journal of the Chemical Society C: Organic*. 1969; 365–374. doi:10.1039/J39690000365
 112. PubChem. [(2R,3R,4S,5R,6R)-6-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]-3,5-dihydroxy-4-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]methyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoate (CID: 45359577). In: National Center for Biotechnology Information [Internet]. 3 Sep 2022 [cited 6 Sep 2022]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/45359577>

113. PubChem. 2,5-Dimethylresorcinol (CID: 68103). In: National Center for Biotechnology Information [Internet]. 3 Sep 2022 [cited 6 Sep 2022]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68103>
114. PubChem. Medicagenic acid (CID: 65048). In: National Center for Biotechnology Information [Internet]. 3 Sep 2022 [cited 7 Sep 2022]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65048>
115. Zehavi U, Polacheck I. Saponins as antimycotic agents: Glycosides of medicagenic acid. 1st ed. In: Waller GR, Yamasaki K, editors. Saponins Used in Traditional and Modern Medicine. 1st ed. Boston, MA: Springer; 1996. pp. 535–546. doi:10.1007/978-1-4899-1367-8_44/COVER
116. Núñez Hernández ET. “Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos de plantas medicinales del Ecuador.” Universidad Técnica de Ambato. 2019. Available: <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/30418>
117. Borja Herrera EH. “Actividad antifúngica de los extractos de plantas croton lechleri y maytenus laevis en cepas de candida albicans atcc 10231.” Universidad Técnica de Ambato. 2019. Available: <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/30358>
118. Cuatrecasas J. PRIMA FLORA COLOMBIANA. Journal of Plant Taxonomy and Geography. 1957;12: 375–441. doi:10.1080/00837792.1957.10669667
119. de la Torre L, Navarrete H, Muriel P, Macía M, Balslev H. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. 1st ed. Quito, Ecuador; 2008. Available: <https://bibdigital.rjb.csic.es/idurl/1/16016>
120. Cerón C, Reyes C, Tonato L. Estructura, composición y etnobotánica del sendero “Ccottacco Shaiqui”, Cuyabeno-Ecuador. CINCHONIA. 2006;7: 82–114. Available: <https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CINCHONIA/article/view/2340>
121. dos Santos RO, de Lima RB, Soares RN, Souza Dantas B de, de Brito AC, Cordeiro MV, et al. Influence of the soil on the spatial structure of forest species – preliminary results in a terra firme secondary forest plot, Amapá, Brazil. Southern Forests: a Journal of Forest Science. 2020;82: 179–195. doi:10.2989/20702620.2020.1759294

122. Recuero Pacheco HM. Evaluación de la actividad antioxidante y cuantificación de los compuestos fenólicos, flavonoides totales presentes en los extractos metanólicos de la corteza y las hojas secas de *Protium aracouchini* (Aubl.) Marchand (Anime). Archivo Pdf. Universidad de Sucre. 2018.
doi:10.1/JQUERY.MIN.JS
123. Courtois EA, Paine CET, Blandinieres PA, Stien D, Bessiere JM, Houel E, et al. Diversity of the Volatile Organic Compounds Emitted by 55 Species of Tropical Trees: a Survey in French Guiana. *Journal of Chemical Ecology* 2009 35:11. 2009;35: 1349–1362. doi:10.1007/S10886-009-9718-1
124. Courtois EA, Baraloto C, Timothy Paine CE, Petronelli P, Blandinieres PA, Stien D, et al. Differences in volatile terpene composition between the bark and leaves of tropical tree species. *Phytochemistry*. 2012;82: 81–88.
doi:10.1016/J.PHYTOCHEM.2012.07.003
125. Rüdiger A, Siani A, Junior V, Junior V. The Chemistry and Pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). *Pharmacogn Rev.* 2007;1: 93–104. Available: <https://www.phcogrev.com/article/2007/1/1-9>
126. PubChem. Eriodictyol (CID: 440735). In: National Center for Biotechnology Information [Internet]. 3 Sep 2022 [cited 7 Sep 2022]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/440735>
127. Conrado GG, Simplicio FG, Costa KRC, Rehder VLG, Espinar MF, Souza GO, et al. Antibacterial activity and chemical compounds of leaves and branches of *Protium hebetatum*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 2015;17: 865–874.
doi:10.1590/1983-084X/14_123
128. Mamza UT, Sodipo OA, Abdulrahman FI, Khan IZ. Phytochemical Analysis and In vitro Antimicrobial Assay of the Methanolic Stem Bark Extract of *Boswellia dalzielii* Hutch. (Burseraceae). *Chemistry Research Journal*. 2018;3: 161–168.
Available: <https://chemrj.org/archive/volume-3-issue-4-2018/>
129. Brandhorst TT, Klein BS. Uncertainty surrounding the mechanism and safety of the post-harvest fungicide fludioxonil. *Food and Chemical Toxicology*. 2019;123: 561–565. doi:10.1016/J.FCT.2018.11.037

130. Ataides D, Pamphile JA, Garcia A, Ribeiro MA dos S, Polonio JC, Sarragiotto MH, et al. Curvularin produced by endophytic *Cochliobolus* sp. G2-20 isolated from *Sapindus saponaria* L. and evaluation of biological activity. *J Appl Pharm Sci.* 2018;8: 032–037. doi:10.7324/JAPS.2018.81204
131. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19: 141–154. doi:10.1038/s41579-020-00459-7
132. Hayashi K, Narutaki K, Nagaoka Y, Hayashi T, Uesato S. Therapeutic Effect of Arctiin and Arctigenin in Immunocompetent and Immunocompromised Mice Infected with Influenza A Virus. *Biol Pharm Bull.* 2010;33: 1199–1205. doi:10.1248/BPB.33.1199

ANEXOS

Anexo 1. Entrevista realizada a los sabios de las tres comunidades del cantón Arajuno.

Datos del informante	
Nombre:	
Edad:	
Fecha:	
Pregunta 1:	¿Quién le enseñó a preparar la medicina para el COVID-19?
Pregunta 2:	¿Cuándo aprendió sobre la medicina tradicional?
Pregunta 3:	¿Cuáles son las plantas que utiliza en la preparación del jarabe para tratar el COVID-19?
Información sobre la planta medicinal	
Pregunta 4:	¿Con qué nombres se le conoce a la planta?
Pregunta 5:	¿Cómo reconocer a la planta (características de la planta)?
Pregunta 6:	¿La planta fue sembrada o creció de forma natural en el bosque?
Pregunta 7:	¿A qué hora cosechó la planta?
Pregunta 8:	¿La planta puede ser cosechar a cualquier hora del día, cuándo es mejor?
Pregunta 9:	¿Cómo estaba la planta cuando fue cosechada, de pie, caída, seca...?
Pregunta 10:	¿La planta estaba en flor, frutos o con semillas?
Pregunta 11:	¿Qué parte de la planta cosechó (hoja, raíz, tallo, corteza...)?
Pregunta 12:	¿Cómo cosechó la planta?
Pregunta 13:	¿La planta puede continuar viva luego de su cosecha?
Pregunta 14:	¿La planta se usa fresca (recién cosechada) o se deja secar?
Pregunta 15:	Si la respuesta anterior es seca ¿por cuánto tiempo se debe secar la planta?
Pregunta 16:	¿Cómo es el proceso de preparación de la medicina para el tratamiento de COVID-19?
Pregunta 17:	¿Cuáles son los usos medicinales que tiene la planta?
Observaciones:	

Realizado por: Pastuña, 2022.

Anexo 2. Sistematización de la información etnobotánica recopilada sobre las plantas usadas en preparados medicinales para el tratamiento del COVID-19.

Especie	Información	Comunidad Chuyayaku	Comunidad Nushinu Ishpinku	Comunidad Shiwa Kucha
<i>Aristolochia</i> sp.	Solvente:	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.	N/A	N/A
	*Parte:	Tallo/rama.	N/A	N/A
	Uso:	Dolor de estómago y fiebre.	N/A	N/A
	Nombre:	Zaragoza y Ulla Wanka Anku.	N/A	N/A
	+Fecha:	La madrugada del 26 de agosto de 2021.	N/A	N/A
	Observación:	La planta al momento de la cosecha estaba con flores. Los tallos/ramas pueden servir como semilla, pues si se los coloca bajo suelo crecerá una nueva planta. Existen cuatro tipos de plantas parecidos. Esta se diferencia de las demás en que el haz de las hojas es de color verde intenso, mientras que el envés es de coloración grisácea.	N/A	N/A
<i>Aspidosperma</i> sp.	Solvente:	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.	Mediante cocción en agua.
	*Parte:	Corteza de tallo.	Corteza de tallo.	Corteza de tallo.
	Uso:	Diarrea.	N/A	Diabetes, gastritis, paludismo y dolor del cuerpo.

	Nombre:	Challua Caspi.	Challua Caspi.	Challua Caspi o Challua Caspicara.
	*Fecha:	La madrugada del 26 de agosto de 2021.	La tarde del 1 de septiembre de 2021.	Al mediodía del 16 de agosto de 2021.
	Observación:	Se dice que a mayor cocción mejores propiedades medicinales. Ausencia de bejuco y/o liana que enrede esta planta.	El extracto de esta planta es muy agrio. Se puede usar la corteza seca, para ello se debe secar por alrededor 15 a 30 días. Pero, de preferencia se suele usar la corteza fresca. La diferencia entre corteza seca y fresca radica en la preparación. La corteza seca en contraste con la fresca se deja macerando en etanol o se cuece en agua por más tiempo. Las hojas de esta planta son parecidas a las hojas del cedro.	El árbol tenía alrededor de 15 a 20 metros de altura, con tallo cilíndrico y de hojas alargadas. El nombre común de esta planta se debe a la semejanza del tallo con las escamas de un pez del lugar (el pez es conocido como bocachico).
<i>Couroupita guianensis</i> Aubl.	Solvente:	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.	N/A	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.
	*Parte:	Corteza de tallo.	N/A	Corteza de tallo.
	Uso:	Desinflamatorio, cicatrizante de heridas superficiales y profundas (como operaciones).	N/A	Hipertensión arterial, dolores de cabeza, cuerpo y huesos (reumas).
	Nombre:	Lispungu y Sacha Mati Muyu.	N/A	Llustunda.
	*Fecha:	La mañana del 21 de septiembre de 2021.	N/A	La mañana (10:30 am) del 22 de septiembre de 2021.

	Observación:	La planta fue sembrada y al momento de su cosecha estaba en flor. No tiene bejuco y/o liana que enrede este árbol.	N/A	La planta fue sembrada y al momento de su cosecha estaba con frutos. La corteza de esta planta únicamente se ha utilizado en estado fresco. Es una planta de fácil reconocimiento, pues por lo general el tallo está cubierto de frutos redondos de gran tamaño.
<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf.	Solvente:	Mediante cocción en agua.	N/A	N/A
	*Parte:	Hojas.	N/A	N/A
	Uso:	Aromatizante.	N/A	N/A
	Nombre:	Hierbaluisa.	N/A	N/A
	*Fecha:	La mañana del 21 de septiembre de 2021.	N/A	N/A
	Observación:	Se dice que es Hierbaluisa medicinal porque sus hojas son anchas a diferencia de otras variedades de hojas delgadas.	N/A	N/A
<i>Monteverdia laevis</i> (Reissek)Biral.	Solvente:	N/A	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.
	*Parte:	N/A	Corteza de tallo.	Corteza de tallo.
	Uso:	N/A	Dolor abdominal y diarrea.	Purifica la sangre, cólicos, diarrea y dolor de cuerpo.
	Nombre:	N/A	Chuchuguaza y Curi Caspicara.	Chuchuguaza.
	*Fecha:	N/A	La tarde del 1 de septiembre de 2021.	La mañana (10h00 am) del 22 de septiembre de 2021.

	Observación:	N/A	Esta planta es un árbol grande. El nombre común "Curi Caspicara" se debe a la coloración amarillenta del tallo. En la preparación medicinal comúnmente se usa la corteza fresca y se prefiere maceración en etanol antes que cocción en agua. Por otro lado, la ventaja de la una corteza seca es que se puede conservar por largo tiempo. La planta puede ser reconocida porque su tallo es de color amarillo.	Se reconocen dos variedades de <i>M. laevis</i> . Planta hembra y macho, la primera es de corteza delgada y la segunda de corteza gruesa. En la medicina tradicional se usa el árbol de corteza gruesa (planta macho). La corteza seca se puede conservar durante años. Para reconocer esta planta se realiza un corte en el tallo, el cual será de una coloración rojiza. La otra manera de identificación es mediante su sabia, esta será de un sabor muy amargo.
<i>Myroxylon balsamum</i> Harms.	Solvente:	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.	N/A
	*Parte:	Corteza de tallo.	Corteza de tallo.	N/A
	Uso:	Fiebre, mareo, tos y dolor del cuerpo.	Gripe (expulsa el moco y libera los pulmones).	N/A
	Nombre:	Bálsamo e Isturaki.	Bálsamo.	N/A
	*Fecha:	La madrugada del 26 de agosto de 2021.	La tarde del 1 de septiembre de 2021.	N/A
	Observación:	Es un árbol grande, recto y con ramas en la copa del tallo. Esta planta fue cultivada por el sabio Edgar Vargas. A esta planta no se	Esta planta fue cultivada por el sabio Hector Lopez. Se prefiere usar la corteza fresca en los preparados medicinales. La planta puede ser reconocida por su tallo	N/A

		le ha visto enredada con bejucos y/o lianas.	de color blanco y por tener hojas semejantes a la Guayusa.	
<i>Ocotea quixos</i> (Lam.)Kosterm.	Solvente:	N/A	N/A	Mediante cocción en agua.
	*Parte:	N/A	N/A	Hojas.
	Uso:	N/A	N/A	Aromatizante.
	Nombre:	N/A	N/A	Ishpingo.
	+Fecha:	N/A	N/A	Al mediodía del 22 de septiembre de 2021.
	Observación:	N/A	N/A	Es un condimento gastronómico en el preparado medicinal.
<i>Piper</i> sp.	Solvente:	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.	N/A	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.
	*Parte:	Hojas.	N/A	Hojas.
	Uso:	N/A	N/A	Descongestionante nasal (mediante vaporizaciones), dolor de garganta, fiebre y escalofríos.
	Nombre:	Mático.	N/A	Mático.
	+Fecha:	La mañana del 21 de septiembre de 2021.	N/A	La mañana del 22 de septiembre de 2021.
	Observación:	N/A	N/A	N/A
<i>Protium sagotianum</i> Marchand.	Solvente:	N/A	Macerado en etanol.	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.
	*Parte:	N/A	Corteza de tallo.	Corteza de tallo.
	Uso:	N/A	Dolor abdominal y del cuerpo.	Dolor abdominal.
	Nombre:	N/A	Animi.	Animi.

	+Fecha:	N/A	La mañana del 21 de septiembre de 2021.	La mañana (10h30 am) del 22 de septiembre de 2021.
	Observación:	N/A	Se recomienda una semana de macerado. La corteza seca se puede conservar indefinidamente. El preparado medicinal (cocción o macerado) con corteza fresca suele ser inmediato, alrededor de una hora. La corteza extraída tiene un aroma a menta/mentol. La forma de la hoja de esta planta es semejante a la del cedro, pero en menor tamaño.	La corteza extraída fue de un árbol de gran tamaño. Esta planta presenta un olor característico (aromático).
<i>Sloanea synandra</i> Spruce ex Benth.	Solvente:	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.	N/A	N/A
	*Parte:	Corteza de tallo.	N/A	N/A
	Uso:	Cansancio.	N/A	N/A
	Nombre:	Runa Caspi y Mamey.	N/A	N/A
	+Fecha:	La madrugada del 26 de agosto de 2021.	N/A	N/A
	Observación:	Árbol cultivado por el sabio Edgar Vargas. Al momento de la cosecha la planta estaba botando las primeras semillas. Es una planta difícil de conseguir y por lo general crece muy alejada de las comunidades. La corteza fresca	N/A	N/A

		de esta planta es consumida en ayunas, se bebe el zumo obtenido del lado interno de la corteza (lado de la corteza pegada al tallo). El árbol es frondoso en su copa (de un color amarillento) con hojas anchas y alargadas.		
<i>Tynanthus panurensis</i> (Bureau) Sandwith.	Solvente:	N/A	N/A	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.
	*Parte:	N/A	N/A	Corteza de tallo.
	Uso:	N/A	N/A	Antitumoral (cáncer de mama) y dolor del cuerpo.
	Nombre:	N/A	N/A	Musuwuaska.
	+Fecha:	N/A	N/A	N/A
	Observación:	N/A	N/A	Esta planta es un bejuco y/o liana. Se reconocen dos tipos, planta hembra y macho. La corteza del tallo es de aroma dulce.
N/A	Solvente:	N/A	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.	N/A
	*Parte:	N/A	Tallo/rama.	N/A
	Uso:	N/A	Riñones.	N/A
	Nombre:	N/A	Anís de monte.	N/A
	+Fecha:	N/A	N/A	N/A
	Observación:	N/A	Es una planta difícil de conseguir.	N/A

N/A	Solvente:	Mediante cocción en agua o macerado en etanol.	N/A	N/A
	*Parte:	Corteza de tallo.	N/A	N/A
	Uso:	Fiebre.	N/A	N/A
	Nombre:	Intiangu.	N/A	N/A
	*Fecha:	La madrugada del 26 de agosto de 2021.	N/A	N/A
	Observación:	Es una planta que se podría catalogar como bejuco y/o liana. No se utiliza todo el bejuco, se utiliza únicamente la corteza. Se caracteriza por enredar árboles grandes. Las ramas emergen del centro del bejuco, las hojas son redondeadas y de color verde intenso.	N/A	N/A

*Estructura morfológica de la planta usada en preparados medicinales; *Fecha de recolección de la estructura morfológica de la planta. N/A, no aplica. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

Anexo 3. Secado bajo sombra de las estructuras morfológicas de las plantas usadas en preparados medicinales para el tratamiento del COVID-19.



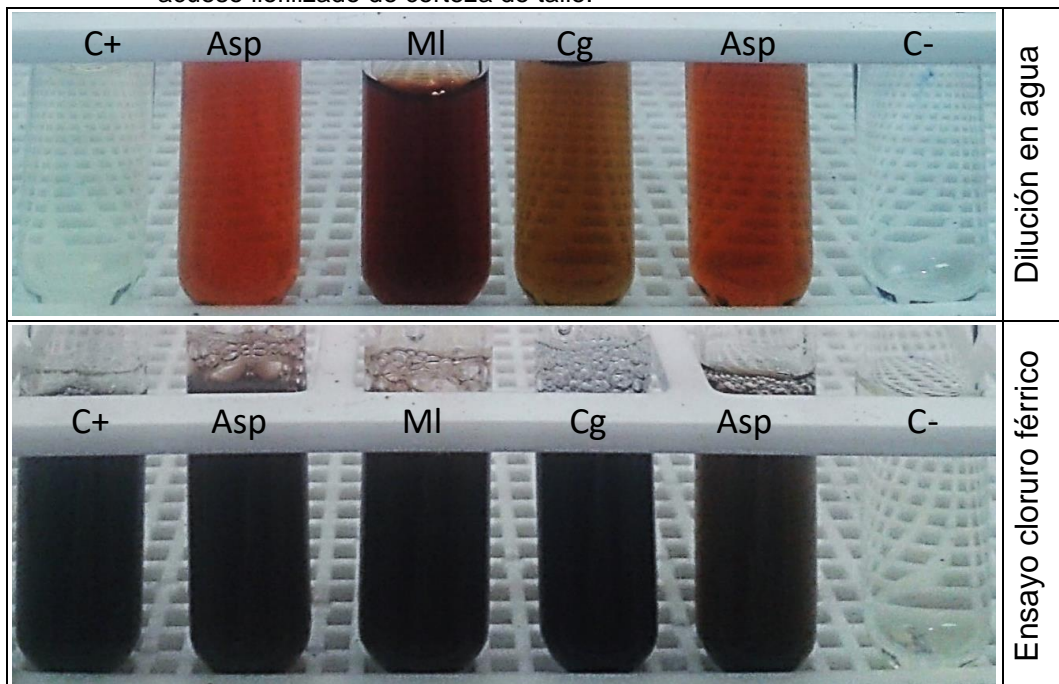
Realizado por: Pastuña, 2022.

Anexo 4. Ensayo NaOH/HCl y Shinoda para la determinación de flavonoides en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo.

Ensayo NaOH/HCl		Dilución en NaOH
		Gotas de HCl
Ensayo Shinoda		Alcohol isoamílico

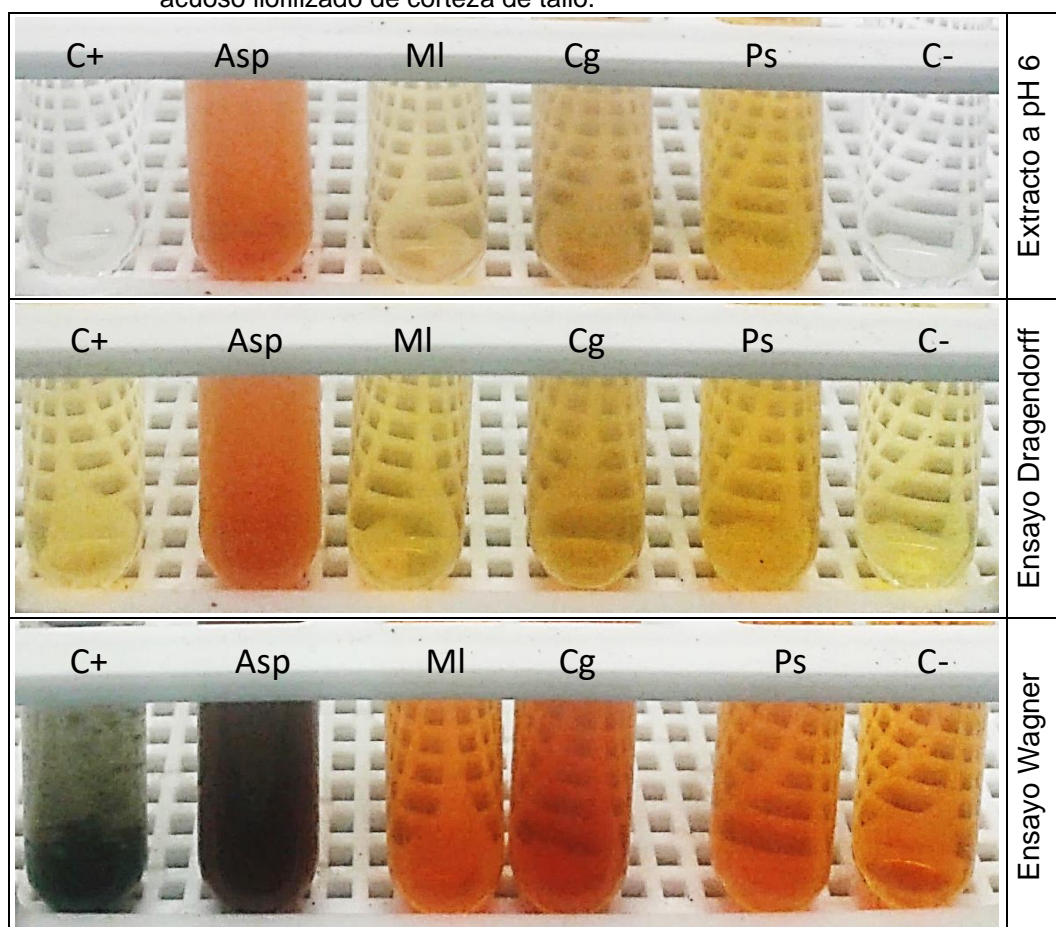
Donde, C+, control positivo de Quercetina para flavonoides, Asp, *Aspidosperma* sp., Ps, *P. sagotianum*, MI, *M. laevis*, Cg, *C. guianensis*. y C-, blanco control agua destilada. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

Anexo 5. Ensayo cloruro férrico (FeCl_3) para la determinación de polifenoles en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo.



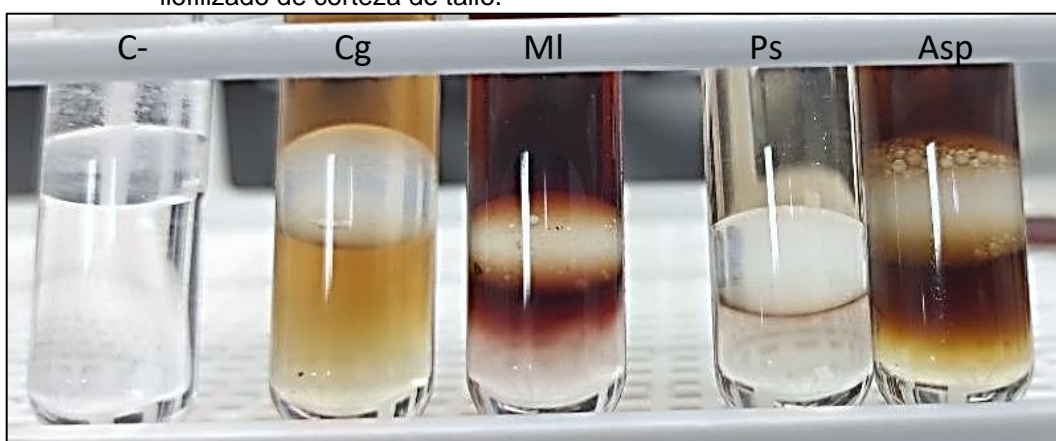
Donde, C+, control positivo de Quercetina, Asp, *Aspidosperma* sp., Ps, *P. sagotianum*, MI, *M. laevis*, Cg, *C. guianensis*. y C-, blanco control agua destilada. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

Anexo 6. Ensayo Dragendorff y Wagner para la determinación de alcaloides en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo.



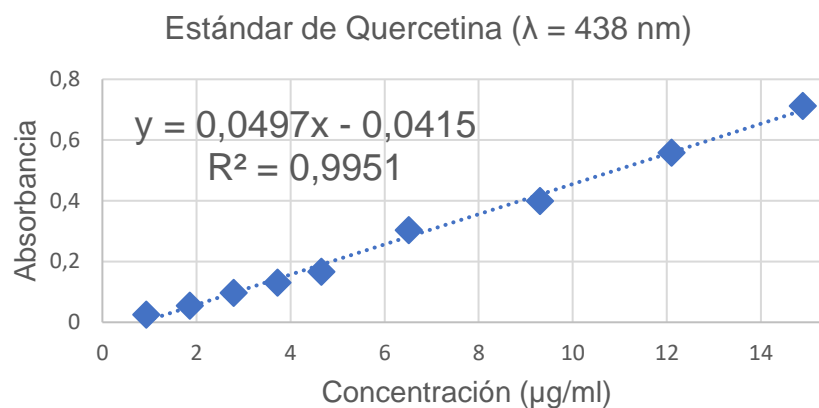
Donde, C+, control positivo de Atropina para alcaloides, Asp, *Aspidosperma* sp., MI, *M. laevis*, Cg, *C. guianensis*, Ps, *P. sagotianum* y C-, blanco control agua destilada. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

Anexo 7. Ensayo Salkowski para la determinación de terpenoides en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo.



Donde, C-, blanco control agua destilada, Cg, *C. guianensis*, MI, *M. laevis*, Ps, *P. sagotianum* y Asp, *Aspidosperma* sp. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

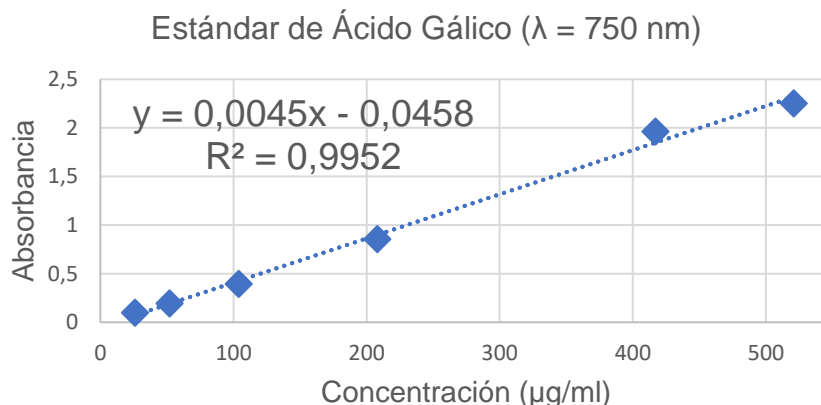
Anexo 8. Curva de calibración de Quercetina para cuantificación de flavonoides totales presentes en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de las plantas del cantón Arajuno.



Muestra (especie)	Absorbancia ($\lambda = 438 \text{ nm}$)	Flavonoides ($\mu\text{g/ml}$)	Flavonoides ($\mu\text{g FTQ/mg-EAL}$)
<i>Aspidosperma</i> sp.	$0,29 \pm 0,01$	$6,7 \pm 0,1$	$0,79 \pm 0,01$
<i>C. guianensis</i>	$0,48 \pm 0,01$	$10,4 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,1$
<i>M. laevis</i>	$0,21 \pm 0,02$	$5,1 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,1$
<i>P. sagotianum</i>	$0,16 \pm 0,01$	$4,0 \pm 0,1$	$0,82 \pm 0,04$

En todos los casos el resultado fue expresado como el promedio de tres repeticiones y desviación estándar ($\bar{x} \pm \sigma$). Donde, FTQ, flavonoides totales con base en Quercetina y EAL, extracto acuoso liofilizado. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

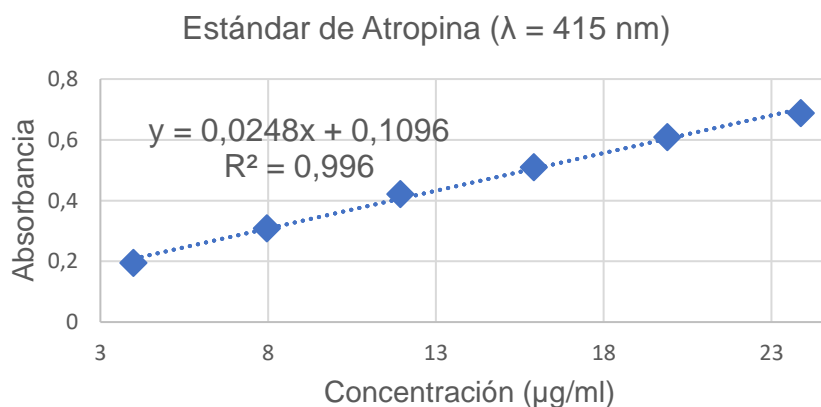
Anexo 9. Curva de calibración de Ácido Gálico para cuantificación de polifenoles totales presentes en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de las plantas del cantón Arajuno.



Muestra (especie)	Absorbancia ($\lambda = 750 \text{ nm}$)	Polifenoles ($\mu\text{g/ml}$)	Polifenoles ($\mu\text{g PTAG/mg-EAL}$)
<i>Aspidosperma</i> sp.	$0,65 \pm 0,01$	154 ± 3	$38,4 \pm 0,6$
<i>C. guianensis</i>	$0,40 \pm 0,02$	99 ± 3	213 ± 7
<i>M. laevis</i>	$0,40 \pm 0,01$	99 ± 3	135 ± 4
<i>P. sagotianum</i>	$0,27 \pm 0,01$	69 ± 3	56 ± 2

En todos los casos el resultado fue expresado como el promedio de tres repeticiones y desviación estándar ($\bar{X} \pm \sigma$). Donde, PTAG, polifenoles totales con base en Ácido Gálico y EAL, extracto acuoso liofilizado. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

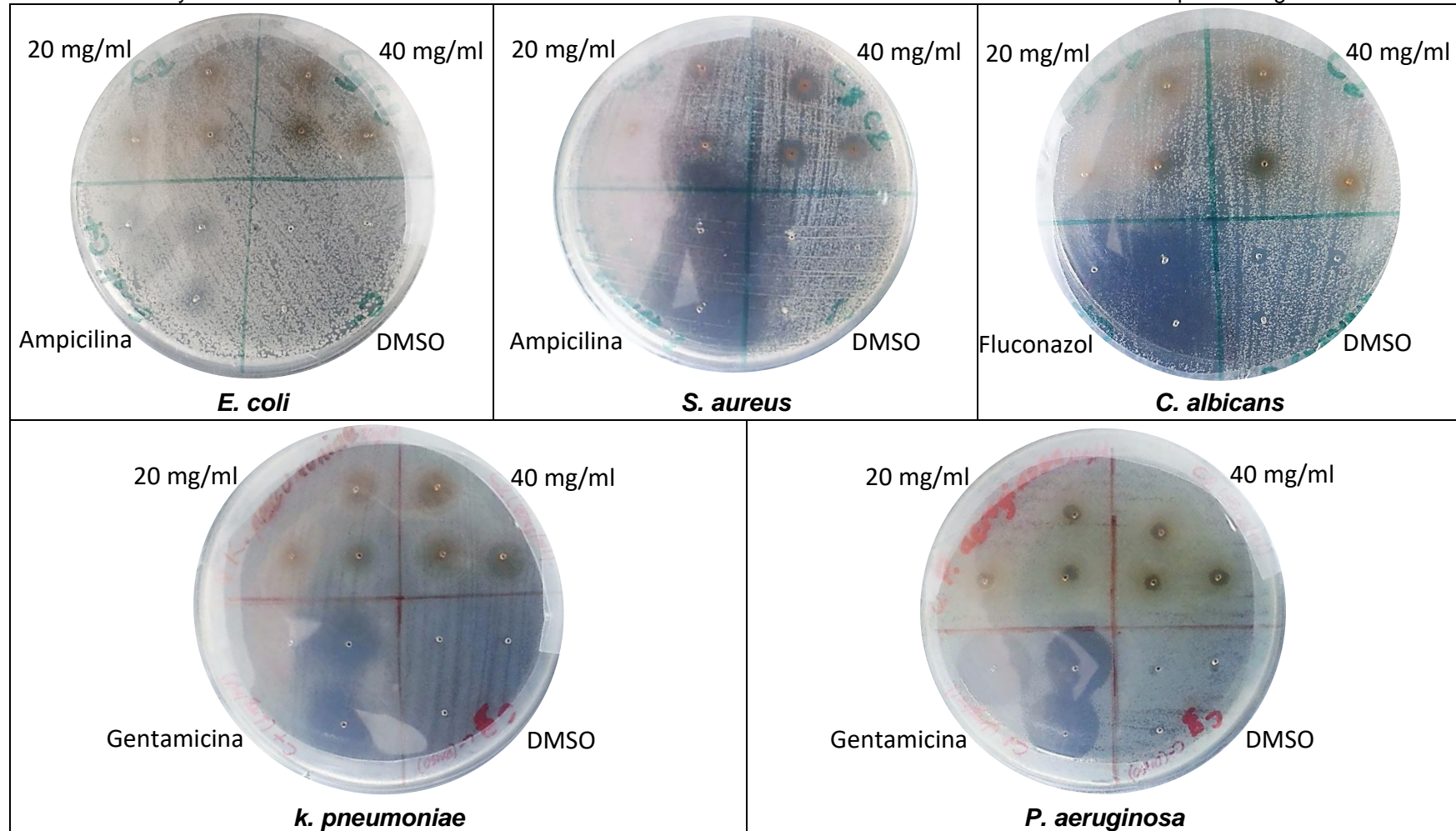
Anexo 10. Curva de calibración de Atropina para cuantificación de alcaloides totales presentes en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de las plantas del cantón Arajuno.



Muestra (especie)	Absorbancia ($\lambda = 415 \text{ nm}$)	Alcaloides ($\mu\text{g/ml}$)	Alcaloides ($\mu\text{g ATA/mg-EAL}$)
<i>Aspidosperma</i> sp.	$0,477 \pm 0,002$	$14,81 \pm 0,09$	$18,54 \pm 0,07$

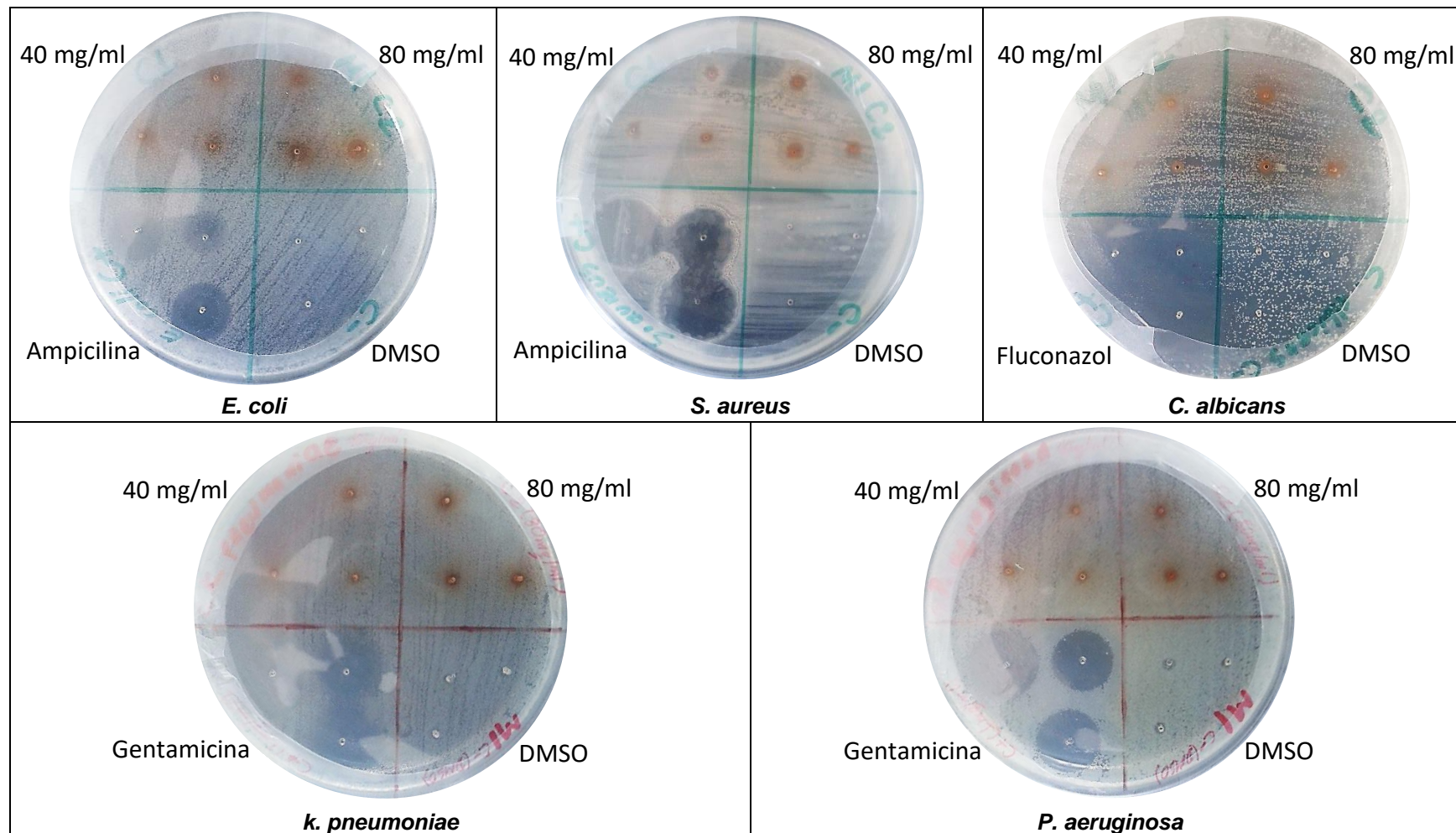
En todos los casos el resultado fue expresado como el promedio de tres repeticiones y desviación estándar ($\bar{X} \pm \sigma$). Donde, ATA, alcaloides totales con base en Atropina y EAL, extracto acuoso liofilizado. **Realizado por:** Pastuña, 2022.

Anexo 11. Ensayo antimicrobiano mediante halos de inhibición de extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de la planta *C. guianensis*.



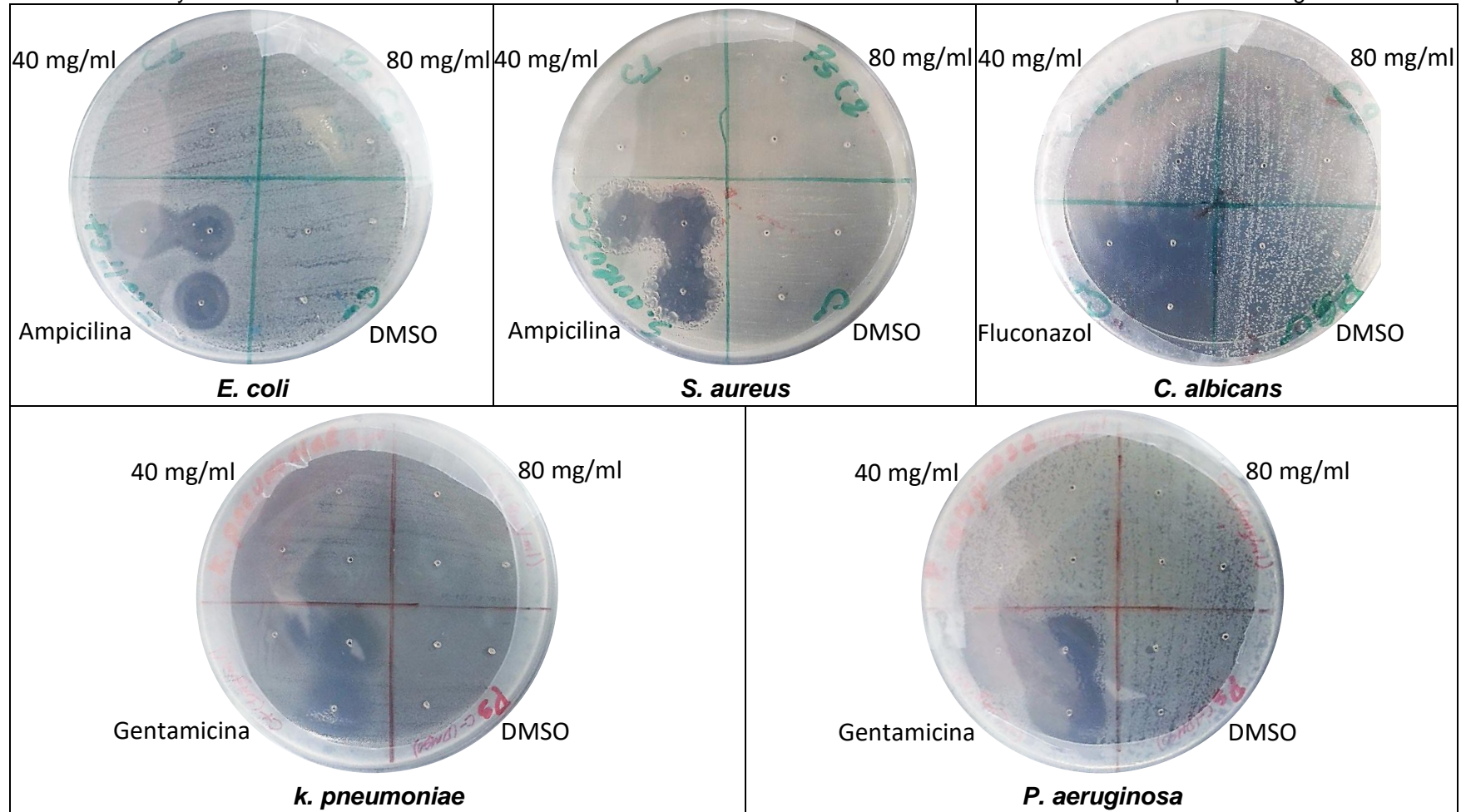
Realizado por: Pastuña, 2022.

Anexo 12. Ensayo antimicrobiano mediante halos de inhibición de extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de la planta *M. laevis*.



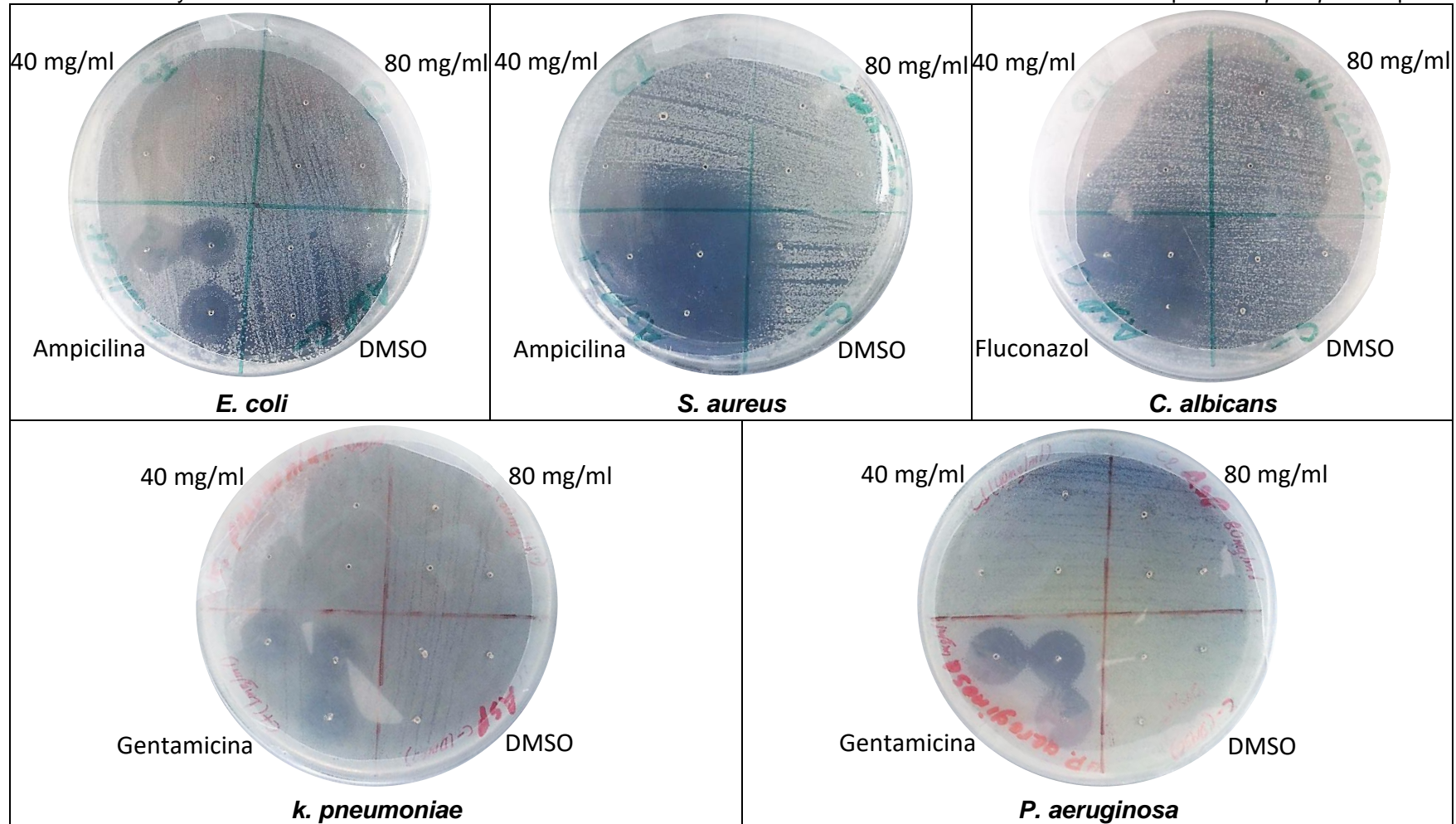
Realizado por: Pastuña, 2022.

Anexo 13. Ensayo antimicrobiano mediante halos de inhibición de extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de la planta *P. sagotianum*.



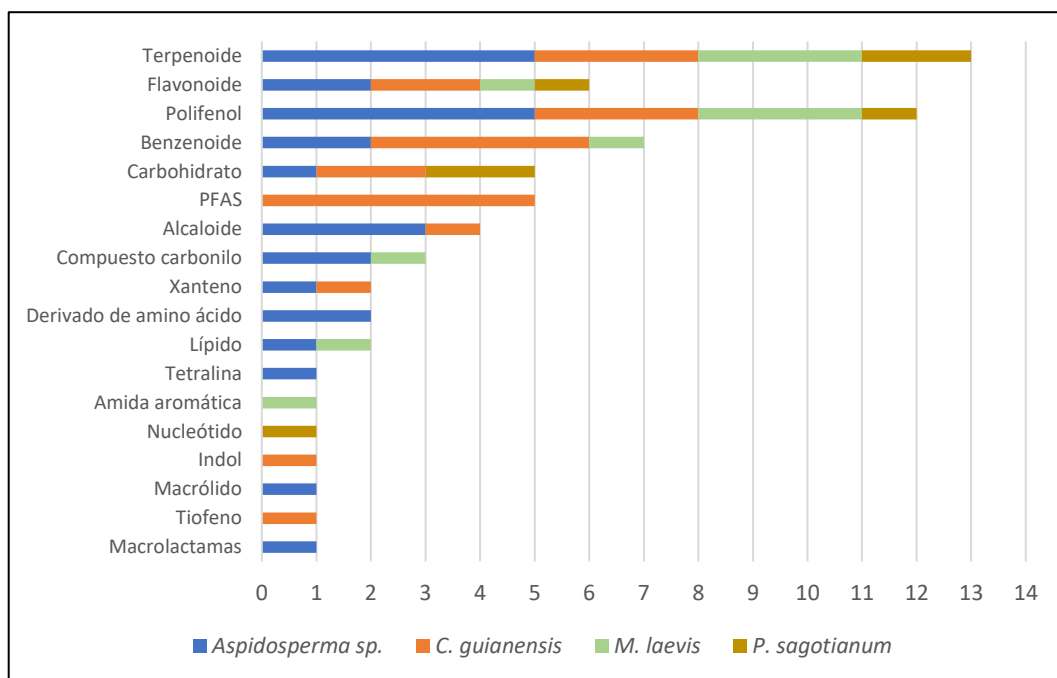
Realizado por: Pastuña, 2022.

Anexo 14. Ensayo antimicrobiano mediante halos de inhibición de extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de la planta *Aspidosperma* sp.



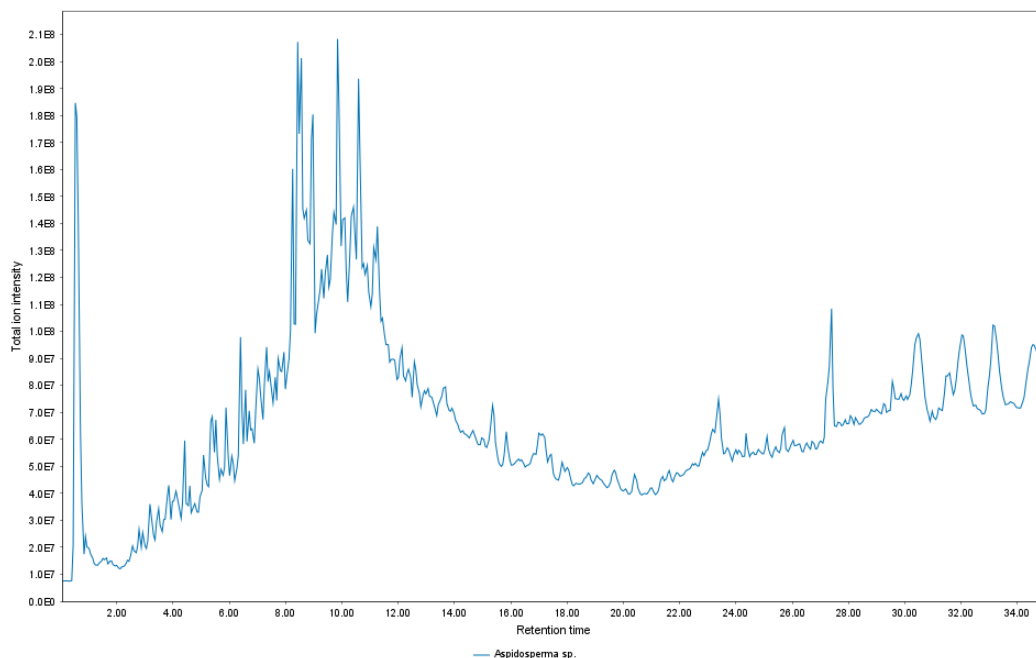
Realizado por: Pastuña, 2022.

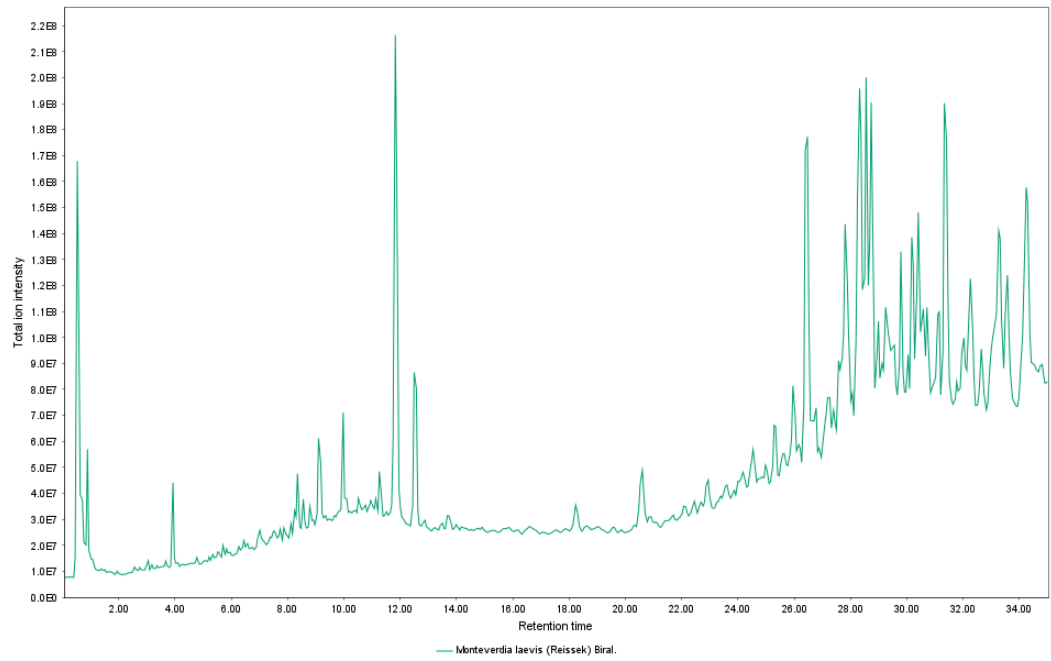
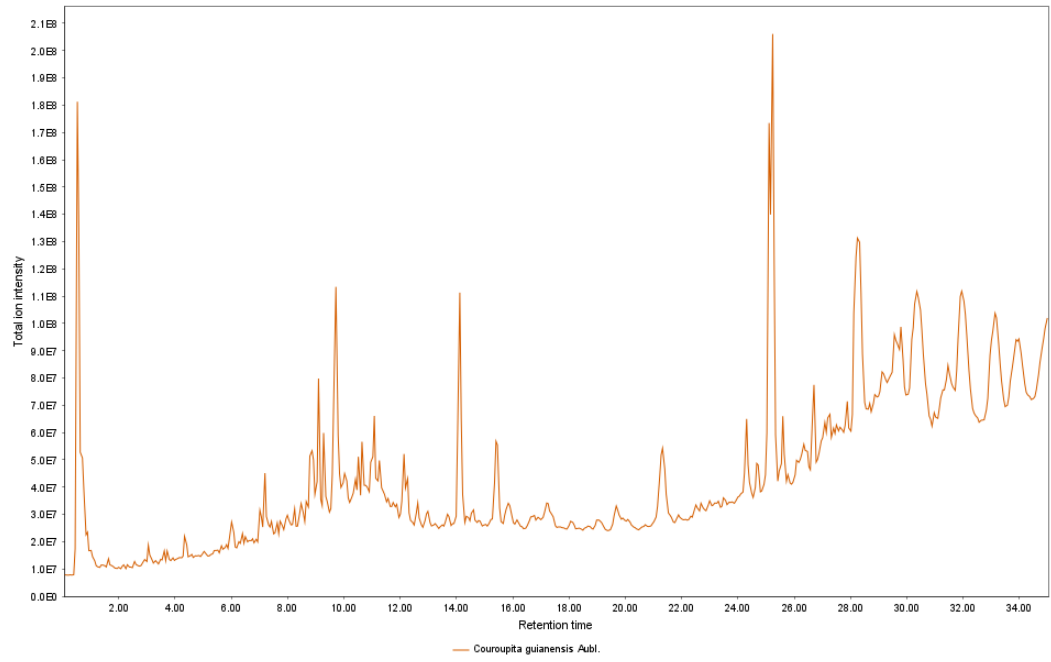
Anexo 15. Grupos de metabolitos presentes en extracto acuoso liofilizado de corteza de tallo de plantas usadas en preparados medicinales para el tratamiento de COVID-19.

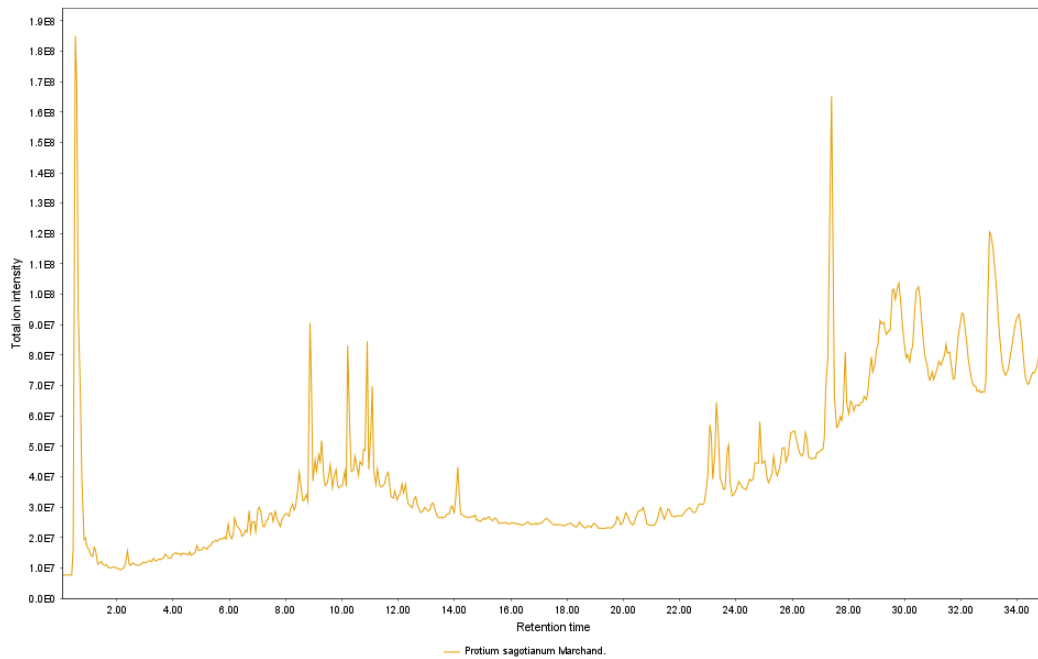


Realizado por: Pastuña, 2022.

Anexo 16. Cromatograma de Iones Totales (TIC) de las 4 plantas del cantón Arajuno usadas en preparados medicinales para el tratamiento del COVID-19 obtenidos en UPLC-MS/MS.

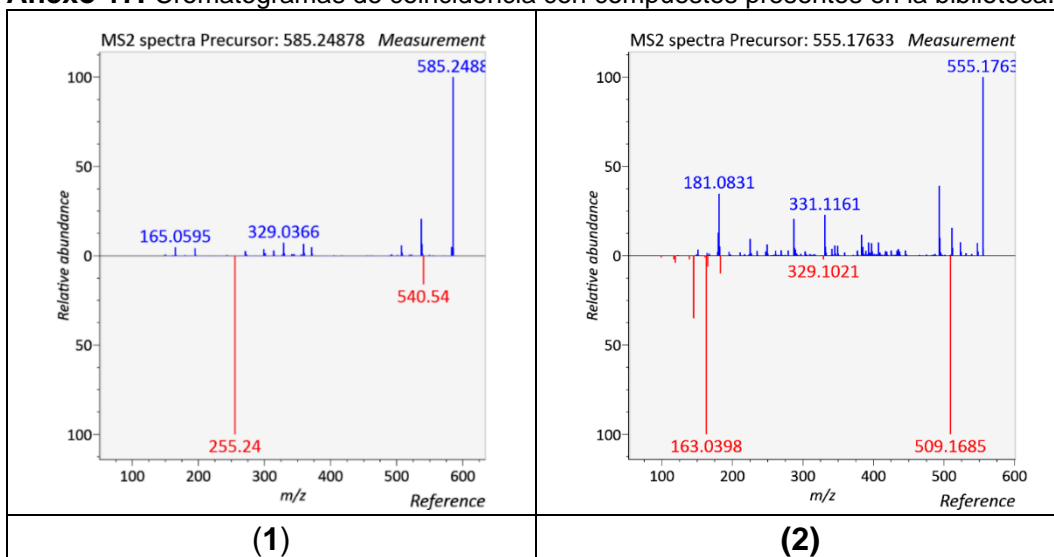


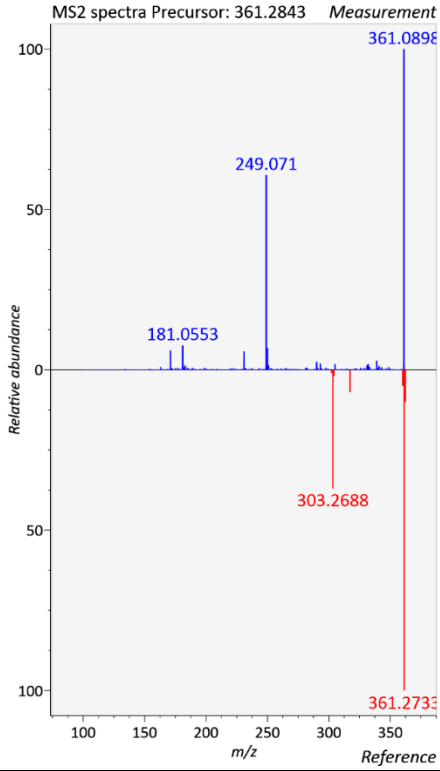




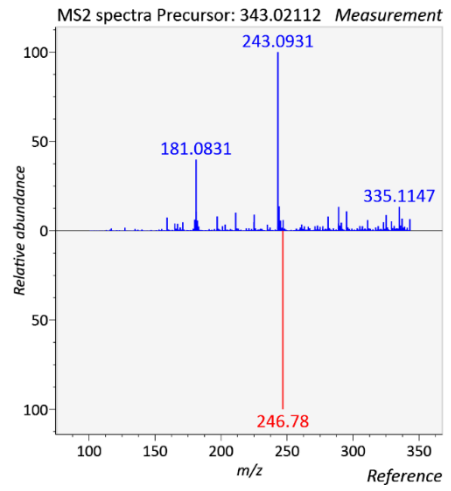
Realizado por: Pastuña, 2022.

Anexo 17. Cromatogramas de coincidencia con compuestos presentes en la biblioteca.

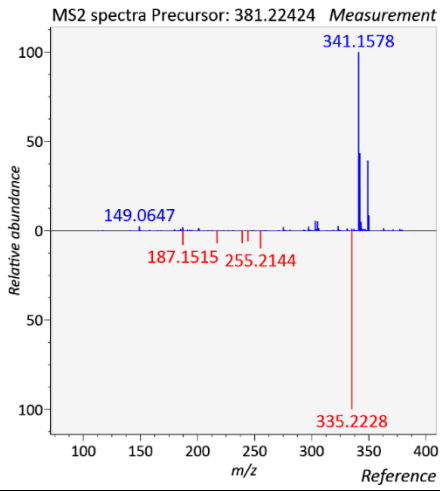




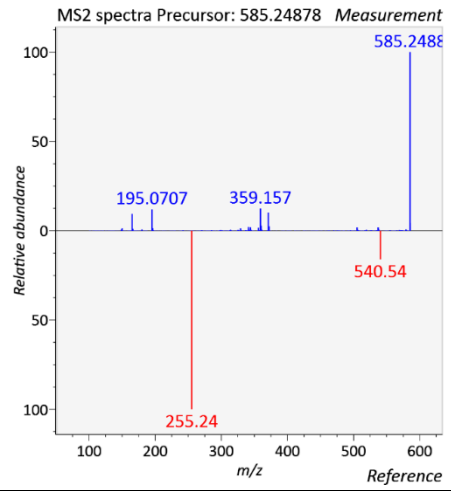
(3)



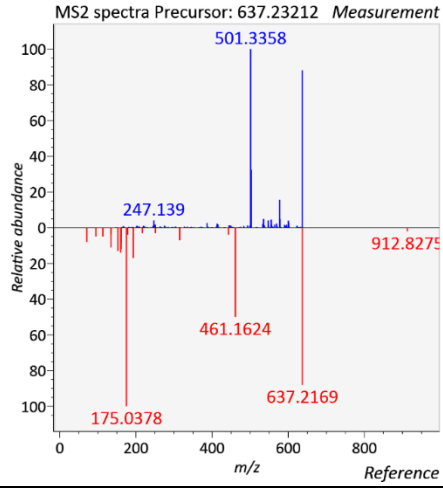
(4)



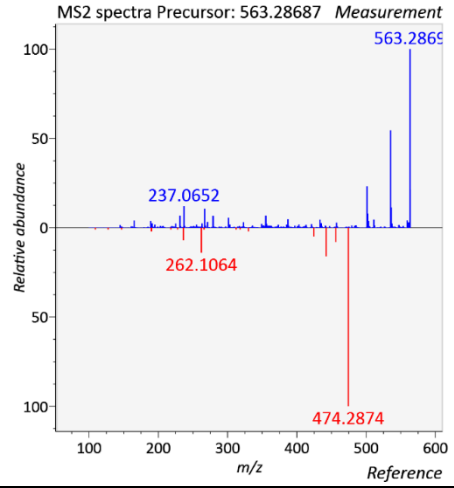
(5)



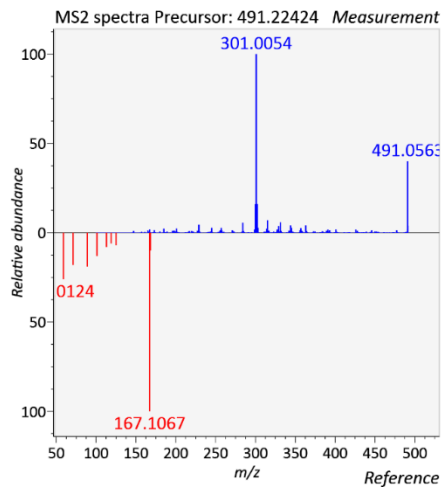
(6)



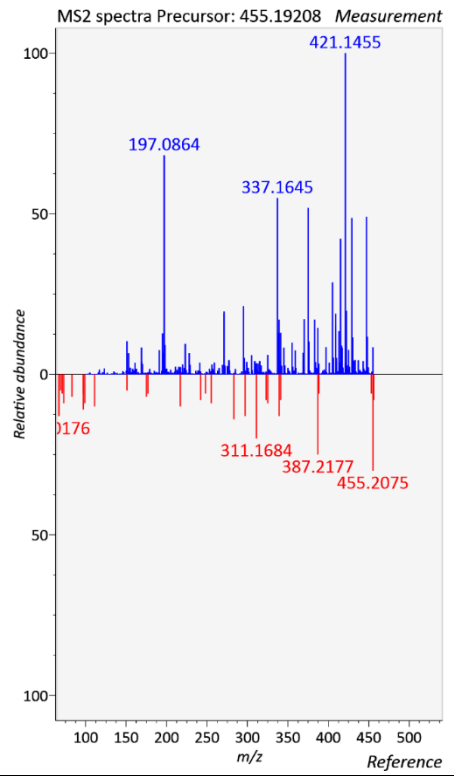
(7)



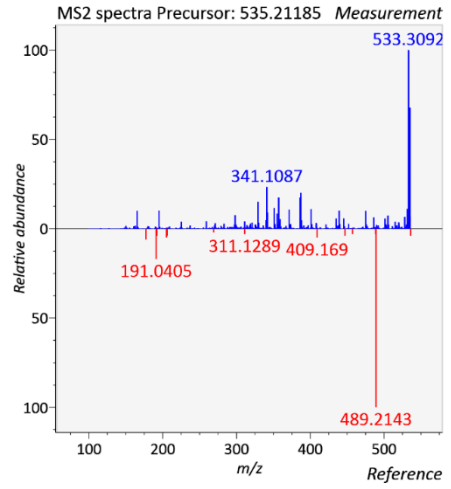
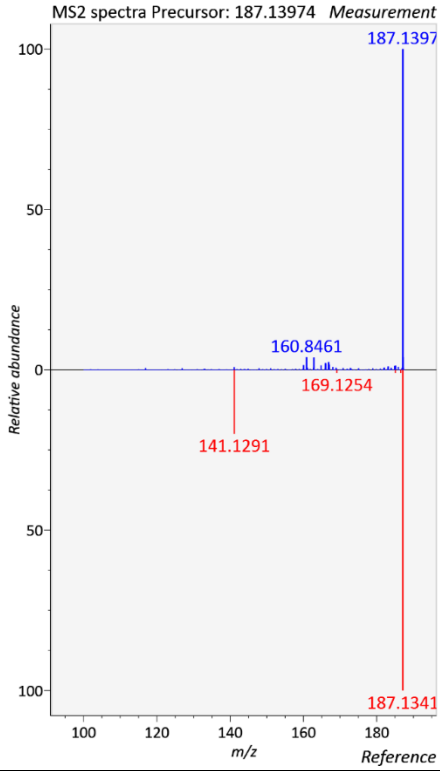
(8)



(9)

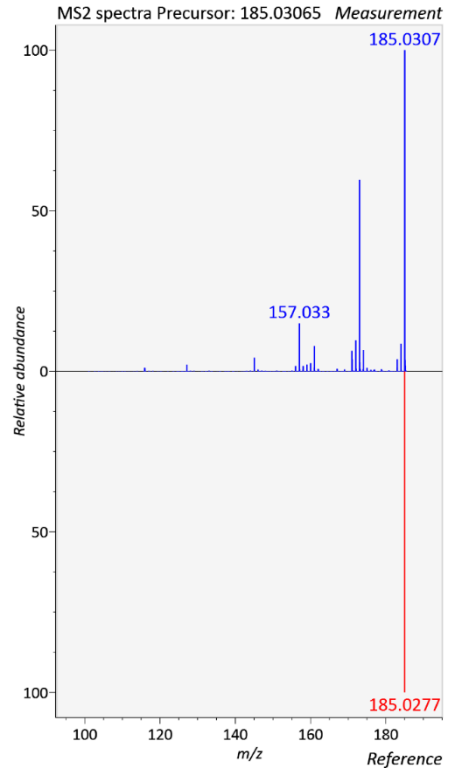
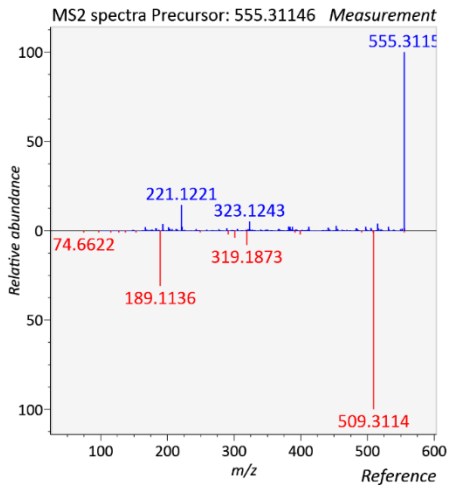


(10)



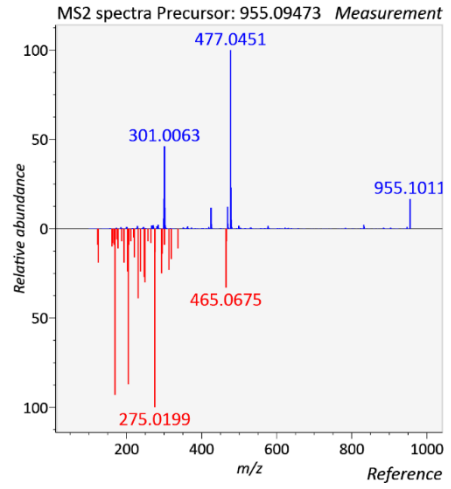
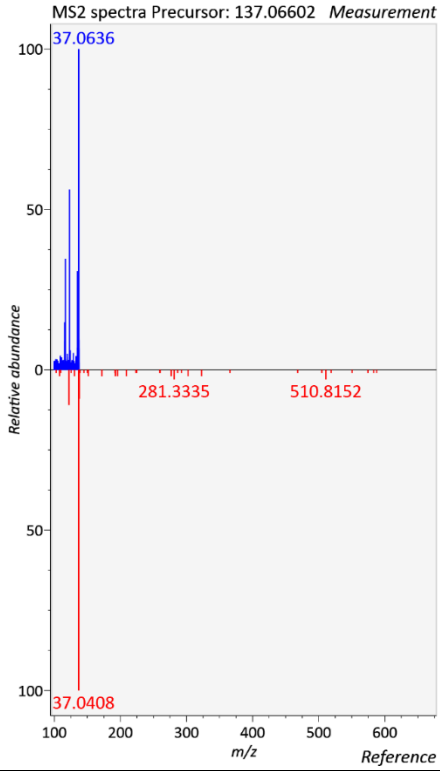
10-Hydroxydecanoic acid (11)

(12)



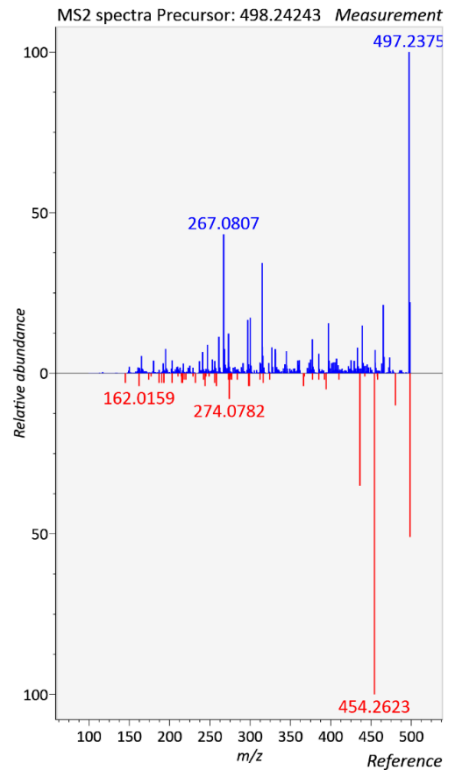
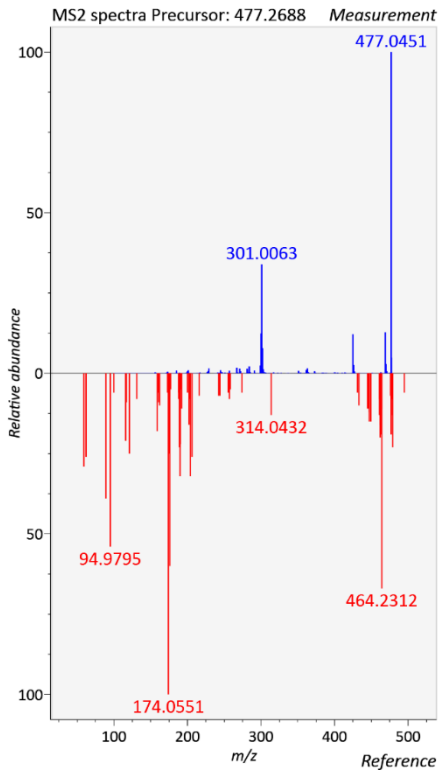
(13)

(14)



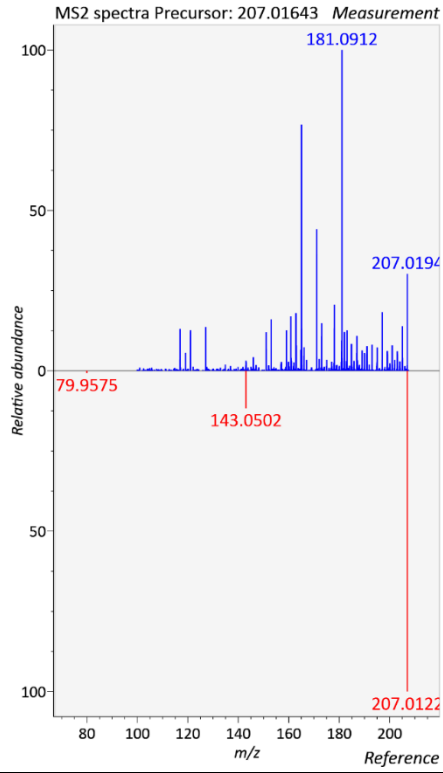
2,5-Dimethylresorcinol (15)

(16)

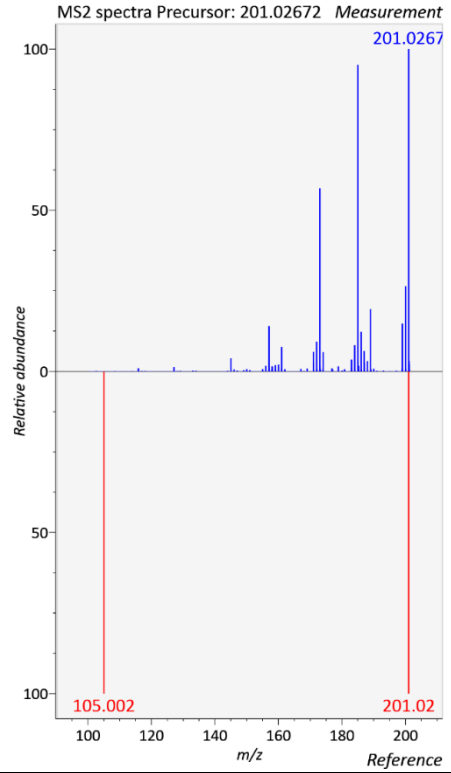


(17)

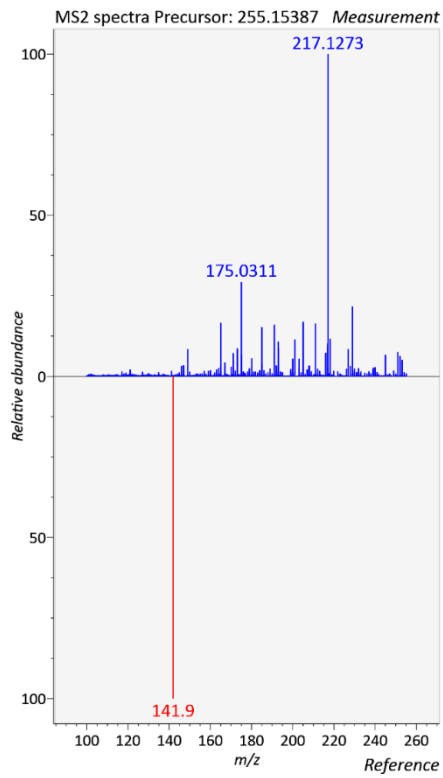
(18)



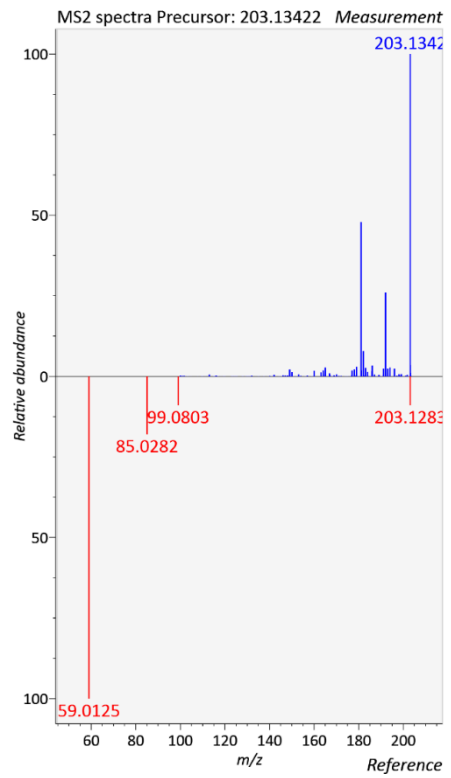
(19)



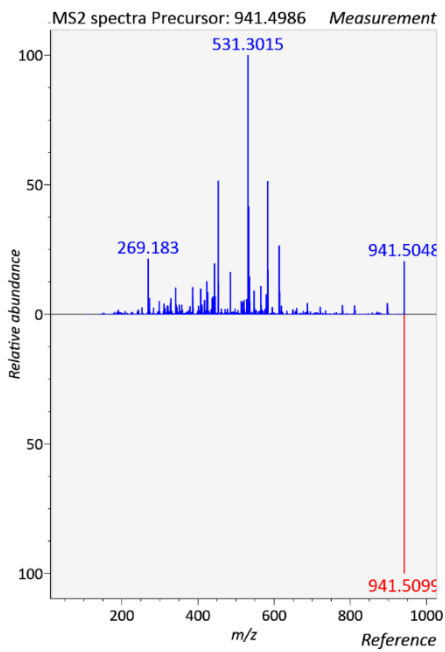
(20)



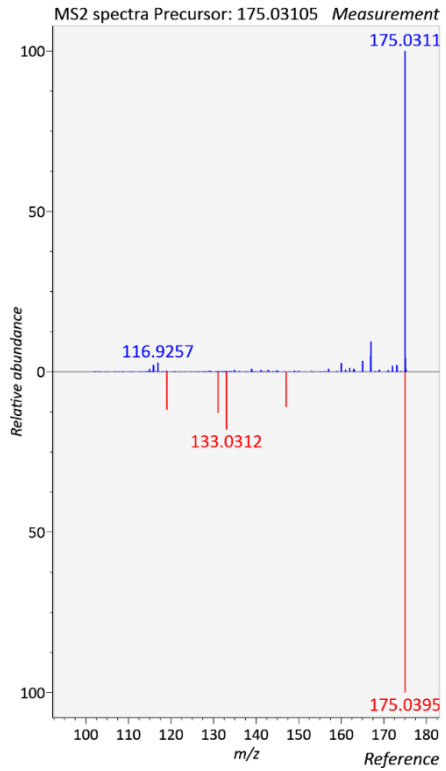
(21)



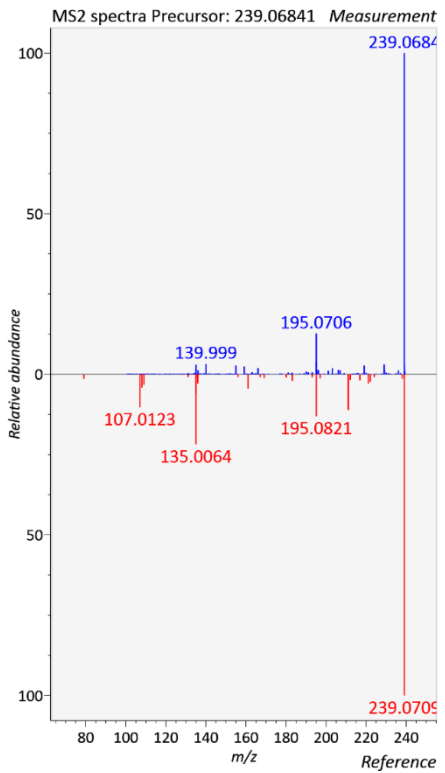
(22)



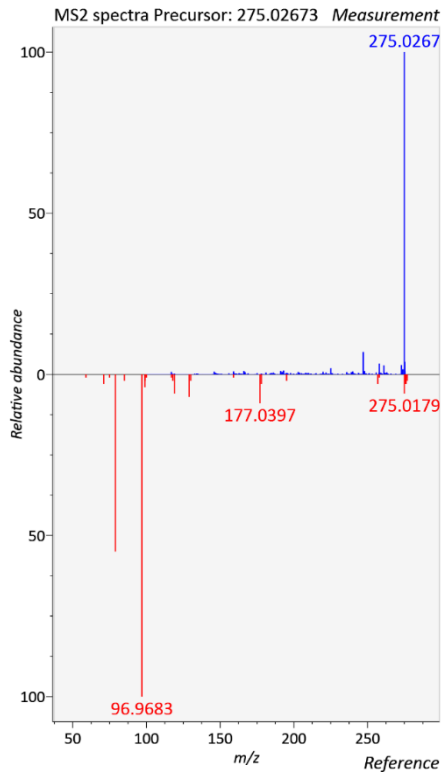
(23)



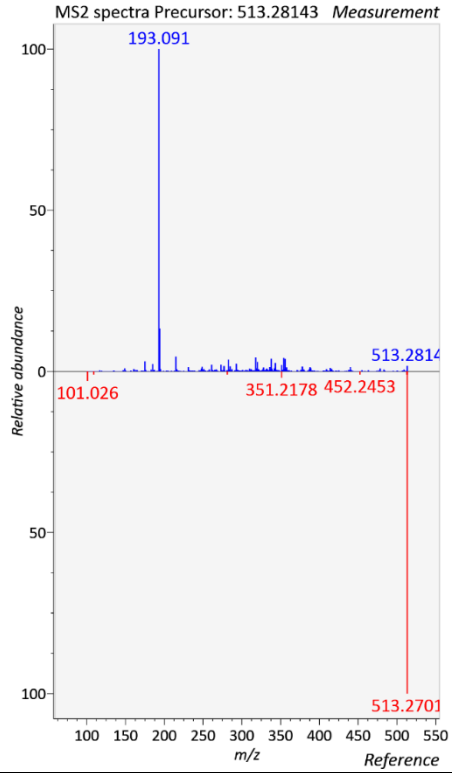
(24)



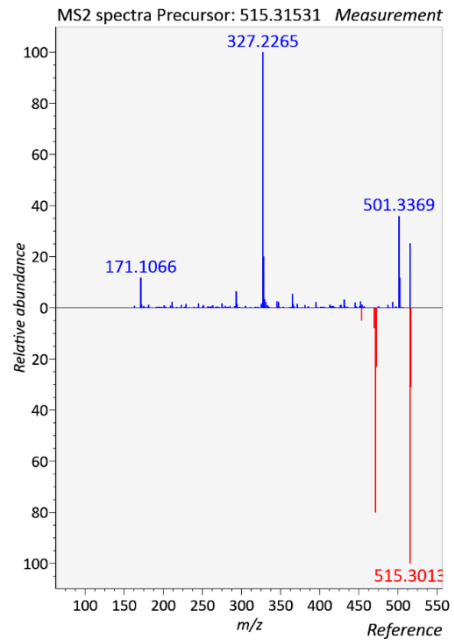
(25)



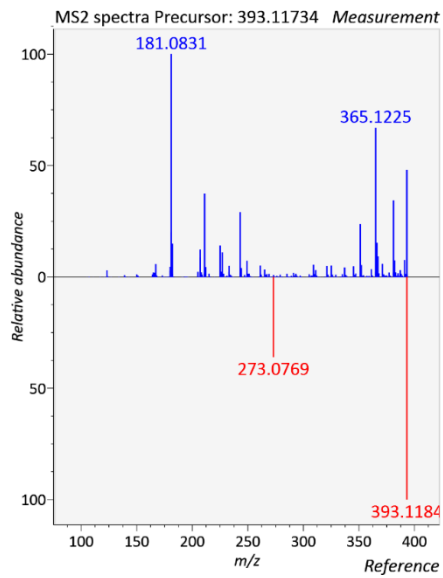
(26)



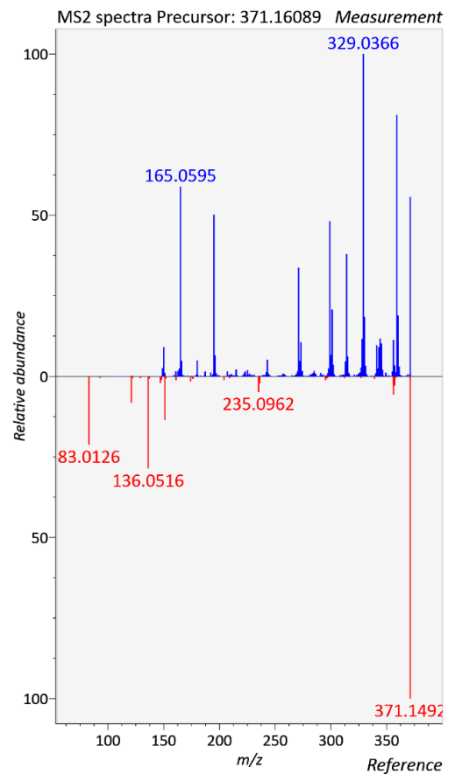
(27)



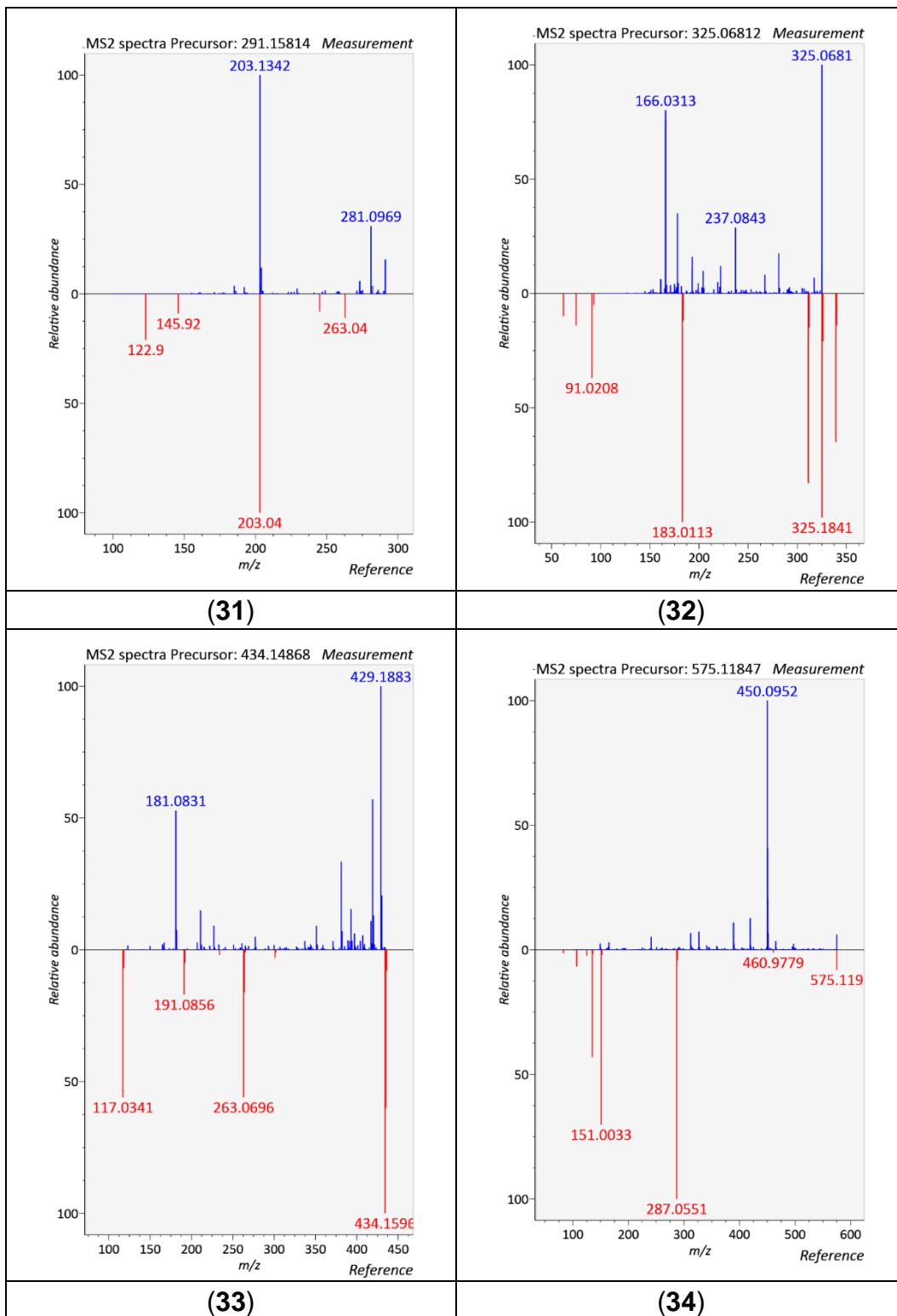
(28)

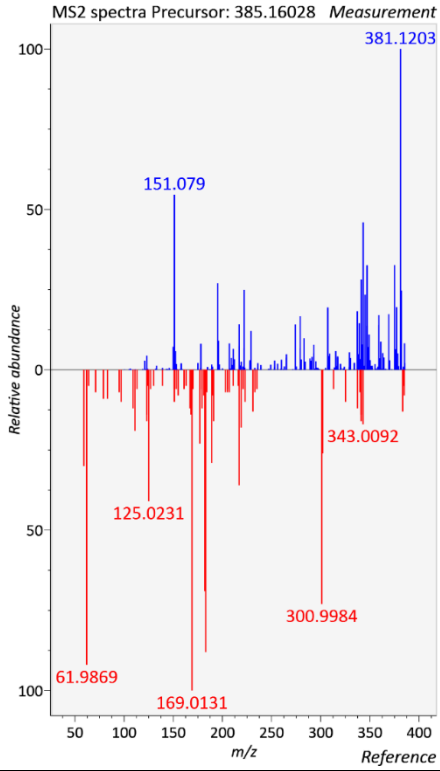


(29)

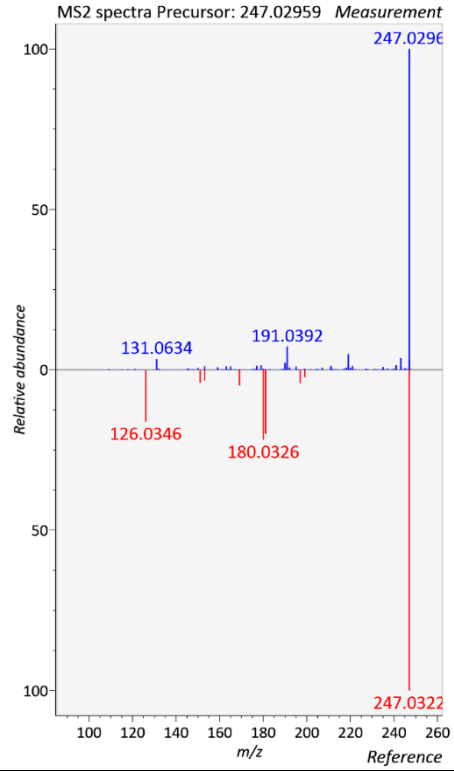


(30)

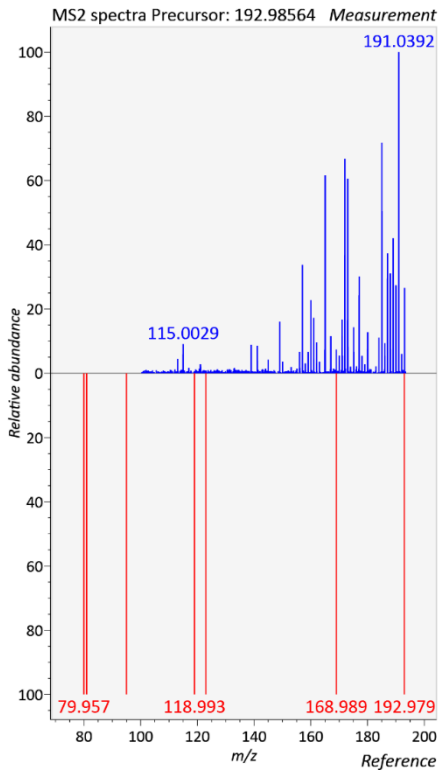




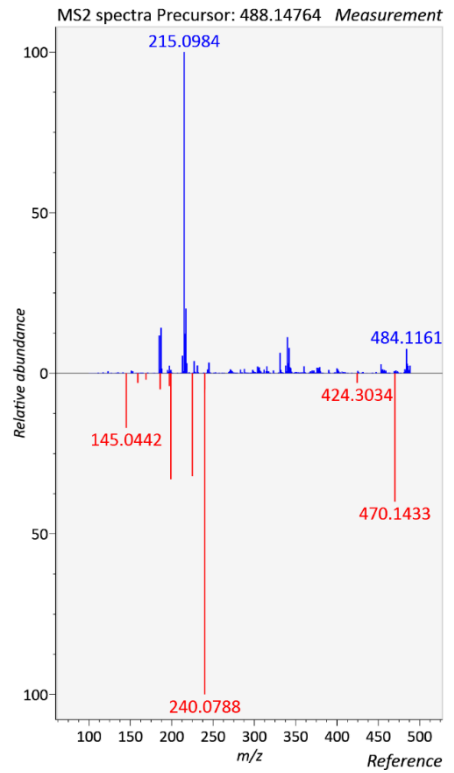
(35)



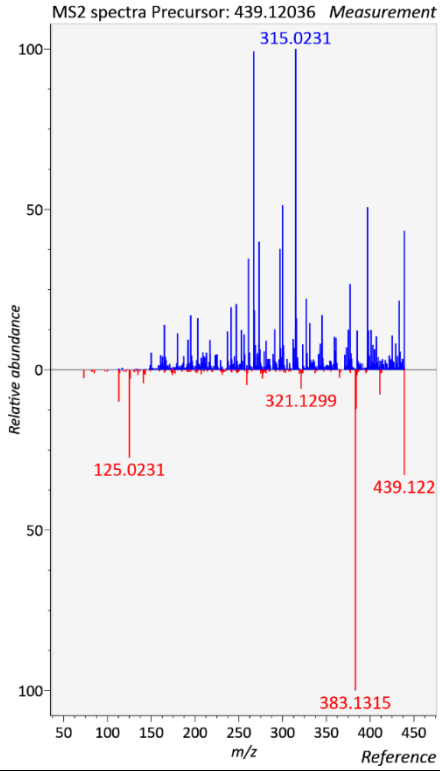
(36)



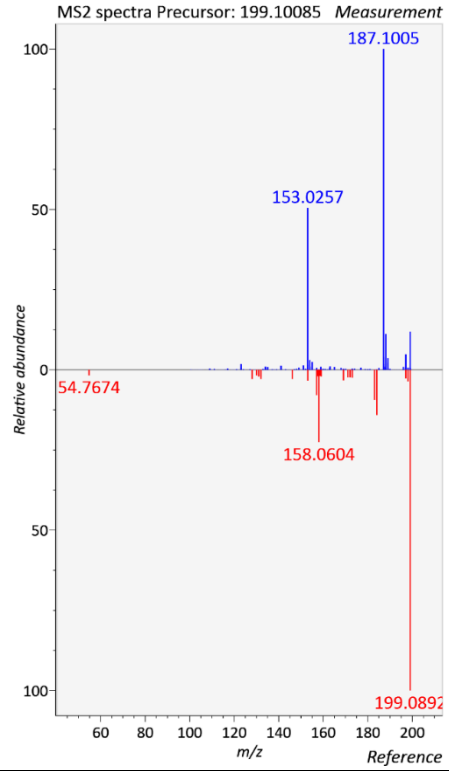
(37)



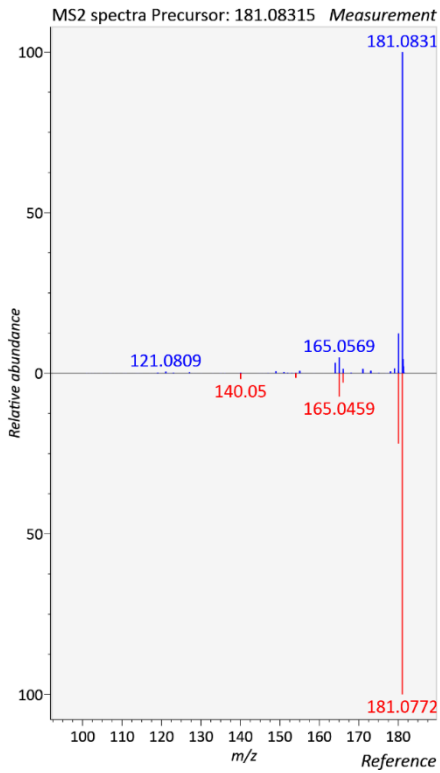
(38)



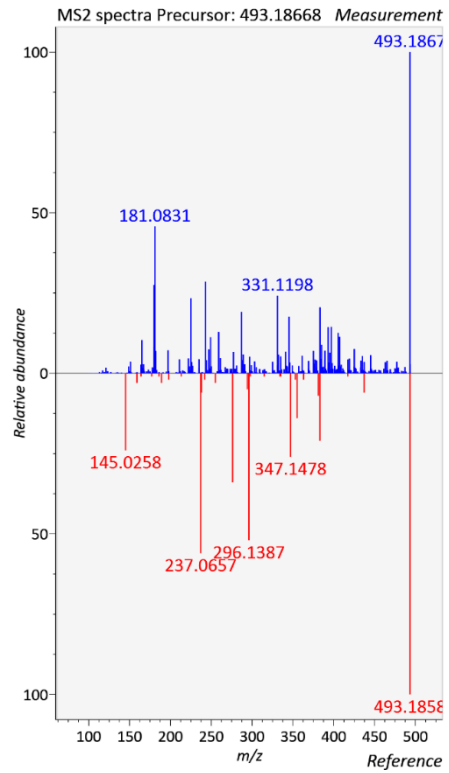
(39)



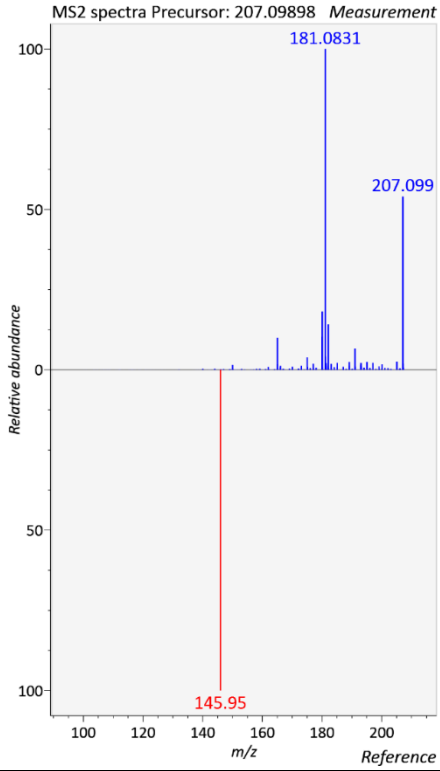
(40)



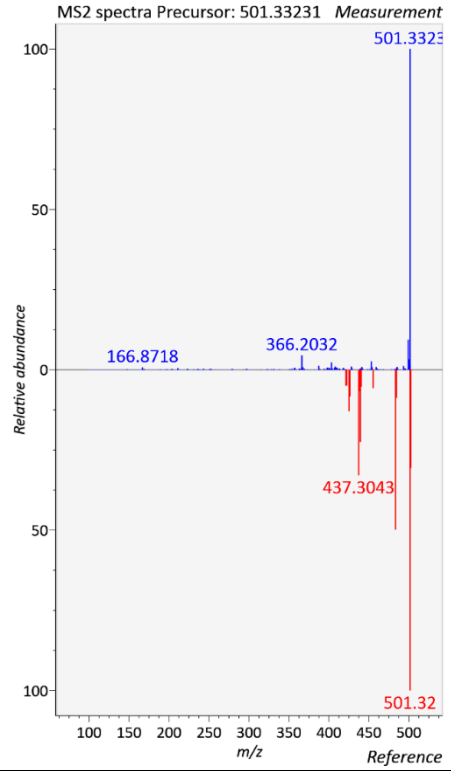
(41)



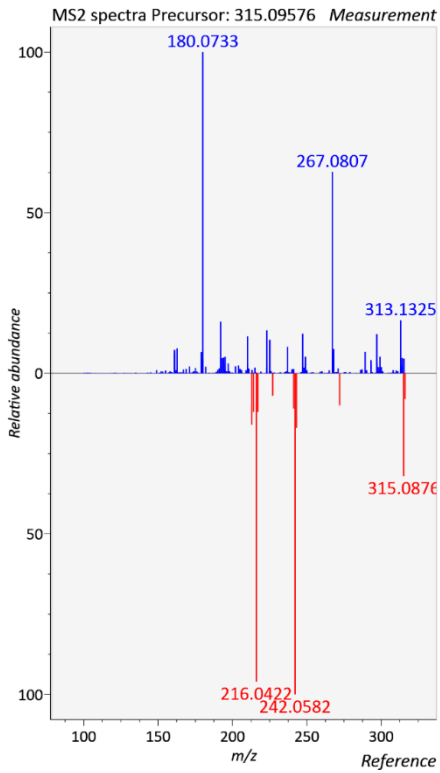
(42)



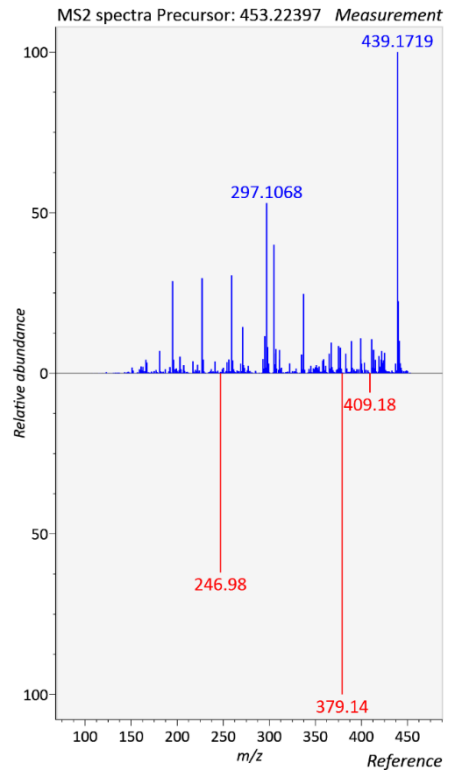
(43)



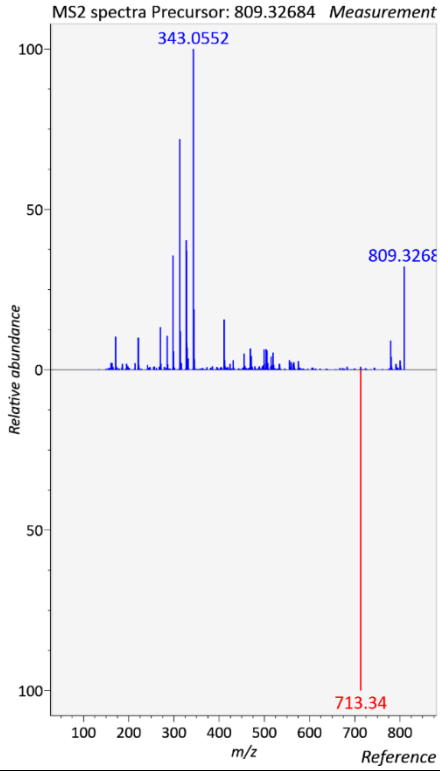
(44)



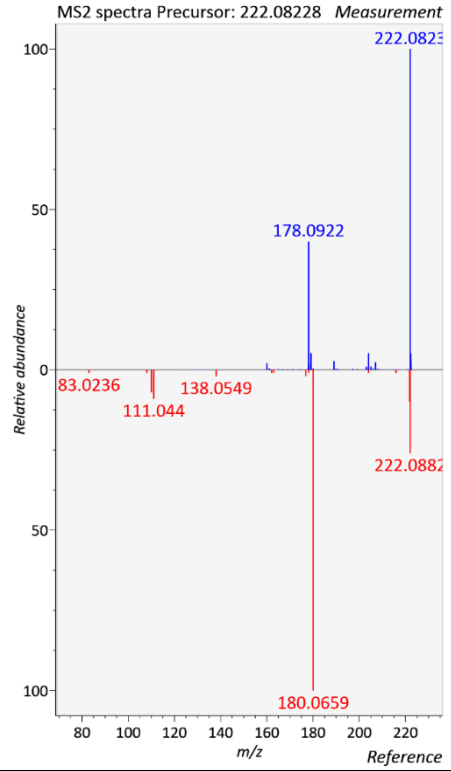
(45)



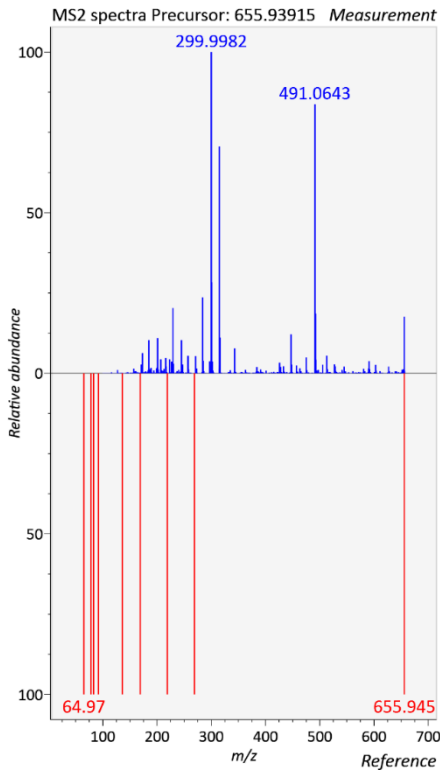
(46)



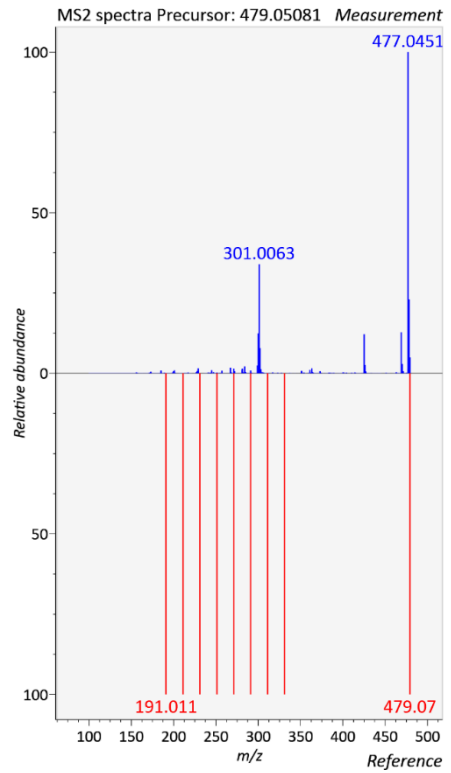
(47)



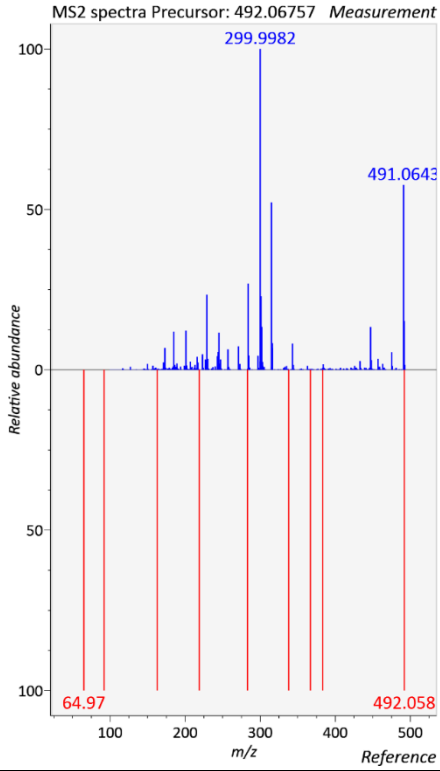
(48)



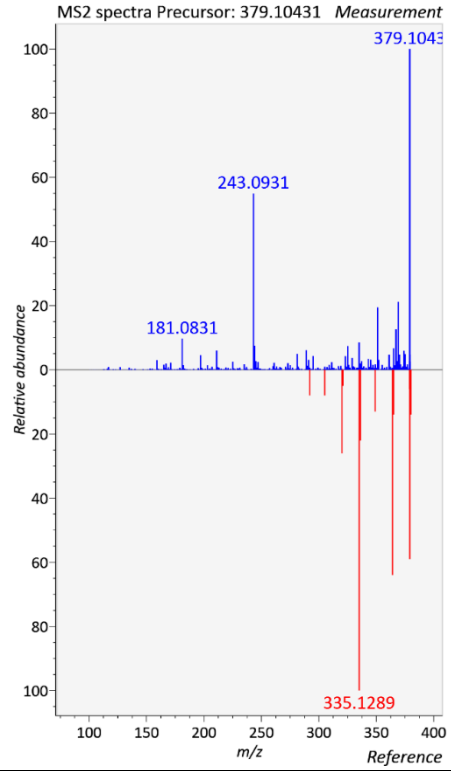
(49)



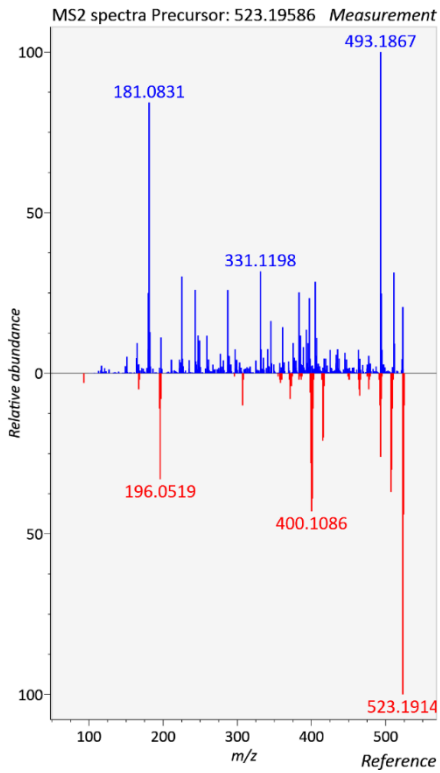
(50)



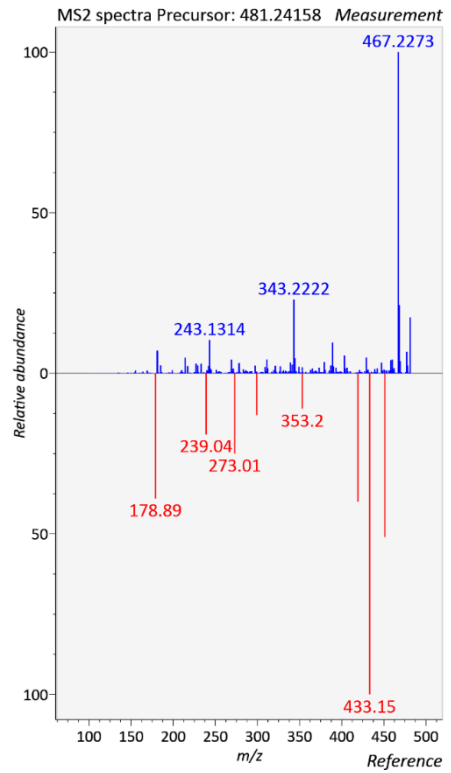
(51)



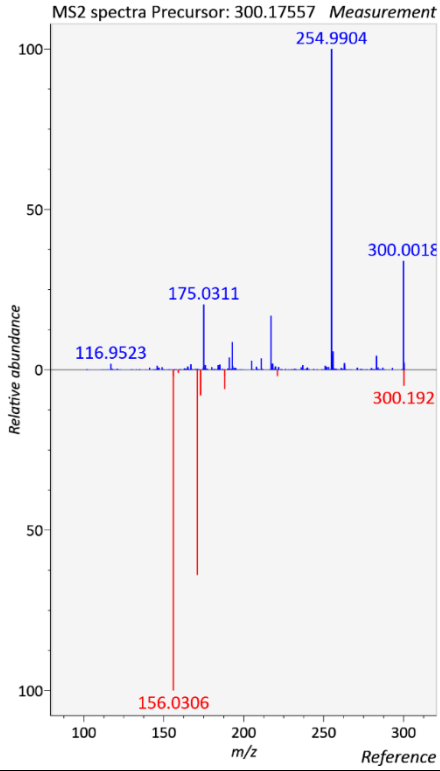
(52)



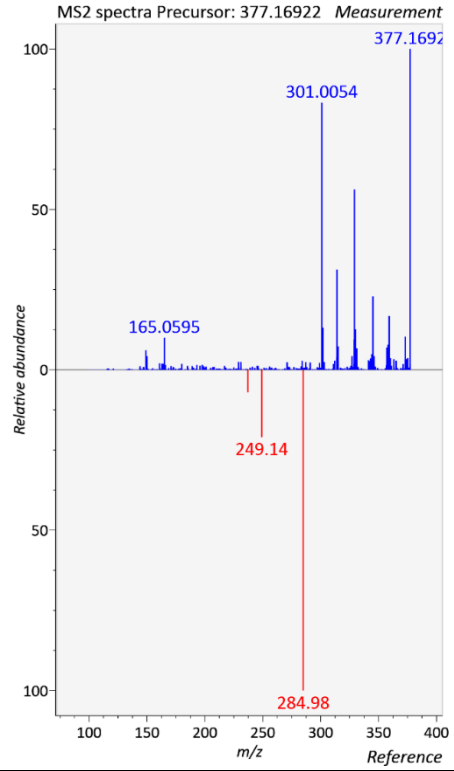
(53)



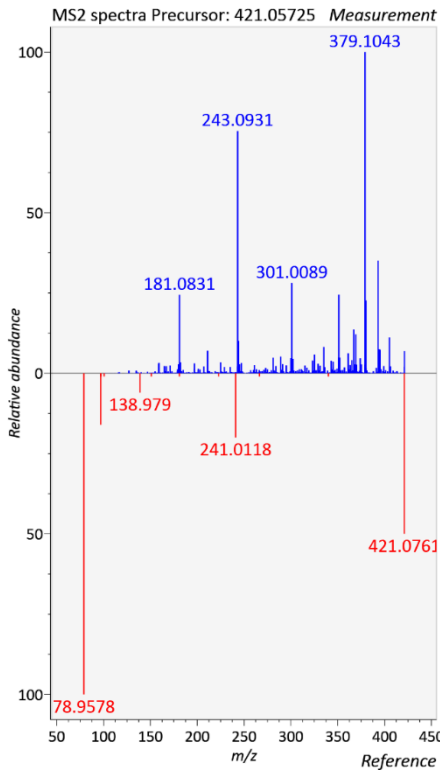
(54)



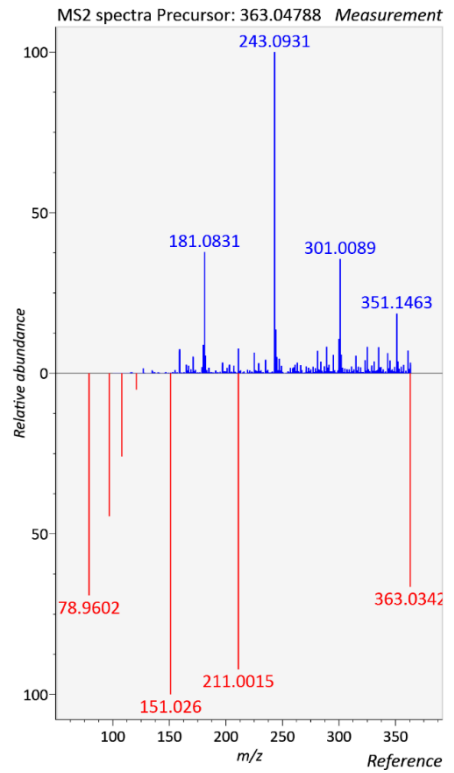
(55)



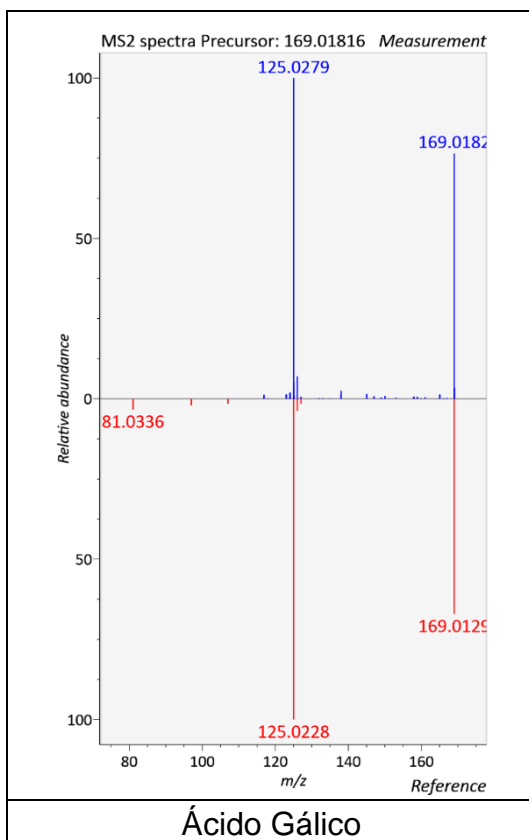
(56)



(57)



(58)



Realizado por: Pastuña, 2022.