

**Compuestos con actividad antimicrobiana en plantas del
género *Kalanchoe* como tratamiento promisorio para
infecciones producidas por bacterias**

Juan Antonio Gómez González

**Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería
Programa de Química
Bogotá, Colombia
2019**

Compuestos con actividad antimicrobiana en plantas del género *Kalanchoe* como tratamiento promisorio para infecciones producidas por bacterias

Juan Antonio Gómez González

Trabajo de grado como requisito final para optar al título de QUÍMICO

**Directora:
M.Sc Eliana Yissel Aguilera Ángel**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA
ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS, TECNOLOGÍA E INGENIERIA
PROGRAMA QUÍMICA
BOGOTÁ
2019**

DEDICATORIA

*A Dios, Por permitirme cumplir mis
Metas, por brindarme salud y bienestar.*

*A mis padres, Juan Gómez y Gloria González
Por apoyarme incondicionalmente para
Seguir adelante y concretar mis objetivos.*

*A mis hermanas, Sindy Gómez y Dayana Gómez
Por animarme día a día a culminar
Mi investigación.*

*A mi esposa, Alejandra Cuervo
Por estar conmigo y acompañarme en todo momento.*

*A mi tía, Nancy González y demás familiares
Por apoyarme siempre.*

*A mis amigos Oscar Herrera, Juan Carlos Angulo,
Ramón Ramírez, Roberto Visbal, José Pren,
Felipe Cadena, por compartir los buenos y malos momentos.*

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Eliana Aguilera por su orientación y gran colaboración en la elaboración de esta investigación, aportando información relevante para culminar este trabajo investigativo.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	12
Abstract	14
Introducción	16
Capitulo 1: Problema de investigacion.....	17
Capitulo 2: Generalidades	20
Capitulo 3: Ensayos cualitativos de caracterizacion en las plantas del género <i>Kalanchoe</i>	43
Capitulo 4: Ensayos cuantitativos de caracterizacion en las plantas del género <i>Kalanchoe</i>	61
Capitulo 5. Evaluacion de la actividad antimicrobiana en las plantas del género <i>kalanchoe</i>	77
Conclusiones.....	88
Recomendaciones	92
Referencias bibliográficas.....	93

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1. Brotes vegetativos de <i>Kalanchoe daigremontiana</i>	23
Figura 2. Distribución mundial del género <i>Kalanchoe</i>	23
Figura 3. Ilustración de corrida una placa cromatográfica por TLC	34
Figura 4a. Ilustración de un espectrómetro de masa.....	36
Figura 4b. Cámara de ionización	36
Figura 5. Ilustración de un equipo de HPLC.....	37
Figura 6. Ilustración de un equipo de CG	38
Figura 7. Ilustración de un equipo de CG/MS.....	39
Figura 8. <i>Staphylococcus Aureus</i> teñida como gran negativo.....	40
Figura 9. Fotografía 3d de <i>E. coli</i>	42

Capítulo 3

Figura 10. Tamizaje fitoquímico de diversos extractos de hojas de <i>K. crenata</i>	48
Figura 11. Tamizaje fitoquímico de diversos extractos de raíces DE <i>K. crenata</i>	48
Figura 12. Resultado del extracto de <i>Kalanchoe gastonis</i> en acetato de etilo	50
Figura 13. Resultado del extracto de <i>Kalanchoe gastonis</i> en acetato de etilo	50
Figura 14. Resultado del extracto de <i>Kalanchoe gastonis</i> en hexánico.....	51
Figura 15. Resultado del extracto de <i>Kalanchoe gastonis</i> en hexánico.....	51
Figura 16. Resultado del extracto etanólico de <i>Kalanchoe gastonis</i>	52

Figura 17. Resultado del extracto etanólico de <i>Kalanchoe gastonis</i>	52
Figura 18. Resultado del extracto hexánico de <i>Kalanchoe pinnata</i>	53
Figura 19. Resultado del extracto hexánico de <i>Kalanchoe pinnata</i>	53
Figura 20. Resultado del extracto de <i>Kalanchoe pinnata</i> en acetato de etilo	54
Figura 21. Resultado del extracto de <i>Kalanchoe pinnata</i> en acetato de etilo	54
Figura 22. Resultado del extracto etanólico de <i>Kalanchoe pinnata</i>	55
Figura 23. Resultado del extracto etanólico de <i>Kalanchoe pinnata</i>	55
Figura 24. Resultado del extracto etanólico de <i>Kalanchoe flammea</i>	56
Figura 25. Resultado del extracto etanólico de <i>Kalanchoe flammea</i>	56
Figura 26. Resultado del extracto de <i>Kalanchoe flammea</i> en acetato de etilo	57
Figura 27. Resultado del extracto de <i>Kalanchoe flammea</i> en acetato de etilo	57
Figura 28. Resultado del extracto en hexánico de <i>Kalanchoe flammea</i>	58
Figura 29. Resultado del extracto en hexánico de <i>Kalanchoe flammea</i>	58
Figura 30. CCF análisis cualitativos de extracto de <i>K. daigremontiana</i> revelada con NP/PEG fase inversa.....	60
Figura 31. CCF análisis cualitativos de extracto de <i>K. daigremontiana</i> revelada con NP/PEG fase normal	60
Figura 32. CCF análisis cualitativos de extracto de <i>K. daigremontiana</i> revelada con KOM 61	
Figura 33. CCF análisis cualitativos de extracto de <i>K. daigremontiana</i> revelada con KOM 61	
Figura 34. CCF análisis cualitativos de extracto de <i>K. daigremontiana</i> revelada con KOM en columna abierta de fase normal	62

Capítulo 4

Figura 35. M/S para el extracto de <i>Kalanchoe pinnata</i> en cloroformo	64
Figura 36. Lista de compuestos probable por M/S para el extracto de <i>Kalanchoe pinnata</i> en cloroformo	65
Figura 37. M/S del extracto de <i>Kalanchoe brasiliensis</i>	66
Figura 38. Identificación por M/S del extracto de <i>Kalanchoe brasiliensis</i>	66
Figura 39. Cromatograma y resultado por HPLC para extracto en cloroformo para esteroides de raíces de <i>Kalanchoe pinnata</i>	68
Figura 40. Cromatograma y resultado por HPLC para extracto en cloroformo para flavonoides de raíces de <i>Kalanchoe pinnata</i>	69
Figura 41. Fase móvil para análisis por HPLC Para identificar los flavonoides en la planta <i>Kalanchoe daigremontiana</i>	70
Figura 42. Perfil cromatografico mediante HPLC para extracto metanólico de <i>K. draigremontiana</i>	71
Figura 43. Perfil cromatografico mediante HPLC para glucósido de quercetina.....	71
Figura 44. Fase móvil para separación de ácido fenólicos.....	72
Figura 45. Fase móvil para separación de flavonoides	73
Figura 46. HPLC de fase reversa del extracto en metanol <i>Kalanchoe pinnata</i>	73
Figura 47. HPLC de fase reversa del extracto en acetato de etilo de <i>Kalanchoe pinnata</i> ...	74
Figura 48. CG para el extracto de <i>K. pinnata</i> en cloroformo	75
Figura 49. Lista de compuestos probable por CG para el extracto de <i>Kalanchoe pinnata</i> en cloroformo	76
Figura 50. CG-MS para el extracto de <i>Kalanchoe floribunda</i>	77
Figura 51. CG-MS para el extracto de <i>Kalanchoe floribunda</i>	78

Capítulo 5

Figura 52. Diámetro de inhibición de los extractos de <i>Kalanchoe pinnata</i>	80
Figura 53. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Kalanchoe pinnata</i> en la bacteria <i>E. coli</i>	81
Figura 54. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Kalanchoe pinnata</i> en la bacteria <i>S. aureus</i>	81
Figura 55. Actividad antimicrobiana del extracto de <i>Kalanchoe daigremontiana</i>	82
Figura 56. Patrones estándar de la zona de inhibición para la cepa <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> empleada como control de calidad.....	83
Figura 57. Kanamicina: controles positivos	83
Figura 58. Amikacina: controles positivos.....	84
Figura 59. Zona de inhibición de extracto de <i>Kalanchoe pinnata</i>	84
Figura 60. Numero de UFC inhibición de las distintas concentraciones del extracto etanólico de <i>Kalanchoe pinnata</i>	86
Figura 61. CMI del extracto etanólico de <i>Kalanchoe pinnata</i>	89
Figura 62. Zonas de inhibición del extracto de <i>Kalanchoe pinnata</i> en etanol	88
Figura 63. Diámetros de las zonas de inhibición de los distintos niveles de concentraciones del extracto etanólico de <i>Kalanchoe pinnata</i>	89

LISTA DE TABLAS

Capítulo 2

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género <i>Kalanchoe</i>	24
---	----

Capítulo 3

Tabla 2. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico, acuoso y seco de la planta <i>Kalanchoe pinnata</i>	43
---	----

Tabla 3. Resultados del tamizaje fitoquímico de la planta <i>Kalanchoe pinnata</i> en extracto alcohólico al 70%	46
--	----

Tabla 4. Fases móviles usadas en la CCF de los tres extractos de <i>Kalanchoe</i>	49
---	----

Tabla 5. Grupos químicos mayoritarios identificados en las especies de <i>Kalanchoe</i>	59
---	----

LISTA DE ABREVIACIONES

μL	Microlitros
μm	Micrometros o micras
nm	Nanometros
°C	Grados Celsius
CCF	Cromatografía de capa fina
CC	Cromatografía de columna
FE	Fase estacionaria
FM	Fase móvil
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas
CG	Cromatografía de gases
HPGC	Cromatografía de gases de alta eficacia
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
M/S	Espectrometría de masas
ml	Mililitros
mg	Miligramos
Rf	Factor de retención
UV	Ultravioleta
%	Porcentaje
cm	Centímetro
°C	Grados centígrados
RF	Frente de corrido
ppm	Partes por millón
Ppb	Parte por billón
ppt	Partes por trillón
CMI	Concentración mínima Inhibitoria
HCl	Ácido Clorhídrico
UFC	Unidades formadoras de colonias
TLC	Cromatografía por capa fina

RESUMEN

Las infecciones producidas por microorganismos bacterianos dan lugar a enfermedades tales como la neumonía, infecciones en la piel, intoxicación por alimentos e intoxicación sanguínea. Algunos de los microorganismos causantes de dichas enfermedades son principalmente el *Staphylococcus Aereus* y *Escherichia coli*, los cuales se vuelven resistentes a los antibióticos (Merchant, 1980), debido a la capacidad de mutación de estas bacterias, volviéndose capaces de resistir los efectos de un antibiótico y a la vez haciéndose más resistentes y multiplicándose con dicha capacidad. A pesar que contamos con la disponibilidad de medicamentos para el tratamiento de infecciones, se presentan además de los problemas de resistencia, otros problemas como los sobrecostos, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y fototoxicidad, por estas razones, es necesario orientar esfuerzos en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que superen dichas limitaciones (Pfalle, 2007; Nazar, 2010; Peman, 2011).

La composición química de las plantas del género *Kalanchoe* y sus propiedades antimicrobianas, pueden constituir un aporte significativo al mejoramiento de la calidad de vida, argumentando científicamente su uso en la población como una forma de combatir microorganismos resistentes a los medicamentos tradicionales, para así promover el manejo racional y económico de antibióticos.

Los tamizajes fitoquímicos reportados en distintas literaturas de la planta del género *Kalanchoe*, indicó la presencia de metabolitos secundarios tales como alcaloides, terpenos, esteroides, saponinas, cetonas, taninos, aminoácidos, aldehídos y aminas. Los análisis cuantitativos reportaron la presencia de flavonoides y fenoles como: la patuletina, glucosidos de quercetina, B-sisterol, luteolina, colesterol y miricetina (Majaz, Nazim, Shaikh, Gomase, Choudhari, 2011). En las distintas pruebas para comprobar la actividad antimicrobiana, dio resultados positivos con mayor halo de inhibición para la cepa de *Staphylococcus aureus*. Estos resultados evidencian el posible uso de las plantas del género *Kalanchoe* como alternativa contra infecciones producidas por las bacterias analizadas.

Este trabajo pretende dar un aporte a la rama de productos naturales contribuyendo al conocimiento sobre los antimicrobianos y su papel en la salud humana, como una herramienta alternativa a los métodos tradicionales en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Palabras claves: Género *Kalanchoe*, compuestos con actividad antimicrobiana, microorganismos resistentes, *Staphylococcus Aereus* y *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Infections produced by bacterial microorganisms are responsible for pneumonia, skin infections, food poisoning and blood poisoning. Many of these microorganisms, such as *S. aureus* and *E. coli*, become resistant to antibiotics (Merchant, 1980). In spite of the availability of drugs for the treatment of these infections, there are also problems of resistance, other problems such as cost overruns, hepatotoxicity, nephrotoxicity and phototoxicity, for these reasons, it is necessary to focus efforts in the search for new antimicrobial agents that overcome these limitations (Pfalle, 2007, Nazar, 2010, Peman, 2011).

The chemical composition of the plants of the Genus *Kalanchoe* and its antimicrobial properties, can constitute a significant contribution to the improvement of the quality of life, scientifically arguing its use in the population as a way to combat microorganisms resistant to traditional medicines, in order to promote the rational and economic management of antibiotics.

The phytochemical screenings reported in different literatures of the *Kalanchoe* plant indicated the presence of secondary metabolites such as alkaloids, terpenes, sterols, saponins, ketones, tannins, amino acids, aldehydes and amines. The quantitative analyzes reported the presence of flavonoids and phenols such as: patuletin, quercetin glucosides, B-sisterol, luteolin, cholesterol and myricetin. In the different tests to check the antimicrobial activity, gave positive results with greater inhibition halo for the strain of *Staphylococcus aureus*. These results show the possible use of the plants of the *Kalanchoe* genus as an alternative against infections produced by the analyzed bacteria.

This work also aims to contribute to the knowledge of natural products with functional characteristics, as an alternative tool to traditional methods in the treatment of infectious diseases.

Keywords. Genus Kalanchoe, compounds with antimicrobial activity.

INTRODUCCIÓN

La medicina ancestral en muchas culturas milenarias ha demostrado el uso frecuente de plantas para aliviar y curar ciertas enfermedades (Lizcano, Vergara, 2008), de la misma manera en la actualidad se ha demostrado científicamente que algunas plantas ofrecen muchos beneficios a la salud y un medio alternativo para combatir enfermedades mortales como es caso del uso de la planta zaragoza para las mordeduras de serpiente, el diente de león para el cáncer de próstata e infecciones urinarias, entre otras (Urióstegui, Flores, 2015). Es bien conocido el uso de plantas medicinales por parte de algunas culturas ancestrales para el tratamiento de enfermedades y que posteriormente, después de someterlas a diversas investigaciones se logró corroborar sus propiedades medicinales (Aldana, 2010), como es el caso del totumo (*Crescentia cujete*) que ahora se comercializa para aliviar la tos y más recientemente el desarrollo de bebidas con sábila que aportan grandes beneficios a la salud (García, y otros, 2012).

En la actualidad se conocen cerca de 260.000 especies de plantas, pero solo el 10% son consideradas medicinales por lo que aun se hace necesario realizar investigaciones que permitan conocer las propiedades terapéuticas y medicinales de las distintas especies de plantas, y a pesar de los adelantos en análisis químico y el desarrollo alcanzado en la industria farmacéutica, aún queda mucho campo por investigar y desarrollar (Calvopiña, 2010).

En la presente monografía se realiza un estado del arte de las investigaciones realizadas acerca de las plantas del género *Kalanchoe* a nivel mundial. Estas plantas son utilizadas desde hace muchos años para curar distintas enfermedades como los resfríos, la bronquitis, la tos, el sarampión y el cáncer (Villamizar, Mosquera, Mejia, Muñoz, Pombo, 2008), sin embargo, es importante comparar, clasificar y precisar las diversas propiedades responsables de aliviar o curar enfermedades. Es por esto que es necesario la realización de un estudio documental sobre las plantas del género *Kalanchoe*, con el objetivo de identificar las propiedades de este género que favorezcan el tratamiento de infecciones producidas por bacterias y que ayuden a precisar los compuestos químicos que le brindan las características antimicrobianas, permitiendo comparar los compuestos químicos reportados en la literatura, con su efecto sobre las infecciones causada por bacterias.

CAPITULO 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Este capítulo tiene como objetivo identificar el problema a tratar, en este caso sobre las plantas del género *Kalanchoe* como una herramienta que favorezca al tratamiento de infecciones producidas por bacterias.

Contenido

1.1 Problema de investigación.....	17
1.2 Justificación	19
1.3 Objetivos.....	20
1.3.1 Objetivo general	20
1.3.2 Objetivos especificos.....	20

1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El uso de plantas medicinales ha perdurado en la medicina tradicional por cientos de años debido al éxito en sus tratamientos, razón por la que se hace necesario identificar los componentes químicos de las plantas medicinales que presenten buenos resultados en el tratamiento de algunas enfermedades, en especial aquellas que representen cifras elevadas de mortalidad y morbilidad alrededor del mundo como es el caso de las infecciones producidas por bacterias (Sánchez, 1990). Actualmente las posibilidades para tratar algunas infecciones se ven notablemente menguadas por la falta de nuevos medicamentos que actúen frente a diversos organismos patógenos; y a pesar de la disponibilidad de medicamentos para el tratamiento de estas infecciones se presentan problemas de resistencia, elevados costos, efectos adversos al paciente como hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y fototoxicidad, por estas razones, es necesario orientar esfuerzos en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que superen dichas limitaciones (Pfalle, 2007; Nazar, 2010; Peman, 2011).

El análisis de la relación entre la composición química de las plantas del género *Kalanchoe* que ya ha sido reportada en la literatura y sus propiedades antimicrobianas, puede constituir un aporte significativo al mejoramiento de la calidad de vida, argumentando científicamente su uso en la población como una forma de combatir microorganismos resistentes a los medicamentos tradicionales sin efectos secundarios, para así promover el manejo racional y económico de antibióticos.

Teniendo en cuenta la información disponible en la literatura, en cuanto análisis de la composición de extractos de plantas del género *Kalanchoe* con actividad antimicrobiana, se pretende dar respuesta a la siguiente pregunta:

¿Qué compuestos químicos han sido reportados, identificados y cuantificados en estudios realizados en las plantas del género *Kalanchoe* que sustenten la actividad antimicrobiana y que actúen contra enfermedades infecciosas producidas por bacterias?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Las plantas tienen la propiedad de sintetizar compuestos químicos, la mayoría de estos son metabolitos secundarios, los cuales se pueden representar como principios activos que producen diversos efectos en el organismo, comúnmente llamada actividad biológica (Pérez, 2015). El uso convencional de plantas con fines medicinales, de forma general se menciona que la actividad química de las plantas se deriva de las combinaciones de los compuestos químicos en su forma natural, y no considerando a solo un compuesto químico como el responsable de la actividad biológica (Osorio, 2009).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, se seleccionaron a las plantas del género *Kalanchoe* debido a la gran cantidad de compuestos químicos y uso tradicional reportados, para contrarrestar distintas enfermedades, entre las que destacan la acción antifúngica, anticancerígenas, úlceras gástricas, limpieza del útero de las mujeres que han dado a luz, antiinflamatoria, vasoconstrictora, diurética, antimicrobiana, antiséptico urinario y de acción sobre el sistema nervioso central. Para dar a conocer los usos terapéuticos de las plantas del género *Kalanchoe* es necesario realizar una recopilación de datos relacionados con investigaciones que permitan confirmar estas propiedades con el fin de potencializar su uso (Robineau, 1995; Payo, 2001). Las plantas del género *Kalanchoe*, constituyen una matriz vegetal interesante debido a los diversos reportes acerca de su uso medicinal y propiedades curativas de enfermedades en las que destacan principalmente infecciones (Gallegos-Zurita, 2016), por lo que se propone el análisis de la actividad antimicrobiana de las plantas del género *Kalanchoe* frente a infecciones producidas por bacterias, como una forma de contribuir al conocimiento del uso de los productos naturales como fuente de nuevos y variados agentes antimicrobianos y a la búsqueda de tratamientos confiables, seguros y de menor costo contra las infecciones producidas por bacterias.

En el presente trabajo se realizó un estudio de tipo investigativo y documental sobre las plantas del género *Kalanchoe* con el fin de identificar una correlación entre el uso terapéutico y medicinal atribuido a esta planta y la presencia de componentes químicos en la planta que expliquen su actividad antimicrobiana desde la perspectiva de la química como ciencia moderna, que puede contribuir a la construcción del conocimiento requerido para la regulación del uso de las plantas del género *Kalanchoe* con fines terapéuticos.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Establecer si las plantas del género *Kalanchoe* constituyen un tratamiento promisorio contra enfermedades infecciosas producidas por bacterias y que sustenten una actividad antimicrobiana, a partir de compuestos que ya han sido identificados, reportados y cuantificados.

1.3.2. Objetivo específico

- Analizar las propiedades identificadas de las plantas del género *Kalanchoe* reportadas en la literatura, las cuales ayudan a tratamientos de infecciones producidas por bacterias.
- Precisar los compuestos químicos presentes en las plantas del género *Kalanchoe*, que han sido identificados, reportados y cuantificados en la literatura.
- Comparar los compuestos químicos presentes en las plantas del género *Kalanchoe* que han sido reportados en la literatura, con su efecto sobre infecciones causada por bacterias.

CAPITULO 2. GENERALIDADES

Este capítulo consta de una revisión documental sobre las generalidades acerca de las plantas del género *Kalanchoe*, así como también la definición de los compuestos químicos con propiedades antimicrobianas. De igual forma, contiene de manera explícita las pruebas, métodos y técnicas que permiten la evaluación del carácter antimicrobiano de la planta de estudio.

Contenido

2.1 Plantas del género <i>kalanchoe</i>	178
2.1.1 Generalidades.....	208
2.2 Compuestos químicos con propiedades antimicrobianas aislados de plantas medicinales.....	19
2.2.1 Fenoles.....	21
2.2.2 Quinonas.....	22
2.2.3 Taninos.....	22
2.2.4 Cumarinas.....	22
2.2.5 Alcaloides.....	23
2.2.6 Terpenos.....	23
2.2.7 Flavonoides.....	23
2.2.8 Sesquiterpenolactonas.....	24
2.3 Métodos de caracterización química.....	24
2.3.1 Pruebas cualitativas.....	24
2.3.1.1 Tamizaje fitoquímico.....	24
2.3.1.2 Cromatografía de capa delgada.....	27
2.3.2 Pruebas cuantitativas.....	28
2.3.2.1 Espectrometría de Masas.....	28
2.3.2.2 Cromatografía líquida de alta eficacia.....	30

2.3.2.3 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas	30
2.3.2.4 Cromatografía de Gases	31
2.4 Bacterias	32
2.4.1 Staphylococcus Aureus	33
2.4.2 Escherichia coli	34
2.5 Métodos para la evaluación del carácter antimicrobiano de un compuesto	19
2.5.1 Método de difusión en pozo	35
2.5.2 Susceptibilidad por difusión de Agar	36
2.5.3 Susceptibilidad por difusión en disco.....	36
2.5.4 Concentración mínima inhibitoria	36

2.1. PLANTAS DEL GÉNERO *KALANCHOE*

2.2.1. GENERALIDADES

Las plantas del género *Kalanchoe* comprenden cerca de 125 especies, son originarias del continente africano especialmente de los países de Mozambique y Madagascar (Allorge, 1995), pero se encuentran en diferentes partes del mundo, por lo general son arbustos o plantas vivaces, que miden desde 30 cm y pueden llegar a medir en algunos casos los 6 metros de altura, aunque la mayoría no superan el metro de alto. Presentan hojas gruesas, con una tonalidad verde oscuro (Soltis, Ortega, & Santos Guerra, 2001). Las plantas del género *Kalanchoe* se reproducen asexualmente mediante la formación de embriones y plántulas en los bordes de las hojas que al desprenderse y caer al suelo genera plantas-hijas. También se caracterizan por tener hojas opuestas que pueden alcanzar los 20 cm de largo y unos 5 cm de ancho, son ampliamente cultivadas para uso decorativo en regiones templadas de Hawái, Melanesia, Australia, Asia, Indias Occidentales, Macaronesia, Mascareñas, Polinesia, Nueva Zelanda y Galápagos (Villamizar, Mosquera, Mejia, Muñoz, Pombo, 2008).

Garces et al (2009) clasificaron las plantas del género *Kalanchoe* en cuatro categorías de acuerdo a su habilidad de generación de plantulas:

- a) Especies que no producen plantulas (*K. rhombopilosa*, *K. marmorata*, *K. thyrsoiflora* y *K. tomentosa* y).
- b) Especies con formación constitutivas de plantulas (espontaneas)
- c) Especies con formación de plantulas por inducción (*K. crenata*, *K. pinnata*, *K. prolifera*, *K. fedstchenkoi*, y *K. strepthantha*).
- d) Especies con formación semi-constitutivas de plantulas, las cuales producen pantulas constitutivamente y también inducidas por estrés (*K. gastonis-bonnierei*).

Todas las especies del género *Kalanchoe*, forman plantulas en las muescas de las hojas y cada una desarrolla raíces, que eventualmente se separa de la hoja madre (López, 2011).



Figura 1. Brotes vegetativos de *Kalanchoe daigremontiana* (López, 2011).

Clasificación taxonómica las plantas del género *Kalanchoe*:

<i>Reino</i>	<i>División</i>	<i>Clase</i>	<i>Orden</i>	<i>Familia</i>	<i>Género</i>
<i>Plantae</i>	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Saxifragales</i>	<i>Crassulaceae</i>	<i>Kalanchoe</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Kalanchoe* (Arias, 2011).

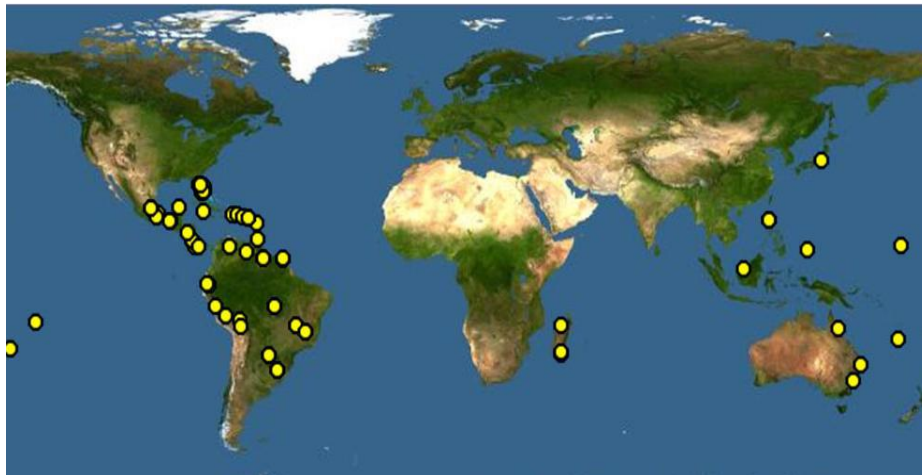


Figura 2. Distribución mundial del género *Kalanchoe* (Arias, 2011).

Las plantas del género *Kalanchoe* se conocen con varios nombres, las más comunes son: Aranto, lengua de suegra, espinazo del diablo, mala madre, hierba bruja, siempre viva, colombiana, prodigiosa, Ojaransin, inmortal, pericón y hierba de lechuza (Villamizar, Mosquera, Mejia, Muñoz, Pombo, 2008).

La parte más usada de las plantas son las hojas y se usan para hinchazones, combatir afecciones a los pulmones, quemaduras y para problemas en los órganos reproductivos de la mujer (López, 2011). En África oriental, las hojas de la *Kalanchoe crenata* ligeramente calientes (calentadas sobre fuego) se frotran sobre el cuerpo como tratamiento para la articulación rígida y el reumatismo (Gill, 1992). La *K. crenata* también es muy efectiva en tratamientos de enfermedades de la piel, el jugo obtenido por exprimir las hojas que se han pasado sobre fuego ligeramente, se utiliza más comúnmente para el tratamiento de cefalea, debilidad general, disentería, viruela y convulsiones (Sofowora, 1993). En la medicina tradicional, las hojas se han utilizado para el tratamiento antimicrobiano (Oliver, 1983; Akinpelu 2000), antifúngico (Misra, Dixits, 1979), antiulceroso (Pal, Nag, 1992), potente antihistamínico y actividad antialérgica (Pal, Nag, 1999).

Da Silva, Diniz, Gurgel, Siqueira y Souza (2009) evaluaron la CMI de los tallos y hojas de *Kalanchoe brasiliensis* utilizando la técnica de difusión en agar, frente a microorganismos con distintos perfiles resistentes a los antibióticos, mediante el empleo de muestras de bacterias gram-negativas como el *E. coli* y gram-positivas como el *S. aureus*, demostró la reducción en un exponencial a partir de la sexta hora de exposición de la muestra *S. aureus* en aceites esenciales del 4% y 8%, por tal motivo atribuyó el efecto antimicrobiano a los polifenoles presentes en estos aceites.

En la literatura se reportan diferentes compuestos activos presentes en varias especies de las plantas del género *Kalanchoe*, tales como: los fenoles, flavonoides, terpenos, alcaloides, quinonas, taninos, ácidos acético, cítrico, fumarico, isocítrico, láctico, succínico y oxálico, lo cual podría explicar por qué de sus actividades biológicas, incluyendo propiedades antimicrobianas. También presentan un contenido considerable de calcio y cloro, además contienen mucílago, b-sitosterol, briofilina, taninos, vitamina P, polisacáridos, aluminio, hierro, ácido ascórbico, magnesio, zinc, manganeso, cobre, silicio y riboflavina (Calvopiña, 2010; Dos Santos, Vinicius, Aragao, Rodrigues, Frazao, Soares y Schwartz, 2015; Pérez, 2015; Arutselvan, Tamil, Jeyasree, Bharathidasan, Kalaivani, Prabakaran, 2013; Abdellaoui, Destandau, Toribio, Elfakir, Lafosse, Renimel, André, Cancellieri, Landemarre, 2010; Majaz, Nazim, Shaikh, Gomase, Choudhari, 2011; Okwu, 2006).

2.2. COMPUESTOS QUÍMICOS CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS AISLADOS DE PLANTAS MEDICINALES

Según Díaz et al (2017) “Los metabolitos secundarios se han asociado a importantes funciones fisiológicas en las plantas” (p. 5), concretamente a la defensa frente a patógenos microbianos (Buchanan et al., 2000). Las propiedades farmacológicas de los extractos vegetales se atribuyen al alto contenido de compuestos fenólicos y sus derivados, los cuales a su vez se relacionan con actividades antioxidantes, antifúngicas y antimicrobianas (Al-Abd et al., 2015). Los principales metabolitos secundarios con propiedades antimicrobiana se mencionan a continuación:

2.2.1. Fenoles

Son los compuestos fitoquímicos más simples y poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos (OH). Englobando más de 10.000 compuestos distintos, como ejemplos se mencionan el pirogalol, cresol, catecol, cafeico, clorofenol, ácidos cinámico, entre otros (Aripaca, 2011).

Los fenoles en la mayoría de las plantas se agrupan químicamente entre sí, en moléculas más grandes tales como las proantocianidinas y ligninas. Los compuestos fenólicos se producen en algunas plantas como glucósidos o ésteres con otros compuestos naturales tales como esteroides, alcoholes y ácidos hidroxílicos (Ghasemzadeh1, Ghasemzadeh, 2011).

Su poder antimicrobiano no ha sido determinado, pero puede estar relacionado con la inhibición de enzimas esenciales por compuestos oxidados, también por posibles reacciones por interacciones no específicas como proteína y grasas, destacándose principalmente los aceites esenciales (Domingo, 2003).

2.2.2. Quinonas

Son compuestos producidos por la oxigenación de derivados aromáticos, pueden encontrarse en el reino vegetal, tanto en vegetales superiores, así como también en hongos y bacterias (Torres, 2014). Las quinonas se clasifican en cuatro grupos principales de acuerdo con la

estructura de sus anillos: benzoquinonas (1,4-benzoquinona y la 1,2-benzoquinona), naftaquinonas, antraquinonas e isoprenoquinonas. Las quinonas mencionadas anteriormente son compuestos hidroxilados con propiedades fenólicas (Valencia, 1995).

Algunas quinonas son consideradas coenzimas debido a que regulan los procesos de oxidación – reducción por medio del proceso de equilibrio quinona-hidroquinona (Torres, 2014).

Las quinonas tienen una buena capacidad antimicrobiana, debido a que son altamente reactivos debido a la formación de complejos con aminoácidos hidrofílicos presentes en las proteínas, en su gran mayoría anulando e inactivando la función de las proteínas, por este motivo su potencial antimicrobiano es amplio (Aripaca, 2011).

2.2.3. Taninos

Es un compuesto fenólico de origen vegetal, de estructuras polifenólicas solubles en agua y en mezclas de agua: cetona: alcohol, se han detallado más de 30 taninos que pueden impedir el crecimiento de bacterias y hongos (Aripaca, 2011). Presentan un olor ligero característico, sabor astringente y amargo, su propiedad principal es curtir la piel, haciéndola impermeable e imputrescible (Domingo, 2003).

Son utilizados en las curtiembres debido a su capacidad para unir macrocélulas con hidratos de carbono y proteínas (Torres, 2014).

Valencia (1995) señala que los taninos se prescriben en la medicina por su acción antibacteriana debido a que produce secreciones en los microorganismos causantes de infecciones originando una precipitación en las enzimas extracelulares, lo que hace que sean muy utilizadas en diarreas producto de infecciones.

2.2.4. Cumarinas

Son compuestos fenólicos derivados de la benzopirona, como la cumarina, escopoletina, la umbeliferona y la esculerina (Domingo, 2003). Están distribuidos por toda la planta, principalmente en las raíces, flores y frutos, muchas cumarinas han presentado actividad biológica como por ejemplo acción anticoagulante, anticancerígeno, antibacteriana, acción antibiótica (novobiocina que es un antibiótico aminocumarina producido por la bacteria

Streptomyces niveus), acción astrógena, antineurodegenerativos, antiinflamatorios, acción fotosensibilizadora, acción insecticida (Lock, 1988).

Las cumarinas presentan mecanismo de acción antimicrobiana mediante la interacción con el ácido desoxirribonucleico eucariota, lo que explica también su actividad para combatir virus. (Domingo, 2003).

2.2.5. Alcaloides

Son sustancias básicas de origen biológico y vegetal, hacen parte de un sistema cíclico que contienen uno o más átomos de nitrógeno, son sintetizados de aminoácidos como precursores y presentan una significativa actividad farmacológica (Lock, 1988).

Los alcaloides en las plantas normalmente se combinan con los ácidos tánico, caféico, oxálico, succínico, málico, cítrico, mecónico, tartárico, aconítico y quínico, además se encuentran formando tanto sales solubles como insolubles (Valencia, 1995).

Según Pava (2016) “Su actividad antimicrobiana probablemente este dada por su capacidad de intercalarse con el ácido desoxirribonucleico, de frenar la síntesis de proteínas, inducir apoptosis (muerte celular programada) e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos.” (p. 31).

2.2.6. Terpenos

Este grupo está integrado por aproximadamente 22.000 estructuras diferentes y abarca sustancias que comparten un origen biosintético común (Gershenzon, Kreis, 1999). Estos compuestos están formados por hidrogeno, oxígeno y carbono de estructura no aromática y a por lo general no saturados. Se localizan en todos los aceites esenciales y en las resinas, presenta propiedades antisépticas, antiinflamatorias, vermifugas, entre otras (Lizcano, Vergara, 2008).

El mecanismo de acción antibacteriana aún no ha sido visiblemente caracterizado, pero se plantea que los terpenoides atacan la membrana celular de la bacteria, provocando una serie de procesos que conllevan a la muerte de la bacteria (Maguna et al., 2006).

2.2.7. Flavonoides

Son un conjunto de moléculas generadas por el metabolito secundario de algunas las plantas e insectos (Domínguez, 2004), siendo el principal subgrupo de los flavonoides, conformadas por estructuras fenólicas mediante ruta biosintética que contienen un grupo funcional carbonílico y constituyen la subfamilia más amplia de polifenoles naturales (Lizcano, Vergara, 2008). De acuerdo al nivel de oxidación, grupo funcional, formas glicosidadas se puede dividir en varias clases como calconas, flavonas, auronas, flavanonas, antocianinas, flavonoles, isoflavonas, leucoantocianinas y caquequinas (Valencia, 1995).

Según Domínguez (2004) se han descrito una gran variedad de actividades biológicas para este tipo de compuestos, destacándose las actividades antiulcéricos, antivirales, analgésicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, coléretica, anticancerígenas, espasmolítica, antihepatotóxica, estrogénica, diurética, entre otras.

Probablemente su actividad frente a los microorganismos se debe a que forman diversos complejos con las proteínas solubles y extracelulares (Lizcano, Vergara, 2008).

2.2.8. Sesquiterpenolactonas (lactonas sesquiterpénicas)

Se derivan biológicamente de los sesquiterpenos, (terpenoides de 15 carbonos), son sustancias amargas al gusto que se encuentran en todas partes de las plantas en concentraciones desde 0.01 al 8%, encontrándose en mayor proporción en las hojas. Son muy solubles en éter etílico y cloroformo (Lizcano, Vergara, 2008).

Son muy importantes debido a que han demostrado múltiples acciones biológicas tales como: acción analgésica, antitumoral, inhibidoras del crecimiento de bacterias, entre otras (Lizcano, Vergara, 2008).

Su actividad antibacteriana se debe a que realiza un ataque nucleofílico en ciertos puntos activos de las proteínas, la cual induce a la inhibición de diversas funciones metabólicas de las células produciendo una apoptosis (muerte celular), esto se produce mediante la disminución de la acción enzimática o causando la interrupción del metabolismo (Ruiz, Suarez, 2005).

2.3. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

La caracterización química se divide en dos áreas, que son llamados análisis cualitativos y cuantitativos, que tienen como finalidad conocer la composición química de una mezcla en cada una de estas áreas, así como identificar las estructuras de los compuestos, las proporciones de cada fase, la naturaleza y cantidad de los grupos funcionales presentes.

2.3.1. PRUEBAS CUALITATIVAS

2.3.1.1. Tamizaje fitoquímico

Consiste en la extracción sistemática de los compuestos químicos presentes en una planta utilizando solventes apropiados para realizar una rápida evaluación, con reacciones reproducibles, sensibles, rápidas y de bajo costo. El tamizaje fitoquímico o estudio fitoquímico sistemático es una de las primeras etapas para realizar un análisis preliminar, esta permite aislar e identificar cualitativamente los diferentes tipos de compuestos presentes en los extractos de una planta, a partir de eso, se orienta el fraccionamiento de los extractos para el aislamiento y posterior identificación de los grupos químicos de interés (Palacios, 2013).

A continuación, se mencionan los diversos métodos de tamizajes fitoquímicos:

a) Prueba de Baljet:

Esta prueba es utilizada para identificación de terpenos y esteroides: Se prepara una mezcla de dos soluciones en volúmenes iguales (solución A: 1g de ácido pícrico en 100 ml de etanol y solución B: 10g hidróxido de sodio en 100 ml de H₂O). Se agregan 3 o 4 gotas de la mezcla (A-B) a las muestras a identificar, la detección resulta positiva si presenta un cambio de coloración que varía de naranja a rojo oscuro. Esta prueba se basa en la formación de un complejo debido al ácido pícrico y la lactona ya sea α , β y γ insaturada (Domínguez, 1973).

b) Prueba de Lieberman – Burchard:

Es utilizada para identificación de esteroides y esteroides: La prueba se realiza utilizando 1.5mg de la muestra diluida en etanol (si está en forma de extracto pulverizado) y se le añade 1 ml de cloroformo, 1 ml de anhídrido acético y una gota de H₂SO₄. La detección resulta positiva si presenta cambios de coloración que pueden ser verde, rosa, azul y violeta. Esta reacción consiste en la oxidación del esteroide con

ácido sulfúrico formando una molécula con doble enlace formando coloraciones (Domínguez, 1973).

c) Prueba de Salkowsky:

Utilizada para la identificación de terpenos: Se toma de 1 a 2 mg de la muestra diluida en etanol (si está en forma de extracto pulverizado) y se adiciona en 1 ml de cloroformo. A esta mezcla se le agrega 1ml de H₂SO₄. El cambio de coloración a amarillo o rojo evidencia una prueba positiva. Al agregarle a la muestra el disolvente no polar (cloroformo) y H₂SO₄, produce una condensación de bioesteroles, mediante la cual se forma una interfase coloreada, que al agitarla, el disolvente se tiñe de rojo (Domínguez, 1973).

d) Prueba de Molibdato de amonio:

Utilizado para identificación de terpenos: Se prepara el reactivo con 10 g de molibdato de amonio en 100 ml de H₂SO₄. Calentar a una temperatura no mayor de 70°C y agitar con precaución hasta su completa disolución (realizar este procedimiento en una cabina de extracción). La presencia de terpenos debe producir una coloración azul producto de la reducción del complejo fosfomolibdato en medio ácido (Rojas, 2010).

e) Prueba de Cloruro Férrico (FeCl₃):

Es utilizada para la identificación de fenoles: se prepara agregando de 1 a 2 mg de muestra diluida en etanol (si está en forma de extracto pulverizado), adicionalmente se agregan 4 gotas de FeCl₃. Tomar 0.2 ml de la solución anterior y agregar 1 gota de cloruro férrico al 10%. Los compuestos fenólicos deben producir un cambio a color verde (derivado catecol), azul (derivado pirogarol) o marrón. Esta prueba se base en la formación de complejos y se debe a que el ion cloruro ataca al hidrogeno presente en el grupo hidróxido produciendo una ruptura del enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (Coy, Parra, Cuca, 2014).

f) Prueba de Dragendorff:

Utilizada para identificación de alcaloides: Se prepara una mezcla de dos soluciones (solución A: disolver 8 g de nitrato de bismuto Bi(NO₃)₃ en 20 ml de ácido nítrico (HNO₃) al 30%; Solución B: disolver 27.2 g de Ioduro de potasio en 50 ml de agua.

Se mezclan 5 ml de solución A y 4mL de la solución B, se dejan reposar por 1 día, se decanta y se afora a 100 ml. De ser positivo se presenta un precipitado naranja a rojizo. Esta reacción se fundamenta debido a la capacidad de los alcaloides de formar precipitados coloreados al combinarse con el yodo y metales pesados (Coy, Parra, Cuca, 2014).

g) Prueba de espuma:

Esta prueba es utilizada para identificación de saponinas: En un tubo de ensayo disolver la solución muestra en 10 ml de agua destilada y agitar por 1 minuto. La formación de espuma abundante por más de 15 minutos revela la presencia de saponinas. Es la prueba más sencilla y se fundamenta en las propiedades de las saponinas en reducir la tensión superficial y formar espumas (Aldana, 2010).

h) Prueba de Antrona:

Utilizada para la identificación de glicósidos: Colocar en un tubo de ensayo unas gotas de la solución muestra, posteriormente se adiciona una mezcla de 2ml de una solución de antrona y ácido sulfúrico concentrado (solución recién preparada: 0.012 g de antrona en 6.25mL ácido sulfúrico concentrado). La prueba se considera positiva si se evidencia por la formación de un anillo azul verdoso. Este método es rápido y sencillo, fundamentado en descomponer los carbohidratos por la acción del ácido convirtiéndose en hidroximetilfurfural que al agregarle la antrona, se condensa en complejos coloreados (Aldana, 2010).

i) Prueba de Hidroxamato férrico:

Utilizada para identificación de sesquiterpenlactonas: Colocar la solución muestra en un tubo de ensayo, se añade una gota de cloruro de hidroxilamina 2 N en etanol y una gota de KOH 2 N en etanol. Calentar la mezcla en baño de maría de 5 a 10 minutos a 100°C, se deja enfriar y se acidifica con HCL 0.5 N, después se añade una gota de cloruro férrico al 1%. La presencia de sesquiterpenlactonas se detecta si la solución cambia a color café o violeta, esto se debe a que el cloruro de hidroxilamina transforma las lactonas en ácidos hidroxámicos, que junto con el hierro forman hidroxamato férrico, el cual reacciona cambiando de color (Domínguez, 1973).

j) Prueba de Shinoda:

Utilizada para identificar la presencia de compuestos tipo flavonoides y sus derivados, si la muestra es un extracto etanólico, medir 1 ml de la muestra, después se le agrega 1ml de HCl concentrado y unas láminas de magnesio o zinc metálico, se esperan 5 min (en ocasiones puede durar en reaccionar hasta una hora) y se adiciona 1 ml de alcohol amílico, se mezcla y se deja reposar hasta que se separe. Se considera positivo cuando la parte orgánica se torna de color amarillo pálido para la presencia de flavonoles, el color naranja, carmelita o rojo indica la presencia de flavonoides, esto debido a su núcleo benzopirona que produce coloraciones al reaccionar con magnesio y HCl concentrado (Domínguez, 1973).

k) Prueba de Resina:

Detecta la presencia de resina, adicionando 10 ml de H₂O destilada y 2 ml de la muestra diluida en etanol (si está en forma de extracto pulverizado). Se considera positivo si aparece un precipitado, esto debido a la solubilidad de las resinas en etanol (Calvopiña, 2010).

l) Ensayo de antocianina:

Se utiliza para detectar flavonoides de secuencia estructural C6– C3– C6. Se hierve 5 ml de extracto etanólico por 15 minutos con 2 ml de HCl concentrado, se deja reposar y se agrega 4 ml de alcohol amílico y 2 ml de H₂O. Se mezcla y se deja quieta la solución hasta que se separe. La prueba da positiva para antocianina si el alcohol amílico se torna de color rojo a marrón. Las antocianinas son pigmentos naturales que pertenecen al grupo de los flavonoides, los cuales se estabilizan en medio ácido, en su forma predominante de ion flavilio, tornándose de color rojo al mezclarse con compuestos orgánicos como el alcohol amílico (Calvopiña, 2010).

2.3.1.2. Cromatografía de capa fina (TLC)

Es un análisis simple usado en el laboratorio de química orgánica, de bajo costo y que utiliza menor cantidad de muestra a diferencia de otras técnicas. Esta técnica es empleada principalmente en controles de toda clase de productos naturales, que permite identificar de forma simple y rápida el número de compuestos presentes en un material vegetal, así como también monitorear las reacciones químicas y análisis químico de los productos de una reacción (Palacios, 2013).

Mediante la intensidad de las manchas cromatográficas visualizadas contra patrones adecuados, permite eliminar sustancias de baja calidad, de igual forma mediante patrones es posible identificar la presencia de compuestos específicos dentro de una mezcla. En el TLC la separación de sustancias presentes en una mezcla está determinada por un complejo de propiedades físicas tales como: capacidad de adsorción, solubilidad del soluto, velocidad de difusión, naturaleza del solvente, intercambio iónico, entre otros (Palacios, 2013).

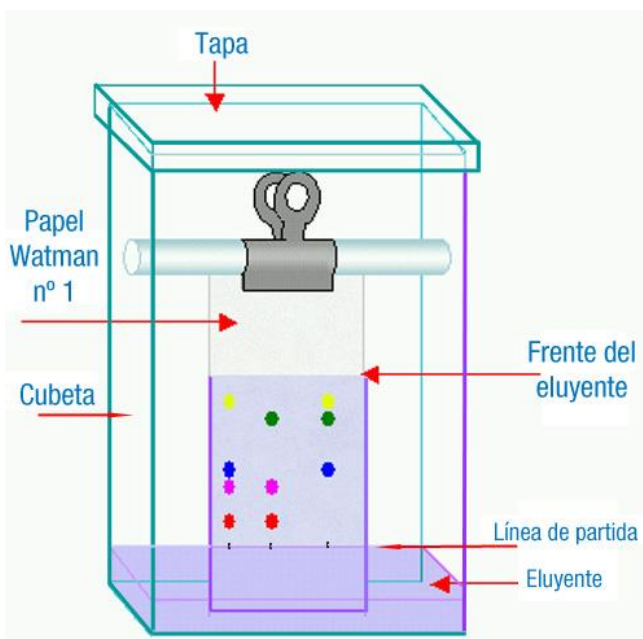


Figura 3. Ilustración de corrida una placa cromatográfica por TLC (Urbina vinos Blog, 2016).

2.3.2. PRUEBAS CUANTITATIVAS

Las pruebas cuantitativas mencionadas a continuación, son las más utilizadas en la literatura reportadas para la identificación y cuantificación de las plantas del género *Kalanchoe*.

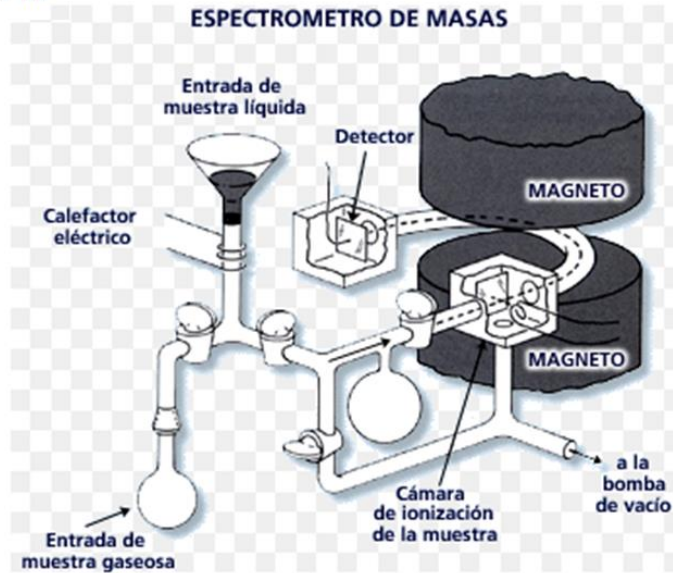
2.3.2.1. Espectrometría de masas

Es una técnica analítica de aplicación generalizada y compleja, que aporta información cualitativa y cuantitativa. Es empleada para determinar la masa exacta de compuestos orgánicos mediante la separación de iones dentro de una muestra que poseen distinta relación con su masa y carga. La mezcla puede estar compuesta de diversos compuestos (orgánicos,

inorgánicos o biológicos), así como también de una misma sustancia o bien por diferentes elementos químicos (Gutiérrez, Droguet, 2002).

Los espectros de masas se producen convirtiendo los compuestos de una muestra en iones en fase gaseosa, los cuales sufren una aceleración en presencia de un campo magnético y se separan en función de su relación masa/carga, su capacidad de identificación es prácticamente inequívoca y produce un espectro característico para cada molécula, proporcionando información de estructuras orgánicas, información isotrópica y puede detectar concentraciones mínimas que van desde ppm, ppb y puede alcanzar hasta los ppt (Gutiérrez, Droguet, 2002).

A.



B.

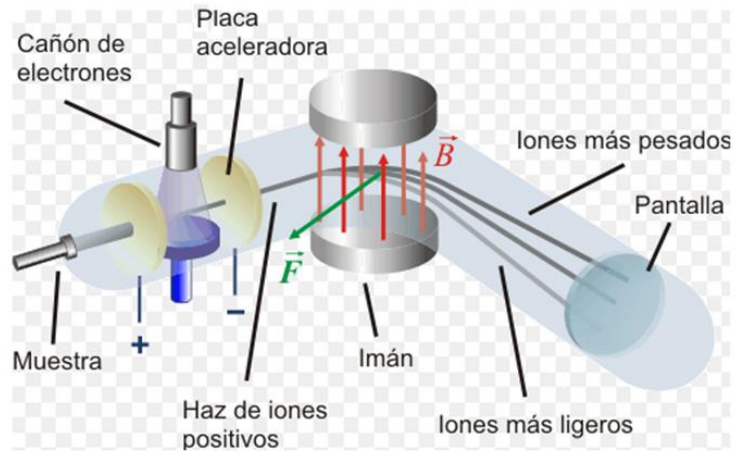


Figura 4. A. Ilustración de un espectrómetro de masa. -B. Cámara de ionización (Pontificia Universidad Católica de Chile, 1999).

2.3.2.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Es una técnica muy sencilla y sensible, indicada para separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla. Esta se puede realizar directamente sobre una muestra siempre

y cuando se encuentre como extracto acuoso o alcohólico, sin tener que realizar etapas anticipadas de purificación, entre otras.

El HPLC separa la mezcla utilizando inicialmente el principio básico de cromatografía de columna y mediante espectroscopia identifica y cuantifica, permitiendo la separación de moléculas muy similares (en algunas ocasiones hasta isómeros), para posteriormente ser analizados por una computadora que muestra en pantalla los resultados. Se puede emplear en una extensa gama de compuestos fijos no volátiles, tales como glucósidos, alcaloides, esteroides, heterósidos, proteínas, lípidos, vitaminas, etc., (Palacios, 2013).

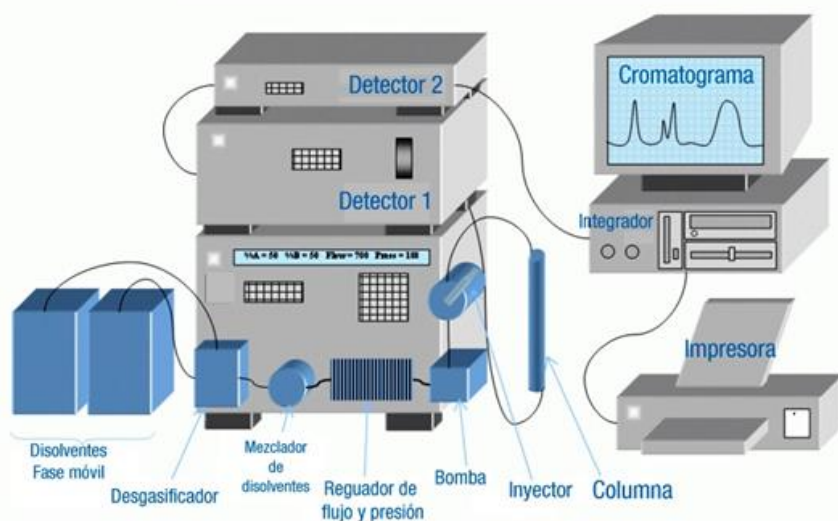


Figura 5. Ilustración de un equipo de HPLC (Urbina vinos Blog, 2016).

2.3.2.3. Cromatografía de Gases (CG)

En la CG se inyecta cantidad de muestra en la fase móvil a una elevada temperatura, que por lo general es un gas inerte como el helio pero también se utiliza el dióxido de carbono, argón, hidrogeno y nitrógeno. Con esta técnica se puede lograr la separación de muestras complejas y sistemas bioquímicos, así como también permite encontrar el número de isótopos de un elemento y determinar los componentes de una muestra de forma cualitativa y cuantitativamente, siempre y cuando el compuesto presente un peso molecular superior a 300 unidades de masa atómica (Gutiérrez, Droguet, 2002). La CG es uno de los métodos analíticos más eficaces usado generalmente para análisis cuantitativo que permite la separación de muestras muy pequeñas y en mejor tiempo, además que trabaja en un extenso rango de temperaturas (hasta 400°C), siendo a su vez su gran limitación.

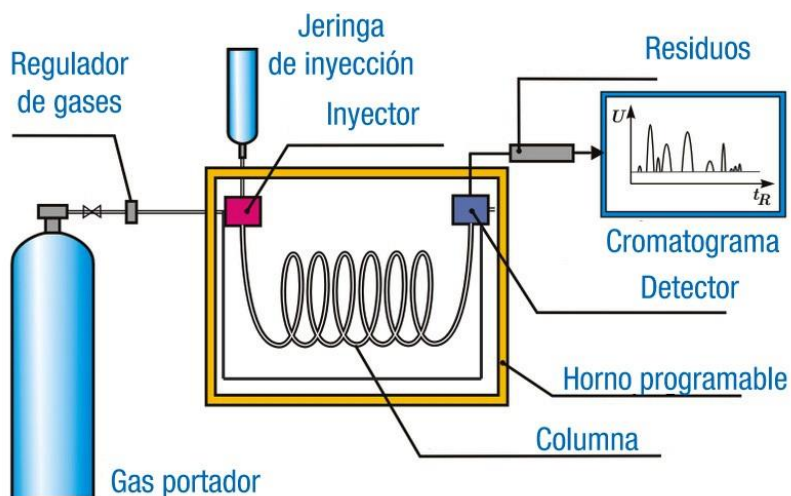


Figura 6. Ilustración de un equipo de CG (Urbina vinos Blog,2016).

2.3.2.7. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/MS)

Debido a que la CG es una técnica de separación que tiene la particularidad de separar mezclas complejas, pero que tiene la desventaja de suministrar únicamente el tiempo de retención de los componentes individuales, la convierte en una técnica insuficientemente y más aún cuando se analizan muestras que presentan una gran variedad de componentes. Mientras que la MS permite identificar de manera inequívoca cualquier componente, pero con la desventaja de no poder identificar sustancias individuales cuando se tiene una mezcla de componentes, por esto la CG/MS es una técnica combinada que permite identificar y separar mezclas complejas (Gutiérrez, Droguet 2002).

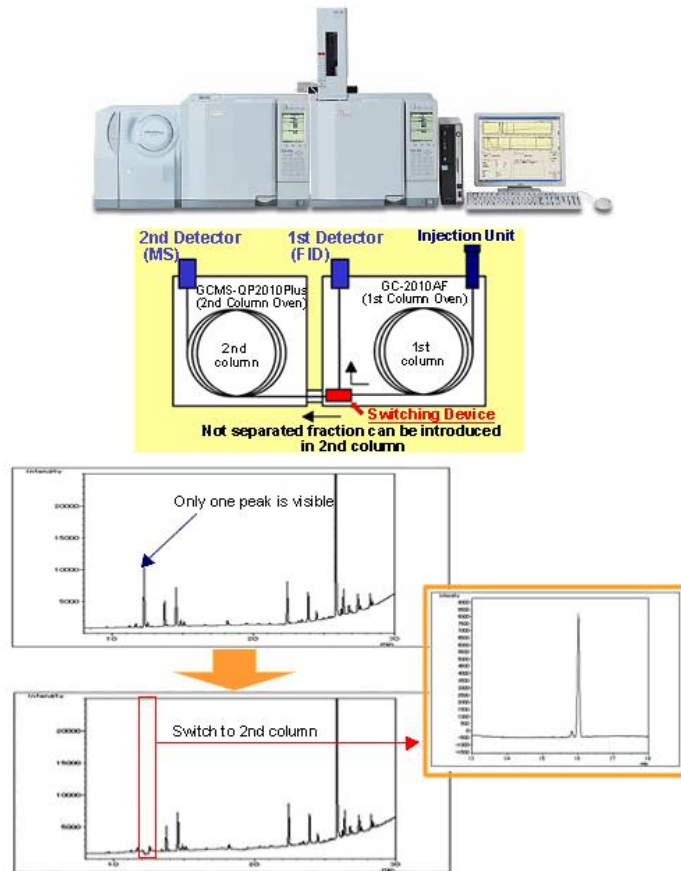


Figura 7. Ilustración de un equipo de CG/MS (Noti jenck, 2008).

2.4. Bacterias

Son microorganismos unicelulares que pueden medir entre 0,5 y 10 μm de longitud, no poseen un núcleo verdadero así como tampoco de cloroplastos y mitocondrias, se reproducen por fisión binaria o división celular sencilla, son móviles y muchas de ellas presentan flagelos u otros sistemas de desplazamiento. Como organismos asexuales que son, las bacterias reproducen copias idénticas, en otras palabras, son clones, con la propiedad de evolucionar debido a mutaciones y a la recombinación genética en el ADN (Bacteria, 2010).

Se cree que las bacterias fueron las primeras formas de vida que habitaron la tierra, hace aproximadamente 4 mil millones de años y hasta finales del siglo XVII, fueron descritos por Antonie Van Leeuwenhoek, cuando detalló las excepcionales observaciones con un microscopio sencillo construido por él (Calvopiña, 2010).

Las bacterias más dañinas pueden producir intoxicaciones, contaminar alimentos y producir enfermedades tales como tuberculosis, sífilis, tétano, entre otras, pero afortunadamente la mayoría se cura con antibióticos (Calvopiña, 2010). Solo 200 especies de bacterias son

causantes de enfermedades humanas conocidas. Estas infecciones bacterianas varían mucho en función de las especies, así como también de las condiciones del organismo huésped, estas infecciones se pueden evitar destruyendo la bacteria con calor, tal como se realiza en una pasteurización o esterilización (Biónica, 2008).

Cuando se originan las infecciones bacterianas, estas se tratan comúnmente con antibióticos, pero el uso inadecuado e innecesario de estos compuestos en los últimos años ha promovido el desarrollo de bacterias no susceptibles a los efectos de los antibióticos. Dentro de las principales bacterias causantes de infecciones y de mayor resistencia a los antibióticos se encuentran el *Staphylococcus aureus* y el *Escherichia coli* (Biónica 2008).

2.4.1. *Staphylococcus aureus*

Se tratan de cocos gram positivos con diámetros entre 0.5 y 1.5 μm que poseen tendencia a aglomerarse en racimos similares a uvas. Tienen una forma esférica (cocal) y se encuentran generalmente en la nariz (vestíbulo nasal) y en zonas húmedas como axilas y pliegues inguinales. Se estima que la población adulta sana es portadora nasal del 30% y otro 20% aproximadamente lo portan en la piel. Los estafilococos desarrollan de forma rápida mecanismos para resistir a los agentes antimicrobianos y se transmiten de una generación de microorganismos a otra, por lo que resulta difícil su tratamiento (Sejia, 2010).

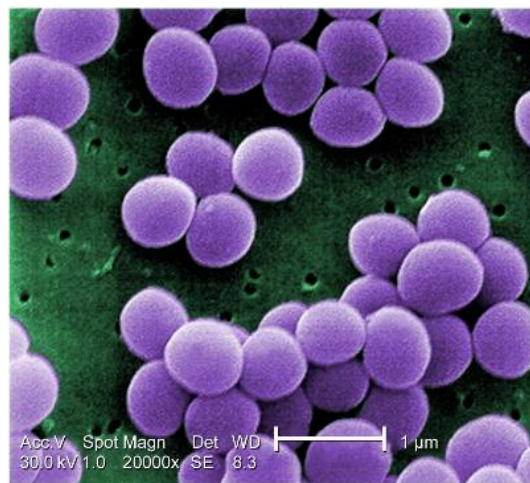


Figura 8. *Staphylococcus aureus* teñida como gran negativo (Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo, 2012).

Los *Staphylococcus* son causantes de neumonía (infección pulmonar), infecciones en la piel, intoxicación por alimentos, osteomielitis (infección en los hueso) e intoxicación sanguínea (bacteriemia). Como agente secundario interviene en la viruela, angina séptica, escarlatina, tuberculosis y neumonía. Las infecciones en la piel son las más comunes, se desarrollan en un folículo piloso y pueden parecerse a las espinillas, el área afectada normalmente se torna color rojo y se inflama, y a muchas ocasiones puede tener pus u otras secreciones. Pueden evolucionar a impétigo, el cual es un salpullido contagioso y que desarrolla una costra en la piel, por lo general son ampollas grandes enrojecidas e inflamadas que se siente caliente al tacto (Merchant, 1980).

La sangre normalmente es un medio estéril, pero en ocasiones la presencia de bacterias (bacteriemia) especialmente infectados por *Staphylococcus aureus* que sean resistentes a meticilina (SARM), se convierte en un tratamiento costoso. El *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) comprende a las cepas no susceptibles a antibióticos betalactámicos y se asocia tradicionalmente a infecciones nosocomiales, se estima que el 41% de la infecciones está relacionada con malos procedimientos médicos y debido a esto, la infecciones ocurren con mayor frecuencia en hospitales llegando a infectar dispositivos protésicos intravasculares y catéteres endovenosos. Este cambio en la incidencia de las enfermedades infecciosas por *S. aureus*, está promoviendo una urgente necesidad de mejorar las estrategias para evitar contagios, así como también el desarrollo de mejores antibióticos que prevengan y traten las infecciones producidas por esta bacteria (Tibavizco, 2007; Paz, 2008; Álvarez, 2010). En la mayoría de los casos, la resistencia a los antibióticos está codificada por genes transportados en plásmidos, lo que explica la rápida propagación de bacterias resistentes, de igual forma *S. aureus* son muy capaces de desarrollar resistencia a los agentes antimicrobianos comúnmente utilizados, como la eritromicina la ampicilina, meticilina y la tetraciclina (Álvarez, 2010)

2.4.2. Escherichia coli

Son microorganismos causantes de infecciones bacterianas y es el principal representante del género *Escherichia*, se puede encontrar como parte normal del tracto gastrointestinal del ser humano y los animales como flora normal, sin embargo, existen cepas tóxicas que producen diarreas y que pueden dar lugar a síntomas infecciosos leves o evolucionar hasta diarreas

constantes y producir complicaciones que pueden ocasionar la muerte del paciente. Las *Escherichia coli* son bacilos gram-negativos, no esporulante, que fermentan la lactosa y la glucosa con producción de gas, convierten los nitratos a nitritos y encentrándose distribuidos por toda naturaleza, muchas de sus especies habitan en el intestino de personas y animales de sangre caliente. La *E. coli* puede provocar infecciones en las heridas, en el tracto biliar, peritonitis, gastroenteritis infantil, neumonía, septicemia y meningitis neonatal, entre otras menos importantes. Aunque *E. coli* hace parte del tubo digestivo, algunos tipos pueden causar infecciones en determinadas situaciones, como son las infecciones urinarias producto de una emigración desde el intestino, provocando una infección urinaria y posteriormente bacteriemia, que para el caso de bebés o personas con sistema inmunitario débil, puede ser mortal (Calvopiña, 2010).

E. coli pueden adaptarse a nuevos entornos, en varios casos adversos, debido a que intercambia material genético a través de plásmidos y bacteriófagos, promoviendo el surgimiento de agentes patógenos con una mejor supervivencia y persistencia (FAO, 2011).

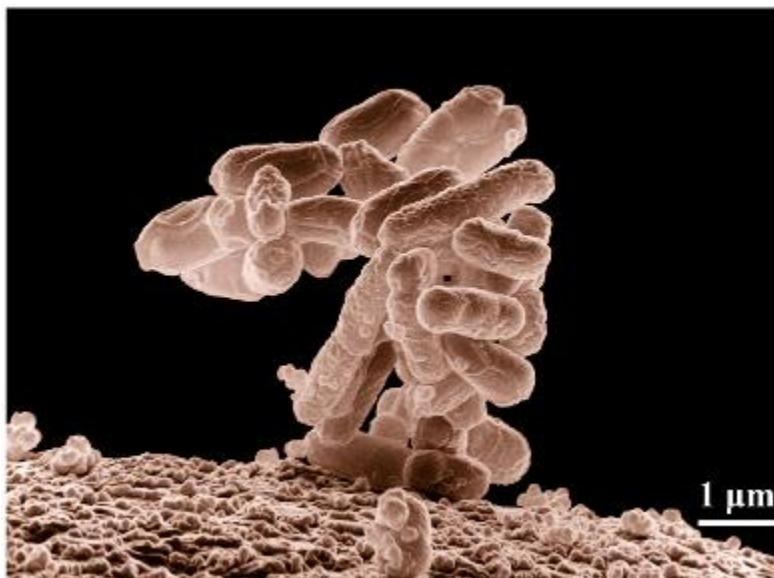


Figura 9. Fotografía 3D de *E. coli* (FAO, 2011).

2.5 Métodos para la evaluación del carácter antimicrobiano de un compuesto

Los métodos de evaluación antimicrobiana son utilizados en los últimos años, como la forma eficaz para evaluar la actividad antimicrobiana de compuestos, sustancias, entre otros. Cabe

resaltar que la eficacia de cada método de evaluación puede verse afectada por distintas causas, como son: El tiempo de incubación, la temperatura, el medio de cultivo utilizado, el pH, el origen de la muestra, entre otros (Reyes, Palou, López (2014).

Los métodos mayormente utilizados son el de difusión en pozo, susceptibilidad por difusión de agar, susceptibilidad por difusión en disco y concentración mínima inhibitoria.

2.5.1 Método de difusión en pozo

Es una técnica en la que se inocula la caja de Petri con el microorganismo a evaluar y se adicionan 20 ml de agar TSA (Trypticase Soya) a cada caja Petri, se deja solidificar el agar y se abren posos de 0.5 mm de diámetro mediante la utilización de una pipeta Pasteur previamente esterilizada. Luego se agrega 10, 20 o 40 µl de la sustancia a evaluar y se dejan incubar a 37°C por un lapso de 24 a 72 horas. La actividad antimicrobiana se evidencia por medio de la presencia de halos de inhibición de crecimiento en cada uno de los pozos ensayados individualmente (Ríos, Recio, Villar, 1988).

2.5.1 Susceptibilidad por difusión de agar

En las técnicas de susceptibilidad por dilución en agar, la muestra (antimicrobiano) se diluye de forma gradual en varias concentraciones ya sea por medio de cultivos líquidos (caldo) o sólidos (agar). Cuando se realiza por medio líquido, la muestra que contiene el antimicrobiano se coloca en el primer tubo y se diluye de forma escalonada en varios de ellos. Al final del ensayo se tendrá una cantidad paulatinamente menor del agente antimicrobiano con un rango de concentraciones que simulan aquellas que se lograrían en suero. Después de sembrar cada tubo, se incuban durante 24 horas a 35 °C y se observan buscando la concentración más baja del agente antimicrobiano que haya inhibido completamente el crecimiento bacteriano (Domínguez, 2004).

2.5.3 Susceptibilidad por difusión en disco

La difusión en disco o antibiograma, es una de las técnicas clásica en microbiología y que más se utiliza en los laboratorios debido a su eficiencia y costo. En resumen, en esta técnica el antibiótico o agente antimicrobiano es aplicado sobre un disco de papel filtro para posteriormente depositarlo sobre el agar ya uniformemente inoculado. Se incuban durante 24

horas a 35 °C y si este es susceptible al agente antimicrobiano se formara una zona circular clara que se extenderá hasta el límite dado por la concentración alcanzada. El diámetro del anillo sin crecimiento bacteriano indicará el grado de susceptibilidad del organismo al antibiótico, indicándose como susceptible, susceptible intermedio o resistente, según sea el caso (Domínguez, 2004).

2.5.4 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se define como la concentración más baja a la que un agente antimicrobiano evita el crecimiento visible de bacterias. Los métodos más utilizados de CMI son los de difusión, ya sea por medio de cultivos líquidos (caldo) o sólidos (agar). Se procede realizando diluciones dobles seriadas del agente antimicrobiano deseado, el cual, se enfrenta a un caldo bacteriano, la concentración mínima inhibitoria se expresa en unidades/ml o µg/ml (Aripaca, 2009).

CAPITULO 3. ENSAYOS CUALITATIVOS DE CARACTERIZACIÓN QUÍMICA EN LAS PLANTAS DEL GÉNERO *KALANCHOE*

En este capítulo se realiza una descripción de los ensayos cualitativos que constituyen el primer eslabón en la química analítica y brindan información sobre la composición química de un material, sustancia o una mezcla de compuestos químicos que permiten identificar los constituyentes de dicha sustancia (Centro de control estatal de equipos médicos, 1999). El análisis cualitativo se fundamenta en el empleo de reacciones químicas como redox, ácido-base, formación de complejos o precipitación, los cuales son identificados por los sentidos humanos, así como también mediante instrumentos ópticos, térmicos, electroanalíticos, entre otros, que permitan la identificación de la muestra (Raba, Messina, Bertolino, Pereira, Aranda, 2018).

Contenido

3.1 Tamizaje fitoquímico	44
3.2 Cromatografía de capa fina.....	46

3.1 Tamizaje fitoquímico

En la literatura se encontraron diferentes estudios de análisis fitoquímicos realizados en plantas del género *Kalanchoe* que se describen a continuación:

En 2010, Calvopiña realizó un tamizaje fitoquímico a las hojas de la *Kalanchoe pinnata* en extracto etéreo, seco, etanólico, acuoso y tintura al 20%. Para la elaboración de los extractos etéreo, acuoso y etanólico, peso 10 g de muestra y les realizó extracciones sucesivas con el fin de obtener una mayor extracción del material vegetal seco, utilizando solventes de menor a mayor polaridad, iniciando con el éter de petróleo, después realizó la extracción con etanol y posteriormente con agua.

Para elaborar las tinturas, las obtuvo secando, tamizando y pulverizando el material vegetal, como solvente utilizo etanol al 70 %. Por medio de la maceración, usó 100 g del material vegetal pulverizado y completo volumen a 500 ml con etanol al 70 %, para obtener así la tintura al 20 %. Después de 1 semana de maceración, realizó la debida filtración del extracto y procedió a envasarlo en un frasco ámbar para evitar que la luz lo degradara.

Para elaborar el extracto seco, tomo como base la tintura al 20 %, a continuación, procedió a evaporar 500 ml de esta tintura en un roto evaporador hasta eliminar prácticamente el solvente y lograr adquirir una masa homogénea.

Los resultados y ensayos fitoquímicos que realizó Calvopiña (2010) fueron:

ENSAYOS	ACUOSO	ETÉREO	EXT. SECO	ETANÓLICO	TINTURA
Saponinas (Espuma)	-	*	+	+	+
Flavonoides (Shinoda)	-	*	+	+	-
Triterpenos y/o Esteroides (Liebermann-Burchard)	*	*	-	+	+
Aminoácidos libres (Nihidrina)	*	*	+	+	+
Fenoles y/o Taninos (Cloruro férrico)	*	*	+	+	+
Quinonas (Borntrager)	*	*	-	+++	+++
Carbohidratos reductores (Fehling)	-	*	+	+	+
Ácidos grasos (Sudan III)	*	+	*	*	*
Mucilagos	+	*	*	-	*
Coumarinas (Balject)	*	+	+	+	+
Alcaloides (Mayer)	-	-	+	+++	+++
Antocianidinas	*	*	+	+	+
Resinas	*	*	-	-	-

Leyenda: * = No realizado - = Ausencia + = Presencia ++ y +++ = Abundante

Tabla 2. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos etanólico, etéreo, seco y acuso de la planta *Kalanchoe pinnata* (Calvopiña, 2010).

Con esta investigación Calvopiña (2010) encontró que las plantas del género *Kalanchoe* en los extractos alcohólicos, tintura y seco son ricas en metabolitos secundarios, presentando una cantidad abundante de alcaloides y quinonas, los cuales son compuestos con actividad antibacteriana.

Villamizar et al (2014) también realizó un tamizaje fitoquímico a las hojas de la *Kalanchoe pinnata* en extracto etanólico al 70%.

ENSAYOS	ETANÓLICO
Saponinas (Espuma)	-
Saponinas (Rosenthaler)	-
Flavonoides (Shinoda)	+
Carotenoides (Salkowski)	-
Quinonas (Rodamina)	-
Quinonas (Amoniaco)	-
Triterpenos y/o Esteroides (Liebermann-Burchard)	+
Coumarina (Fluorescencia)	-
Cardiotónicos (Balject)	++
Coumarinas (Erlich)	-
Fenoles y/o Taninos (Cloruro férrico)	+++
Fenoles y/o Taninos (Acetato de plomo)	+++
Alcaloides (Valser)	-
Alcaloides (Dragendorff)	-
Alcaloides (Mayer)	-
Leyenda: - = Ausencia + = Presencia ++ y +++ = Abundante	

Tabla 3. Resultados del tamizaje fitoquímico de la planta *Kalanchoe pinnata* en extracto alcohólico al 70% (Villamizar et al., 2014)

Mediante ese estudio Villamizar et al (2014), sugirieron la presencia de esteroides, tripterpenos, taninos, flavonoides y cardiotónicos.

En la india, Bhatti et al (2012) realizaron varias pruebas analíticas identificado los constituyentes activos mediante varias pruebas preliminares en los diversos extractos de

Kalanchoe crenata, como fueron: esteroides, glucósidos, alcaloides, flavonoides, carbohidratos y fenoles. Los constituyentes fitoquímicos presentes en los extractos de tallos y hojas de la *K. Crenata* se presentan en la **Figura 10 y 11**.

S.No.	Type of constituents	Pet.Ether	Benzene	Chloroform	Acetone	Ethanol	Water
1	Alkaloid	-	-	-	-	+	-
2	Flavonoid	-	-	-	+	+	-
3	Saponin	-	-	-	+	+	+
4	Carbohydrate	+	+	+	+	+	+
5	Phytosterol	+	+	+	+	+	+
6	Tannin	-	-	-	+	+	+
7	Phenolic	-	-	+	+	+	-
8	Coumarin	-	-	-	-	-	-
9	Cardiac glycoside	-	-	+	+	+	+
10	Anthraquinone	-	-	+	+	-	-
11	Essential oil	+	-	-	-	-	-

Figura 10. Tamizaje fitoquímico de diversos extractos de hojas de *K. Crenata* (Bhatti, Kamboj, Kumar, 2012).

S.No.	Type of constituents	Pet.Ether	Benzene	Chloroform	Acetone	Ethanol	Water
1	Alkaloid	-	-	-	-	+	-
2	Flavonoid	-	-	-	+	+	-
3	Saponin	-	-	-	+	+	+
4	Carbohydrate	+	+	+	+	+	+
5	Phytosterol	+	+	+	+	+	+
6	Tannin	-	-	-	+	+	-
7	Phenolic	-	-	-	+	+	-
8	Coumarin	-	-	-	-	-	-
9	Cardiac glycoside	-	-	-	+	+	-
10	Anthraquinone	-	-	-	-	-	-
11	Essential oil	-	-	-	-	-	-

Figura 11. Tamizaje fitoquímico de diversos extractos de raíces de *K. Crenata* (Bhatti, Kamboj, Kumar, 2012).

Con las pruebas analíticas que realizó Bhatti et al (2012), logro comprobar que los extractos de tallos y hojas de la *K. Crenata* obtenidos con acetona, etanol y agua presentan mayor cantidad de compuestos.

3.2 Cromatografía de capa fina (CCF)

La CCF es un criterio parcial de identificación de una sustancia en la que entran en juego varios criterios, como la polaridad del eluyente, la fase móvil, la fase estacionaria, entre otras, lo cual determinara la efectividad de la misma.

Arias (2011), realizó la identificación preliminar de algunos metabolitos presentes en las plantas del género *Kalanchoe* por CCF, las plantas utilizadas fueron la *Kalanchoe pinnata*, *Kalanchoe gantos-bonnieri* y *Kalanchoe flammea* las cuales se extrajeron en acetato de etilo, etanol y hexano. Después procedió a la estandarización de distintas fases móviles [Tabla 4] con sus reveladores específicos.

EXTRACTOS		DISOLVENTES	RELACIÓN
K. pinnata	Etanol	Metanol / tetracloruro de carbono	1:1
	Acetato de etilo	Cloroformo / hexano / tolueno / acetato de etilo	3:1:1:1
	Hexano	Hexano / cloroformo	1:9
K. gastonis bonnierii	Etanol	Metanol / Benceno / Tetracloruro de carbono	3:1:1
	Acetato de etilo	Benceno / Metanol / Cloroformo / éter de petróleo	5:2:2:1
	Hexano	Hexano / Cloroformo / Acetato de etilo / Tolueno	1:3:1:1
K. flammea	Etanol	Benceno / metanol / acetato de etilo	1:3:1
	Acetato de etilo	Diclorometano / metanol / éter de petróleo / hexano	5:2:2:1
	Hexano	Hexano / cloroformo / acetato de etilo / tolueno	1:3:1:1

Tabla 4. Fases móviles usadas en la CCF de los tres extractos de *Kalanchoe* (Arias, 2011).

Por medio de CCF Arias (2010) detectó la presencia de fenoles, ácidos grasos insaturados, alcaloides, aldehídos, aminas, cetonas, aminoácidos, flavonoides y triterpenos. Estos resultados se pueden observar a continuación:

Revelador	Yodo	Sulfato sérico amoniacal / H ₂ SO ₄	UV	2,4-dinitrofenilhidrazina	FeCl ₃ / C ₆ FeK ₄ N ₆	Dragendorff-Modificación de Mounier
Prueba Positiva/Negativa	+++++	++++	++++	++	++	-
Grupo funcional identificado	Ácidos grasos insaturados	General	General	Aldehídos y cetonas	Fenoles	
Placa	Rf ₅ =0.625 → Rf ₂ =0.5 → Rf ₄ =0.375 → Rf ₃ =0.3 → Rf ₂ =0.2 → Rf ₁ =0.1 →	Rf ₃ =0.75 → Rf ₂ =0.7 → Rf ₁ =0.015 →	Rf ₄ =0.675 → Rf ₃ =0.45 → Rf ₂ =0.275 → Rf ₁ =0.175 →	Rf ₂ =0.775 → Rf ₁ =0.175 →	Rf ₂ =0.15 → Rf ₁ =0.1 →	

Figura 12. Resultado del extracto de *Kalanchoe gastonis* en acetato de etilo (Arias, 2011)

Revelador	Liebermann-Buchard	Vainillina/H ₂ SO ₄	Reactivo Citrobórico	Reactivo de Borntrager	KOH/Etanol	Vainillina/KOH
Prueba Positiva/Negativa	+	-	++	-	++	-
Grupo funcional identificado	Triterpenos	-	Flavonoides	-	Cumarinas volátiles	-
Placa	Rf ₁ =0.125 →		Rf ₂ =0.55 → Rf ₁ =0.125 →	Rf ₃ =0.45 → Rf ₂ =0.25 → Rf ₁ =0.125 →		

Figura 13. Resultado del extracto de *Kalanchoe gastonis* en acetato de etilo (Arias, 2011)

Revelador	Yodo	Sulfato sérico amoniaco / H ₂ SO ₄	UV	2,4-dinitrofenilhidrazina	FeCl ₃ / C ₆ FeK ₄ N ₆	Dragendorff-Modificación de Mounier
Prueba Positiva/Negativa	+++++	+++++	++	-	-	-
Grupo funcional identificado	Ácidos grasos insaturados	General	General	-	-	-
Placa	 Rf ₅ =0.9 → Rf ₄ =0.8 → Rf ₃ =0.75 → Rf ₂ =0.2 → Rf ₁ =0.1 →	 Rf ₅ =0.9 → Rf ₄ =0.8 → Rf ₃ =0.75 → Rf ₂ =0.2 → Rf ₁ =0.1 →	 Rf ₂ =0.275 → Rf ₁ =0.175 →			

Figura 14. Resultado del extracto de *Kalanchoe gastonis* en hexano (Arias, 2011).

Revelador	Liebermann-Buchard	Vainillina/H ₂ SO ₄	Reactivo Citrobórico	Reactivo de Borntrager	KOH/Etanol	Vainillina/KOH
Prueba Positiva/Negativa	+	-	+	+	-	-
Grupo funcional identificado	-	-	Flavonoides	Derivados antracénicos	-	-
Placa			 Rf ₁ =0.125 →	 Rf ₁ =0.125 →		

Figura 15. Resultado del extracto de *Kalanchoe gastonis* en hexano (Arias, 2011).

Revelador	Yodo	Sulfato sérico amoniacoal / H ₂ SO ₄	UV	2,4-dinitrofenilhidrazina	FeCl ₃ / C ₆ FeK ₄ N ₆	Dragendorff-Modificación de Mounier
Prueba Positiva/Negativa	++++	+++	+++	++	+	+
Grupo funcional identificado	Ácidos grasos insaturados	General	General	Aldehídos y cetonas	Fenoles	Alcaloides
Placa	 Rf ₄ =0.925 Rf ₃ =0.85 Rf ₂ =0.375 Rf ₁ =0.075	 Rf ₃ =0.85 Rf ₂ =0.75 Rf ₁ =0.275	 Rf ₃ =0.875 Rf ₂ =0.6 Rf ₁ =0.1	 Rf ₂ =0.2 Rf ₁ =0.075	 Rf ₁ =0.1	 Rf ₁ =0.2

Figura 16. Resultado del extracto etanólico de *Kalanchoe gastonis* (Arias, 2011).

Revelador	Liebermann-Buchard	Vainillina/H ₂ SO ₄	Reactivo Citrobórico	Reactivo de Borntrager	KOH/Etanol	Vainillina/KOH
Prueba Positiva/Negativa	+	-	++	-	++	-
Grupo funcional identificado	Triterpenos	-	Flavonoides	-	Cumarinas volátiles	-
Placa	 Rf ₁ =0.125	 Rf ₁ =0.125	 Rf ₂ =0.55 Rf ₁ =0.125	 Rf ₃ =0.45 Rf ₂ =0.25 Rf ₁ =0.125	 Rf ₁ =0.125	 Rf ₁ =0.125

Figura 17. Resultado del extracto etanólico de *Kalanchoe gastonis* (Arias, 2011).







Revelador	Lieberman n-Buchard	Vainillina/H ₂ SO ₄	Reactivo Citrobórico	Reactivo de Borntrager	KOH/Etanol	Vainillina/KO H
Prueba Positiva/Negativa	-	-	-	-	-	-
Grupo funcional identificado	-	-	-	-	-	-
Placa						

Figura 18. Resultado del extracto hexánico de *Kalanchoe pinnata* (Arias, 2011).







Revelador	Yodo	Sulfato sérico amoniacoal / H ₂ SO ₄	UV	2,4- dinitrofenilhidra- zina	FeCl ₃ / C ₆ FeK ₄ N ₆	Dragendorff- Modificación de Mounier
Prueba Positiva/Negativa	+++++	+++++++	+	+++	+++	-
Grupo funcional identificado	Ácidos grasos insaturados	General	General	Aldehídos y cetonas	Fenoles	-
Placa						

Figura 19. Resultado del extracto hexánico de *Kalanchoe pinnata* (Arias, 2011).

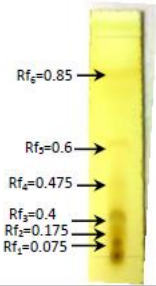
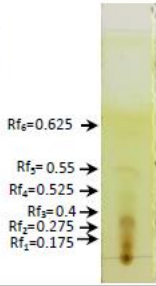
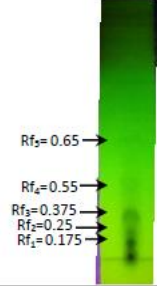
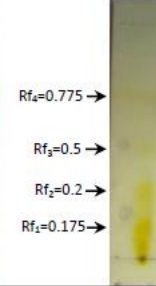
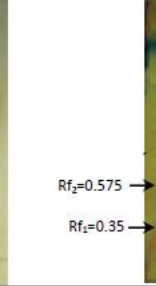

Revelador	Yodo	Sulfato sérico amoniacal / H ₂ SO ₄	UV	2,4-dinitrofenilhidrazina	FeCl ₃ / C ₆ FeK ₄ N ₆	Dragendorff-Modificación de Mounier
Prueba Positiva/Negativa	+++++	+++++	+++++	++++	+++	++
Grupo funcional identificado	Ácidos grasos insaturados	General	General	Aldehídos y cetonas	Fenoles	Alcaloides
Placa	 Rf ₆ =0.85 → Rf ₅ =0.6 → Rf ₄ =0.475 → Rf ₃ =0.4 → Rf ₂ =0.175 → Rf ₁ =0.075 →	 Rf ₆ =0.625 → Rf ₅ =0.55 → Rf ₄ =0.525 → Rf ₃ =0.4 → Rf ₂ =0.275 → Rf ₁ =0.175 →	 Rf ₅ =0.65 → Rf ₄ =0.55 → Rf ₃ =0.375 → Rf ₂ =0.25 → Rf ₁ =0.175 →	 Rf ₄ =0.775 → Rf ₃ =0.5 → Rf ₂ =0.2 → Rf ₁ =0.175 →	 Rf ₂ =0.575 → Rf ₁ =0.35 →	 Rf ₁ =0.2 →

Figura 20. Resultado del extracto de *Kalanchoe pinnata* en acetato de etilo (Arias, 2011).







Revelador	Liebermann-Buchard	Vainillina/H ₂ SO ₄	Reactivo Citrobórico	Reactivo de Borntrager	KOH/Etanol	Vainillina/KOH
Prueba Positiva/Negativa	-	-	-	++	++	++
Grupo funcional identificado	-	-	-	Derivados antracénicos libres	Cumarinas volátiles	Aminoácidos y aminas
Placa			 Rf ₂ =0.25 → Rf ₁ =0.075 →	 Rf ₂ =0.25 → Rf ₁ =0.075 →	 Rf ₂ =0.25 → Rf ₁ =0.075 →	 Rf ₂ =0.25 → Rf ₁ =0.075 →

Figura 21. Resultado del extracto de *Kalanchoe pinnata* en acetato de etilo (Arias, 2011).

Revelador	Yodo	Sulfato sérico amoniacal / H ₂ SO ₄	UV	2,4-dinitrofenilhidrazina	FeCl ₃ / C ₆ FeK ₄ N ₆	Dragendorff-Modificación de Mounier
Prueba Positiva/Negativa	+++	++++	+++	++	+	++
Grupo funcional identificado	Ácidos grasos insaturados	General	General	Aldehídos y cetonas	Fenoles	Alcaloides
Placa	 Rf ₃ =0.75 → Rf ₂ =0.5 → Rf ₁ =0.25 →	 Rf ₄ =0.875 → Rf ₃ =0.625 → Rf ₂ =0.25 → Rf ₁ =0.125 →	 Rf ₃ =0.75 → Rf ₂ =0.5 → Rf ₁ =0.25 →	 Rf ₁ =0.5 → Rf ₂ =0.775 →	 Rf ₁ =0.8 →	 Rf ₂ =0.85 → Rf ₁ =0.2 →

Figura 22. Resultado del extracto etanólico de *Kalanchoe pinnata* (Arias, 2011).

Revelador	Liebermann-Buchard	Vainillina / H ₂ SO ₄	Reactivo Citrobórico	Reactivo de Bortrager	KOH/Etanol	Vainillina/KOH
Prueba Positiva/Negativa	++	-	+	+	+	-
Grupo funcional identificado	Triterpenos	-	Flavonoides	Derivados antracénicos libres	Cumarinas volátiles	-
Placa	 Rf ₂ =0.95 → Rf ₁ =0.5 →	 Rf ₁ =0.325 →	 Rf ₁ =0.375 →	 Rf ₁ =0.3 →	 Rf ₁ =0.3 →	 Rf ₁ =0.3 →

Figura 23. Resultado del extracto etanólico de *Kalanchoe pinnata* (Arias, 2011).

Revelador	Yodo	Sulfato sérico amoniacal / H ₂ SO ₄	UV	2,4-dinitrofenilhidrazina	FeCl ₃ / C ₆ FeK ₄ N ₆	Dragendorff-Modificación de Mounier
Prueba Positiva/Negativa	++++	++++	++++	-	-	-
Grupo funcional identificado	Ácidos grasos insaturados	General	General	-	-	-
Placa	 R _{f1} =0.925 → R _{f3} =0.825 → R _{f2} =0.675 → R _{f4} =0.35 →	 R _{f1} =0.775 → R _{f3} =0.55 → R _{f2} =0.325 → R _{f4} =0.45 →	 R _{f1} =0.9 → R _{f3} =0.7 → R _{f2} =0.5 → R _{f4} =0.45 →			

Figura 24. Resultado del extracto etanólico de *Kalanchoe flammea* (Arias, 2011).

Revelador	Liebermann-Buchard	Vainillina/H ₂ SO ₄	Reactivo Citrobórico	Reactivo de Borntrager	KOH/Etanol	Vainillina/KOH
Prueba Positiva/Negativa	-	-	-	-	+	-
Grupo funcional identificado	-	-	-	-	Cumarinas volátiles	-
Placa					 R _{f1} =0.575 →	

Figura 25. Resultado del extracto etanólico de *Kalanchoe flammea* (Arias, 2011).

Revelador	Yodo	Sulfato sérico amoniacal / H ₂ SO ₄	UV	2,4-dinitrofenilhidrazina	FeCl ₃ / C ₆ FeK ₄ N ₆	Dragendorff-Modificación de Mounier
Prueba Positiva/Negativa	++++	+++++	+++	+++	+++	-
Grupo funcional identificado	Ácidos grasos insaturados	General	General	Aldehídos y cetonas	Fenoles	-
Placa	 Rf ₄ =0.725 → Rf ₃ =0.5 → Rf ₂ =0.3 → Rf ₁ =0.125 →	 Rf ₃ =0.75 → Rf ₂ =0.575 → Rf ₃ =0.45 → Rf ₂ =0.275 → Rf ₁ =0.125 →	 Rf ₃ =0.575 → Rf ₂ =0.35 → Rf ₁ =0.15 →	 Rf ₃ =0.625 → Rf ₂ =0.35 → Rf ₁ =0.15 →	 Rf ₃ =0.6 → Rf ₂ =0.35 → Rf ₁ =0.125 →	

Figura 26. Resultado del extracto de *Kalanchoe flammae* en acetato de etilo (Arias, 2011).

Revelador	Liebermann-Buchard	Vainillina/H ₂ SO ₄	Reactivo Citrobórico	Reactivo de Borntrager	KOH/Etanol	Vainillina/KOH
Prueba Positiva/Negativa	-	-	++	++	+++	-
Grupo funcional identificado	-	-	Flavonoides	Compuestos antracénicos	Cumarinas volátiles	-
Placa			 Rf ₂ =0.325 → Rf ₁ =0.125 →	 Rf ₂ =0.25 → Rf ₁ =0.125 →	 Rf ₃ =0.825 → Rf ₂ =0.575 → Rf ₁ =0.375 →	

Figura 27. Resultado del extracto de *Kalanchoe flammae* en acetato de etilo (Arias, 2011).

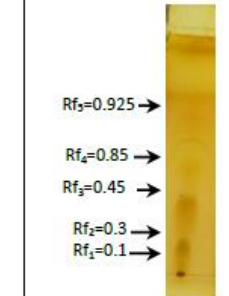
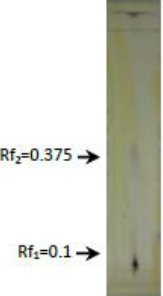


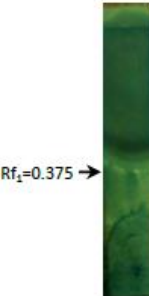

Revelador	Yodo	Sulfato sérico amoniacal / H ₂ SO ₄	UV	2,4-dinitrofenilhidrazina	FeCl ₃ / C ₆ FeK ₄ N ₆	Dragendorff-Modificación de Mounier
Prueba Positiva/Negativa	+++++	++	+++	+	+	-
Grupo funcional identificado	Ácidos grasos insaturados	General	General	Aldehídos y cetonas	Fenoles	-
Placa	 Rf ₅ =0.925 → Rf ₄ =0.85 → Rf ₃ =0.45 → Rf ₂ =0.3 → Rf ₁ =0.1 →	 Rf ₂ =0.375 → Rf ₁ =0.1 →	 Rf ₃ =0.925 → Rf ₂ =0.85 → Rf ₁ =0.1 →	 Rf ₁ =0.1 →	 Rf ₁ =0.375 →	

Figura 28. Resultado del extracto de *Kalanchoe flammea* en hexano (Arias, 2011).







Revelador	Liebermann-Buchard	Vainillina/H ₂ SO ₄	Reactivo Citrobórico	Reactivo de Borntrager	KOH/Etanol	Vainillina/KOH
Prueba Positiva/Negativa	-	-	++	++	-	-
Grupo funcional identificado	-	-	Flavonoides	Compuestos antracénicos	-	-
Placa			 Rf ₁ =0.925 →	 Rf ₁ =0.925 →		

Figura 29. Resultado del extracto de *Kalanchoe flammea* en hexano (Arias, 2011).

En la **Tabla 5** podemos observar un resumen de los principales compuestos identificados por CCF según Arias (2011), para las tres especies de *Kalanchoe*.

EXTRACTOS	ETANOL	ACETATO DE ETILO	HEXANO
<i>K. flammea</i>	Fenoles Aldehídos y cetonas Ácidos grasos insaturados	Compuestos antracénicos Ácidos grasos insaturados Flavonoides Aldehídos y cetonas Cumarinas Fenoles	Cumarinas volátiles Fenoles Aminoácidos y aminas Triterpenos Aldehídos y cetonas Flavonoides
<i>K. pinnata</i>	Compuestos antracénicos Ácidos grasos insaturados Fenoles Aldehídos y cetonas Triterpenos Alcaloides Flavonoides	insaturados Ácidos grasos Fenoles Aldehídos y cetonas	Flavonoides Ácidos grasos insaturados Aldehídos y cetonas Aminoácidos y aminas
<i>K. gastonis bonnieri</i>	Cumarinas Ácidos grasos insaturados Triterpenos Fenoles	Fenoles Ácidos grasos insaturados Triterpenos Aldehídos y cetonas Flavonoides Compuestos antracénicos Cumarinas	Triterpenos Aminoácidos y aminas Compuestos antracénicos Fenoles

Tabla 5. Grupos funcionales identificados mayoritariamente en las especies de *Kalanchoe* (Arias, 2011)

De igual forma Pérez (2015) evaluó los grupos químicos presentes de los compuestos en los extractos etanólicos de tallos y raíces silvestres e in vitro de *Kalanchoe daigremontiana* mediante CCF, así como también a cultivos en suspensión.

En la **Figura 30 y 31** se observan 3 bandas amarillas que corresponden a flavonoides, presentado más intensidad en las hojas silvestres con respecto al tallo. En la **Figura 30**, Pérez (2015) utilizó como revelador el reactivo NP/PEG (Polietilenglicol) fase reversa (7:3 v/v agua: etanonitrilo) en luz UV a 365 nm y en la **Figura 31** utilizó como revelador el reactivo NP/PEG (Polietilenglicol) fase reversa (95:5 v/v cloruro de metileno: metanol) en luz UV a 365 nm.

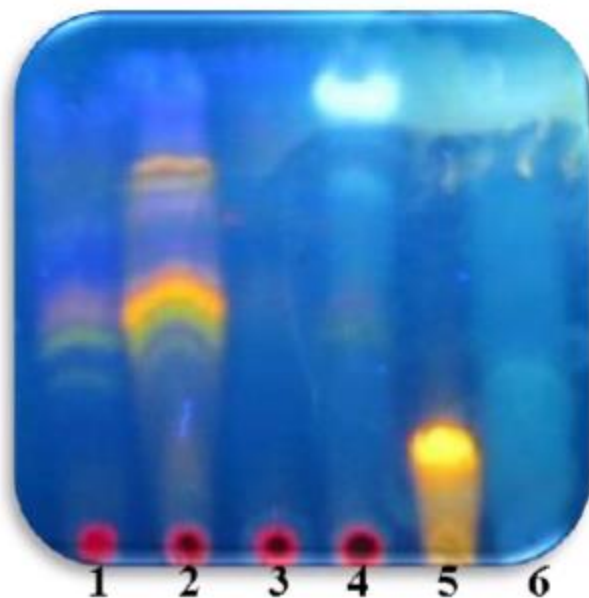


Figura 30. CCF Análisis cualitativos de extracto de *K. daigremontiana* revelada con NP/PEG fase reversa (7:3 v/v agua: etanonitrilo) en luz UV a 365 nm. **1.** Tallo silvestre, **2.** Hoja silvestre, **3.** Tallas in vitro, **4.** Hojas in vitro, **5.** Quercetina y **6.** Cultivos en suspensión (Pérez, 2015).

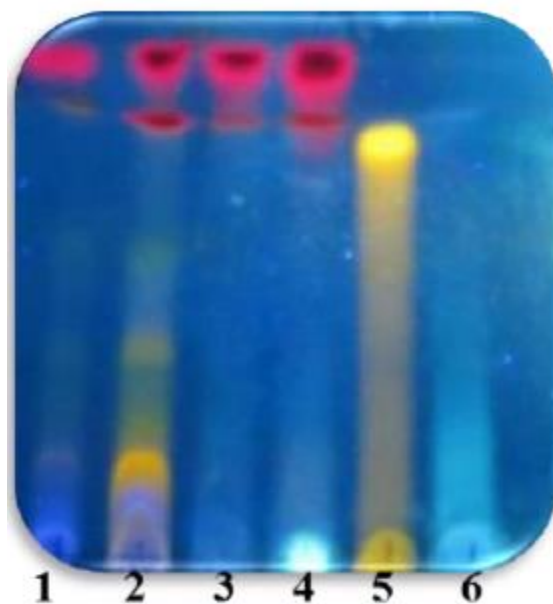


Figura 31. CCF Análisis cualitativos de extracto de *K. daigremontiana* revelada con NP/PEG fase normal (95:5 v/v cloruro de metileno: metanol) en luz UV a 365 nm. **1.** Tallo silvestre, **2.** Hoja silvestre, **3.** Tallas in vitro, **4.** Hojas in vitro, **5.** Quercetina y **6.** Cultivos en suspensión (Pérez, 2015).

En la **Figura 32 y 33**, se observan bandas de color azul y morado que indican principalmente la presencia de terpenos y aceites esenciales, y bandas de color café indican presencia de

polisacáridos, todas presentes en las hojas y tallos silvestres. En la **Figura 30**, Pérez (2015) utilizó como revelador el reactivo KOM (komarowsky) fase reversa (7:3 v/v agua: etanonitrilo) y en la **Figura 31** utilizó como revelador el reactivo KOM (komarowsky) fase normal (95:5 v/v diclorometano: metanol).

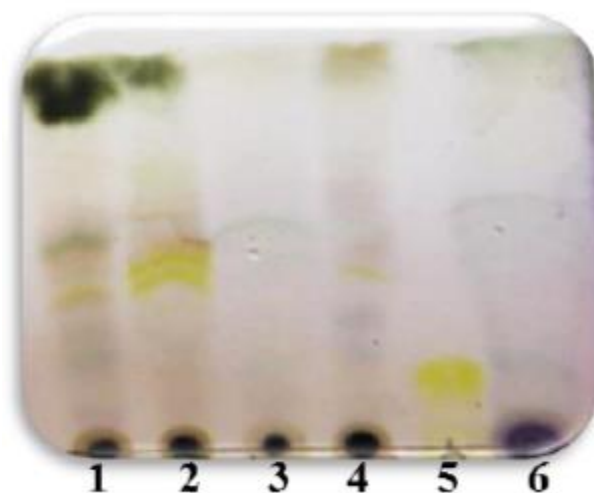


Figura 32. CCF Análisis cualitativos de extracto de *K. daigremontiana* revelada con KOM (komarowsky) fase reversa (7:3 v/v agua: etanonitrilo). **1.** Tallo silvestre, **2.** Hoja silvestre, **3.** Tallas in vitro, **4.** Hojas in vitro, **5.** Quercetina y **6.** Cultivos en suspensión (Pérez, 2015).

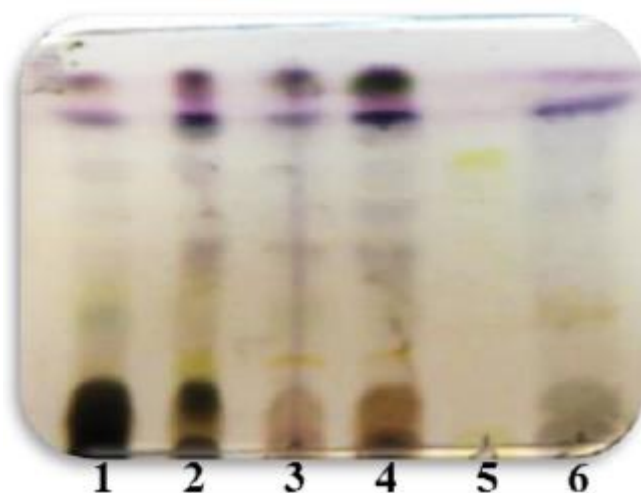


Figura 33. CCF Análisis cualitativos de extracto de *K. daigremontiana* revelada con KOM (komarowsky) fase normal (95:5 v/v diclorometano: metanol). **1.** Tallo silvestre, **2.** Hoja silvestre, **3.** Tallas in vitro, **4.** Hojas in vitro, **5.** Quercetina y **6.** Cultivos en suspensión (Pérez, 2015).

Con el estudio realizado, Pérez (2015) observó que los tallos y hojas in vitro y en suspensión de la *K. daigremontiana* no presentan compuestos de tipo flavonoides a diferencia que los tallos y hojas silvestres si contienen una gran concentración de compuestos de este tipo. De

igual forma realizó un fraccionamiento en columna abierta de fase normal para el extracto de *Kalanchoe daigremontiana* en diclorometano.

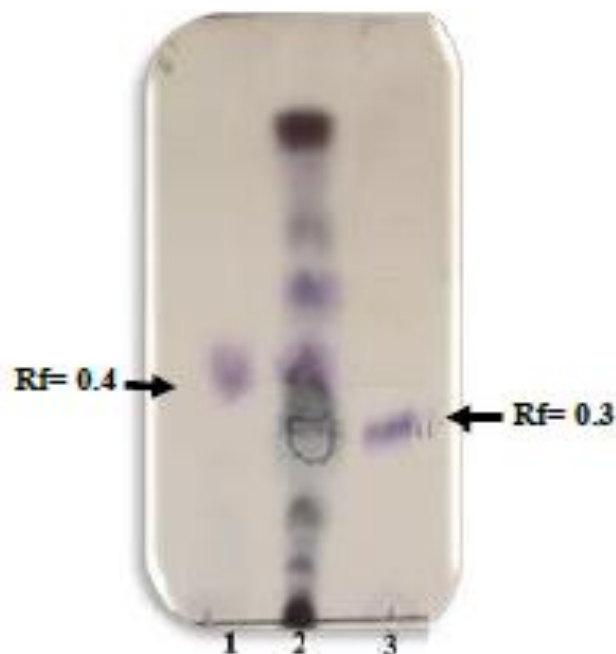


Figura 34. CCF Análisis cualitativos de extracto de *K. daigremontiana* revelada con KOM en columna abierta de fase normal (97:3 v/v diclorometano: metanol). 1. Estándar de b-sisterol. 2. Extracto de *K. daigremontiana*. 3. Estándar de ursolico (Pérez, 2015)

Este análisis le permitió identificar los compuestos B-sisterol (Rf: 0.4) y Ursolico (Rf: 0.3). El b-sisterol pertenece al grupo de los fitoesteroles, empleado para curar el cáncer de próstata, el ácido ursólico es un compuesto triterpenico que se sintetiza a partir del escualeno, presentando propiedades anticancerígenas, antimicrobianas, antiinflamatorio, antiviral, etc., (Pérez, 2015).

CAPITULO 4. ENSAYOS CUANTITATIVOS DE CARACTERIZACIÓN QUÍMICA EN LAS PLANTAS DEL GÉNERO *KALANCHOE*

En este capítulo se realiza una descripción de los ensayos cuantitativos encontrados en la literatura, los cuales se basan en la determinación y cuantificación de la muestra dada en una sustancia, en otras palabras, determina la proporción de los constituyentes de una muestra (Raba, Messina, Bertolino, Pereira, Aranda, 2018).

Contenido

4.1 Espectrometría de masas	60
4.2 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	62
4.3 Cromatografía de gases	70
4.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	73

4.1 Espectrometría de Masas

Majaz y col., (2011) analizaron por MS la raíz de *Kalanchoe pinnata*, las raíces fueron pulverizadas en un molino, el polvo obtenido lo tamizaron a través de una malla de 125 μm para eliminar los polvos finos y utilizar solo el polvo grueso para la extracción. La extracción la realizó mediante cloroformo.

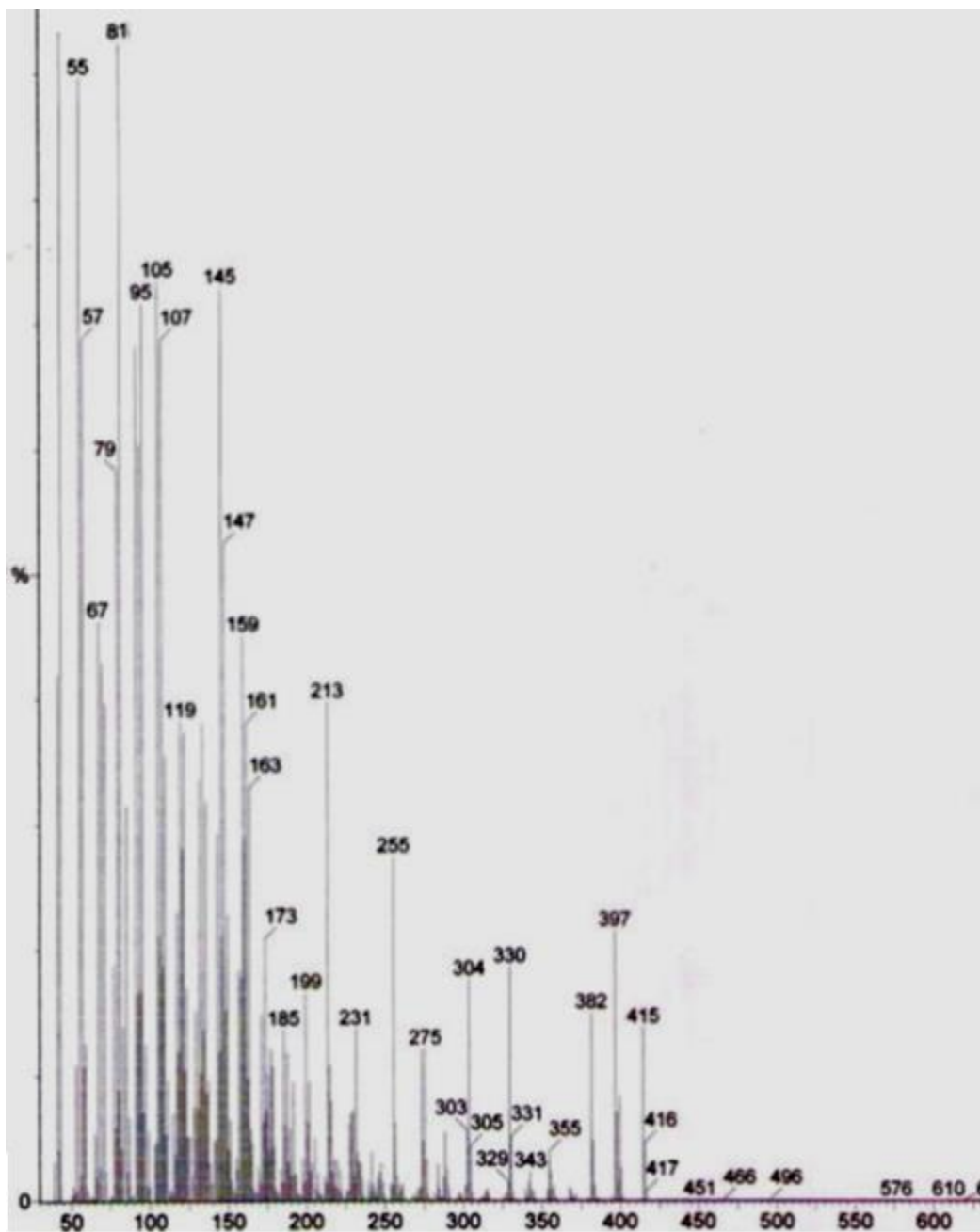


Figura 35. M/S para el extracto de *Kalanchoe pinnata* en cloroformo (Majaz, Nazim, Shaikh, Gomase, Choudhari, 2011).

Hit	REV	for	Compound name	M.W.	Formula	CAS	Library
1	851	658	Campesterol	400	C28H48O	474-62-4	Nbs
2	828	728	Cholesta-5- ene, 3-ol, (3 beta)-carbanochloridate	448	C28H45O2Cl	7144-08-3	Nist
3	818	669	Cholesterol	386	C27H46O	57-88-5	Nbs
4	817	675	Beta-sitosterol acetate	456	C31H52O2	915-05-9	Nbs
5	811	687	Cholest-5- ene, 3bromo-, (3 beta)-	448	C27H44Br	516-91-6	Nist
6	789	696	Gamma-sitosterol	414	C29H50O	83-47-6	Nbs
7	779	684	Cholest-3- en-3-ol (3 beta)-propanoate	442	C30H50O2	633-61-8	Nist
8	772	582	Cholesterol	386	C27H46O	57-88-5	Nbs
9	767	608	Methyl(25RS)-3beta acetox-5-cholestin-26-oate	472	C30H48O4	103160-13-0	Nist
10	764	671	Cholesta-3, 5-diene	368	C27H44	747-90-0	Nbs
11	757	665	Cholesta-3, 5-diene	368	C27H44	747-90-0	Nbs
12	756	635	Cholest-5- en-3-ol (3 beta)-tetradecanoate	596	C41H72O2	1989-52-2	Nist
13	752	570	Cholest-5- ene, 3methoxy-, (3 beta)-	384	C47H82O2	1174-92-1	Nbs
14	740	460	3-B-phenpxy-24-nor-cholan-5,20(22)-diene	404	C29H40O	1000148-77-6	
15	735	645	Cholesta-3,5-diene	368	C27H44	747-90-0	Nbs
16	724	508	Cholane-5,20(22)-diene-3b-phenoxy	418	C30H42O	10014-88-4	Nist
17	719	534	5-(7a-isopropenyl-4,5-dimethyl-octahydroinden-4-yl)	288	C20H32O	1000193-54-2	Nist
18	719	586	Cholest-8- en- (3 beta)-ol, acetate	428	C29H48O2	17137-74-5	Nist
19	715	605	21-acetoxypregnenolone	374	C23H34O4	566-78-9	Nist
20	701	371	Pregna-3, 5-dien-20-one	298	C21H30O	1093-87-4	Nbs

Figura 36. Lista de compuestos probable por MS para el extracto de *Kalanchoe pinnata* en cloroformo (Majaz, Nazim, Shaikh, Gomase, Choudhari, 2011)

La espectroscopia de masas realizada por Majaz (2011) muestra la presencia de esteroides y varias moléculas de azúcar.

De Oliveira et al (2015) realizaron análisis por espectrometría de masas a las hojas frescas de *Kalanchoe brasiliensis*, la extrajeron en etanol al 50% (agua: etanol, v/v) por turbo extracción durante 5 min (planta: solvente, 1:1, p/v). La materia prima fue triturada y extraída al mismo tiempo en una licuadora industrial. Luego, filtro el extracto hidroetanolico y lo secó en un Rotavapor (45 °C) y lo liofilizó para el análisis de MS y HPLC. Posteriormente analizó el extracto etanólico *K. brasiliensis* por MS mediante infusión directa, utilizando la bomba de jeringa (300 ml/h). Diluyó el extracto en metanol: agua 9:1 (v/v) y lo inyectó directamente en el espectrómetro de masas. El espectro obtenido fue en alta resolución, el gas seco fue nitrógeno, el flujo fue 4 L/min y la temperatura de 180 °C. El análisis MS se realizó con diferentes colisiones de energía. La señal m/z 623 se aisló y, después de la activación por colisión, proporcionó el espectro MS (**Figura 37**).

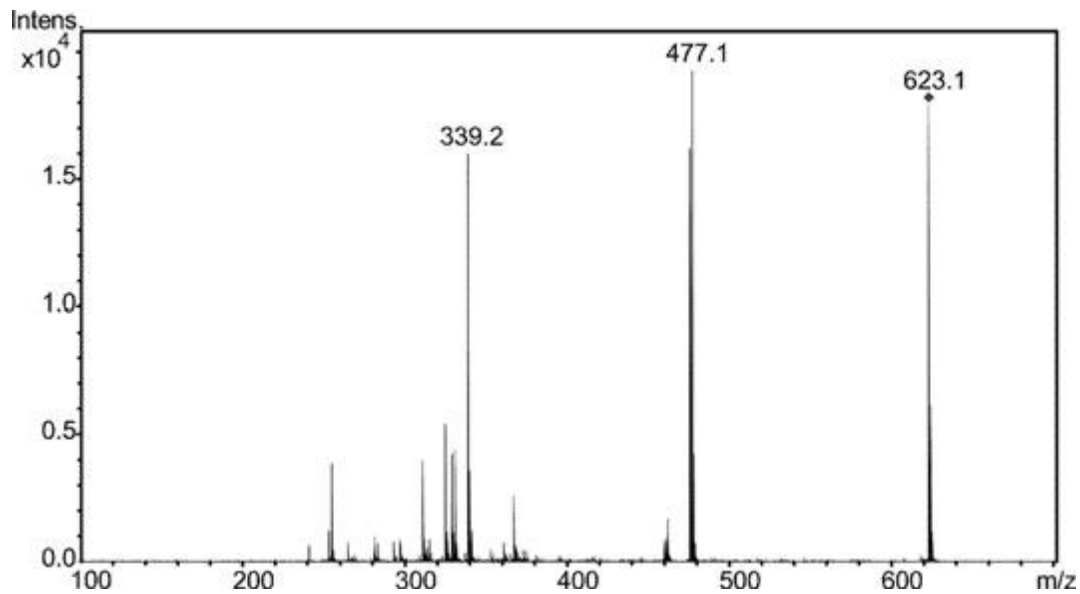


Figura 37. M/S del extracto de *Kalanchoe brasiliensis* (De Oliveira et al., 2015)

MS-MS		
Compound	Molecular Formule	[M-H] ⁻ m/z
Ext. Kalanchoe	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₆	623

Figura 38. Identificación por M/S del extracto de *Kalanchoe brasiliensis* (De Oliveira et al., 2015)

Mediante este análisis, De Oliveira et al (2015) identificaron un compuesto fenólico aislado de hojas de *K. brasiliensis* e identificado por análisis de MS como la patuletina (3-O-a-L-ramnopiranosil-7-O-a-L-ramnopiranosida). Este compuesto puede ser usado como marcador químico para contribuir al control de calidad de los derivados obtenidos con esta especie. Además, desarrolló un método preciso y reproducible de HPLC que se desarrollada en el siguiente numeral, el cual permite aplicar al control de calidad de las hojas y medicamentos a base de hierbas de *K. brasiliensis*.

4.2 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Majaz, Nazim, Shaikh, Gomase, Choudhari (2011) efectuaron análisis fitoquímicos al extracto en cloroformo de las raíces de *Kalanchoe pinnata*, mediante la cual identificaron flavonoides y esteroides.

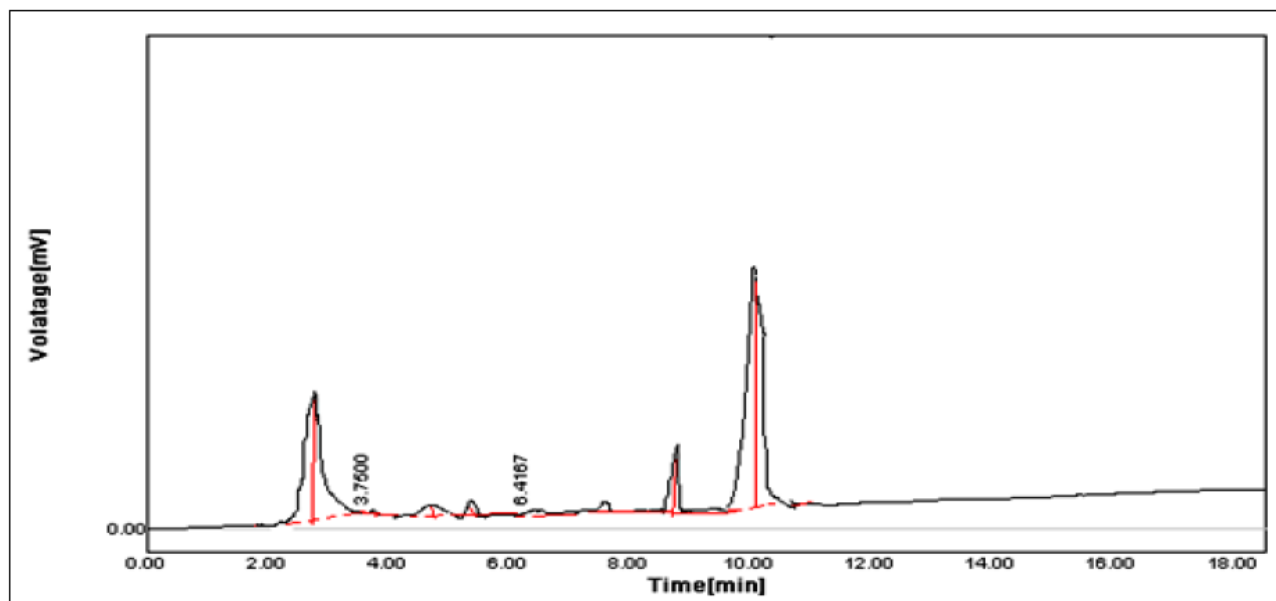
Sistema cromatográfico por HPLC para esteroides:

- Columna C18 (250 mm × 4.6 mm), 5µm.
- Velocidad de flujo: 1 ml / min
- Fase móvil: metanol: agua (95: 5)
- Detección a 210 nm [**Figura 31**].

Sistema cromatográfico por HPLC para flavonoides:

- Columna C18 (250 mm × 4.6 mm), 5µm.
- Velocidad de flujo: 1 ml / min
- Fase móvil: acetonitrilo: tampón fosfato pH 2,4 (25:75)
- Detección a 266 nm (**Figura 40**).

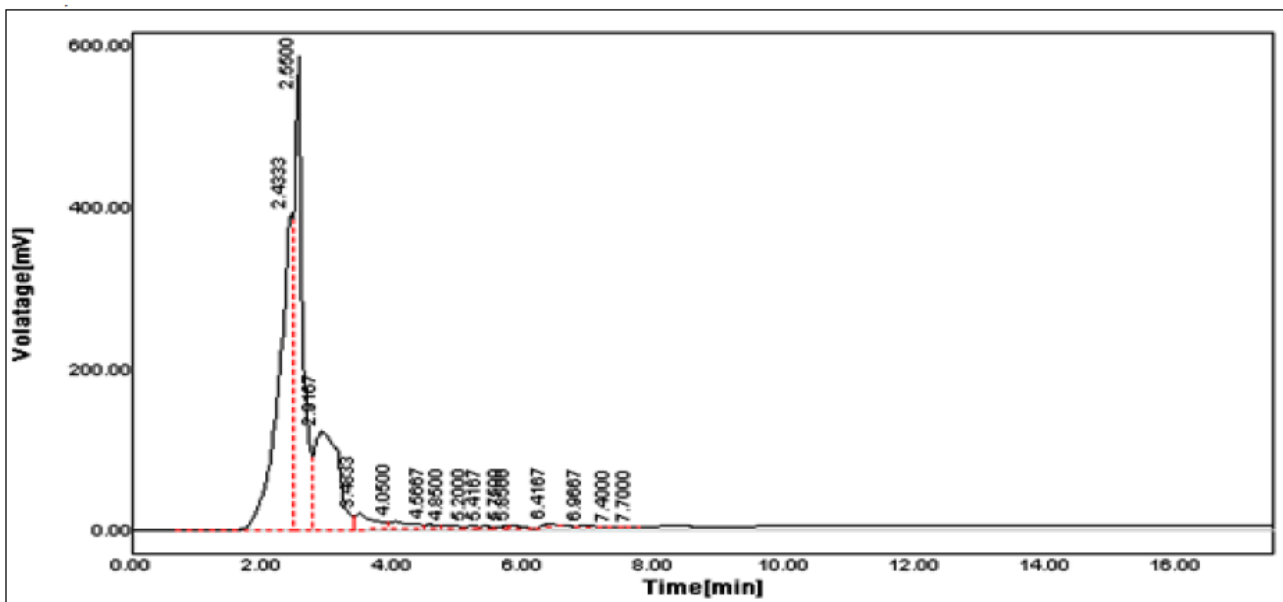
El análisis de los flavonoides en el extracto de la planta *Kalanchoe pinnata* en cloroformo mostro 8 compuestos [**Figura 39**], después de compararlos con el tiempo de retención estándar de varios flavonoides, identificó un pico en 7.8920 y 10.1563 que está más cerca del colesterol y del B-sitosterol respectivamente (Majaz, Nazim, Shaikh, Gomase, Choudhari (2011)).



S. No.	Name	RT[min]	Area[mV*s]	Area%	TP	TF	Resolution
1		2.8167	285.2793	24.96	1955.3	8.6667	0.0000
2		3.7500	9.0759	0.79	5729.1	1.1429	0.1622
3		4.8500	38.1647	3.34	198.4	1.4286	0.0269
4		5.4167	44.1830	3.86	208.5	1.0833	0.1667
5		6.4167	8.7238	0.76	4193.6	1.0385	0.9375
6		7.8920	10.2466	0.89	11835.9	0.9286	0.8571
7		8.7418	167.2904	14.64	135.0	0.7143	1.5775
8		10.1563	579.5357	50.72	2683.9	1.3333	0.6667
Sum			1142.49				

Figura 39. Cromatograma y resultado por HPLC para extracto en cloroformo para esteroides de raíces de *kalanchoe pinnata* (Majaz, Nazim, Shaikh, Gomase, Choudhari, 2011).

En el análisis de los flavonoides en el extracto de la planta *Kalanchoe pinnata* en cloroformo mostro 15 compuestos [Figura 40] después de compararlos con el tiempo de retención estándar de varios flavonoides, identifico un pico de 7.400, que está más cerca de la miricetina (Majaz, Nazim, Shaikh, Gomase, Choudhari, 2011).



S. No.	Name	RT[min]	Area[mV*s]	Area%	TP	TF	Resolution
1		2.4333	5665.9653	37.51	14.9	0.7500	0.0000
2		2.5500	5225.7778	34.60	2649.1	1.0000	0.1120
3		2.9167	3129.7407	20.72	866.4	1.6111	1.0476
4		3.4833	414.4306	2.74	747.6	1.2000	1.0625
5		4.0500	234.2879	1.55	300.7	1.0000	0.6667
6		4.5667	84.4501	0.56	14.1	1.1667	0.1512
7		4.8500	86.1647	0.57	2.2	1.4286	0.0269
8		5.2000	45.6691	0.30	863.7	1.0833	0.0432
9		5.4167	44.1830	0.29	208.5	1.0833	0.1667
10		5.7500	42.2993	0.28	4858.2	0.6000	1.4286
11		5.8500	48.9324	0.32	23.6	2.8750	0.3243
12		6.4167	65.7003	0.43	3653.1	0.8571	0.1838
13		6.9667	9.1030	0.06	2422.2	1.4000	0.9429
14		7.4000	4.7364	0.03	9034.4	1.0000	0.8387
15		7.7000	2.2466	0.01	11835.9	0.9286	0.8571
Sum			15103.6875				

Figura 40. Cromatograma y resultado por HPLC para extracto en cloroformo para flavonoides de raíces de *kalanchoe pinnata* (Majaz, Nazim, Shaikh, Gomase, Choudhari, 2011).

Como conclusión Majaz et al (2011), lograron identificar el **colesterol** con un TR en 7.8920, el **B-sitosterol** con TR en 10.1563 y la **miricetina** con un TR de 7.400.

Pérez (2015) analizó la *Kalanchoe daigremontiana* mediante HPLC para identificar los flavonoides más abundantes, para esto utilizó como estándar de referencia el glucósido de quercetina [Figura 42].

Sistema cromatográfico:

- Detección: Se realizó a diferentes longitudes de onda, 205 nm para terpenos y ácidos grasos, 240 nm para iridoides, 280 – 300 nm para compuestos fenólicos y 360 nm para flavonoides.
- Sistema eluyente: gradiente de agua-acetonitrilo
- Velocidad de flujo: 1ml/min
- Volumen de inyección: 20 µL.
- Columna de fase reversa licrosphere 100 RP-18 (5µm) sorbent con un detector de arreglo de diodos y un módulo de separación [Figura 42 y 43].

Fase móvil utilizada por Pérez (2015):

Tiempo (min)	Flujo (min/ml)	Agua	Acetonitrilo
	1.00	100	0
1.00	1.00	100	0
2.00	1.00	90	10
4.00	1.00	90	10
5.00	1.00	80	20
7.00	1.00	80	20
8.00	1.00	75	25
11.00	1.00	75	25
12.00	1.00	60	40
14.00	1.00	60	40
15.00	1.00	20	80
16.00	1.00	20	80
17.00	1.00	0	100
18.00	1.00	0	100
19.00	1.00	100	0
20.00	1.00	100	0
22.00	1.00	100	0

Figura 41. Fase móvil para análisis por HPLC para identificar los flavonoides en la planta *Kalanchoe daigremontiana* (Pérez, 2015).

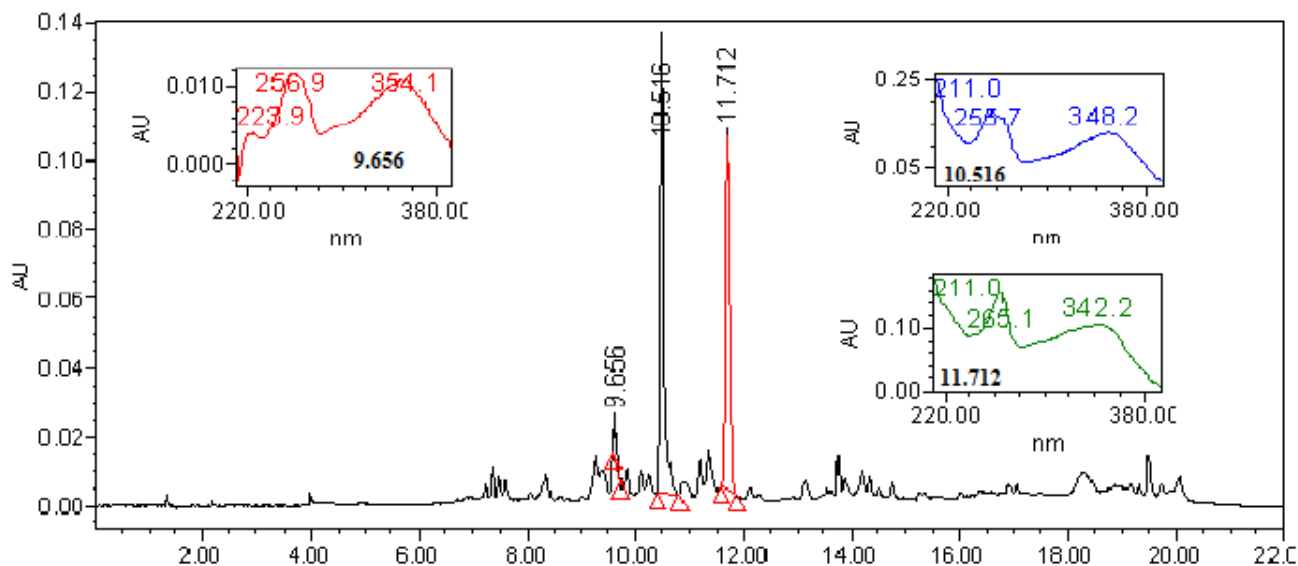


Figura 42. Perfil cromatográfico mediante HPLC para extracto metanólico de *K. daigremontiana* (Pérez, 2015).

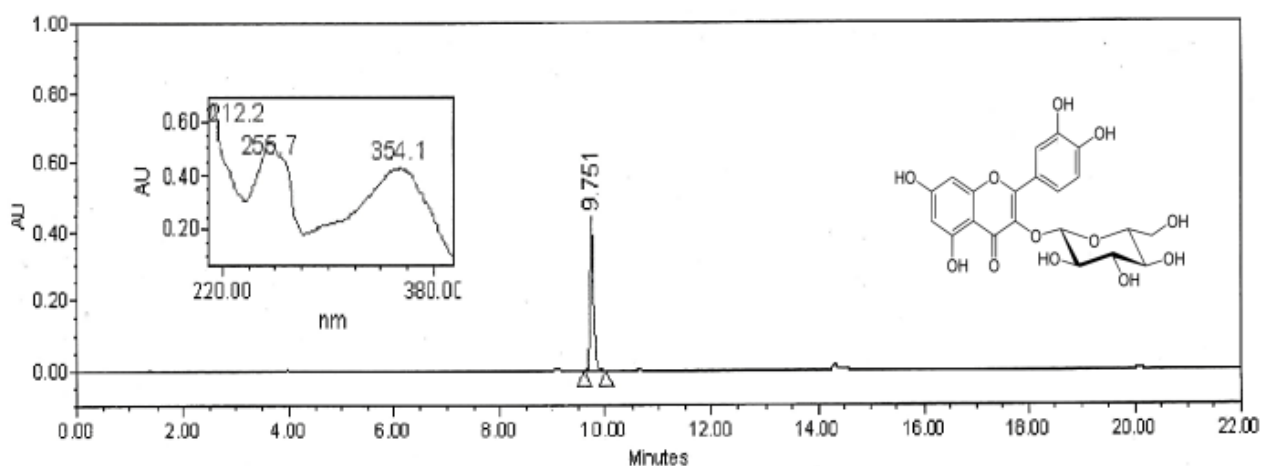


Figura 43. Perfil cromatográfico mediante HPLC para glucósido de quercetina (Pérez, 2015).

En la **Figura 42** se observan tres compuestos con tiempo de retención de 9.656, 10.516 y 11.712 minutos, el primero fue identificado como un compuesto tipo **flavonol**; el segundo con un espectro de absorción de 348 nm es característico de flavonas, en este caso **luteolina**; y por último, con un espectro de absorción de 342 nm es característico de **5, 7, 8-trihidroxi flavona 7-O- glucurónido**. La **Figura 43** corresponde al pico de **glucósido de quercetina** (Tiempo de retención: 9.751 min), mismo que encontró Pérez (2015) en las hojas de *K. daigremontiana* (Tiempo de retención: 9.656 min), pero en bajas concentraciones.

Un grupo de científicos franceses identificaron la presencia de otros tipos de moléculas como flavonoides en hojas de *Kalanchoe pinnata* mediante HPLC de fase reversa. Utilizaron dos

métodos diferentes, uno para la separación de ácidos fenólicos y otro para los flavonoides (Abdellaoui, Destandau, Toribio, Elfakir, Lafosse, Renimel, André, Cancellieri, Landemarre, 2010).

Para el análisis de ácidos fenólicos, el método fue optimizado a partir de una mezcla estándar de cinco ácidos fenólicos (ácidos gálico, cafeico, cumarico, ferrulico y cinamico).

Sistema cromatográfico:

- Longitud de onda: 366 nm.
- Columna: Alltima C18 (150 × 4.6 mm), tamaño de partícula de 5 µm
- Temperatura ambiente
- Fase móvil: Agua: Metanol, que contiene 1% de ácido fórmico
- Velocidad de flujo: 1 ml/min

Tiempo (min)	Flujo (min/mL)	Ácido acético al 1%	Metanol
0 - 5	1	95	5
10-15	1	90	10
20-25	1	80	20
40-60	1	60	40

Figura 44. Fase móvil para separación de ácido fenólicos (Abdellaoui, Destandau, Toribio, Elfakir, Lafosse, Renimel, André, Cancellieri, Landemarre, 2010).

Sistema cromatográfico para la separación de los flavonoides:

- Longitud de onda: 366 nm.
- Columna: Alltima C18 (150 × 4.6 mm), tamaño de partícula de 5 µm
- Temperatura ambiente
- Velocidad de flujo: 1 ml/min
- Fase móvil: Agua: Metanol, que contiene 1% de ácido acético.

Tiempo (min)	Flujo (min/mL)	Ácido fórmico al 1%	Metanol
0 - 5	1	95	5
10-15	1	80	20
20-30	1	50	50
40-45	1	20	80
55 -65	1	0	100

Figura 45. Fase móvil para separación de flavonoides (Abdellaoui, Destandau, Toribio, Elfakir, Lafosse, Renimel, André, Cancellieri, Landemarre, 2010).

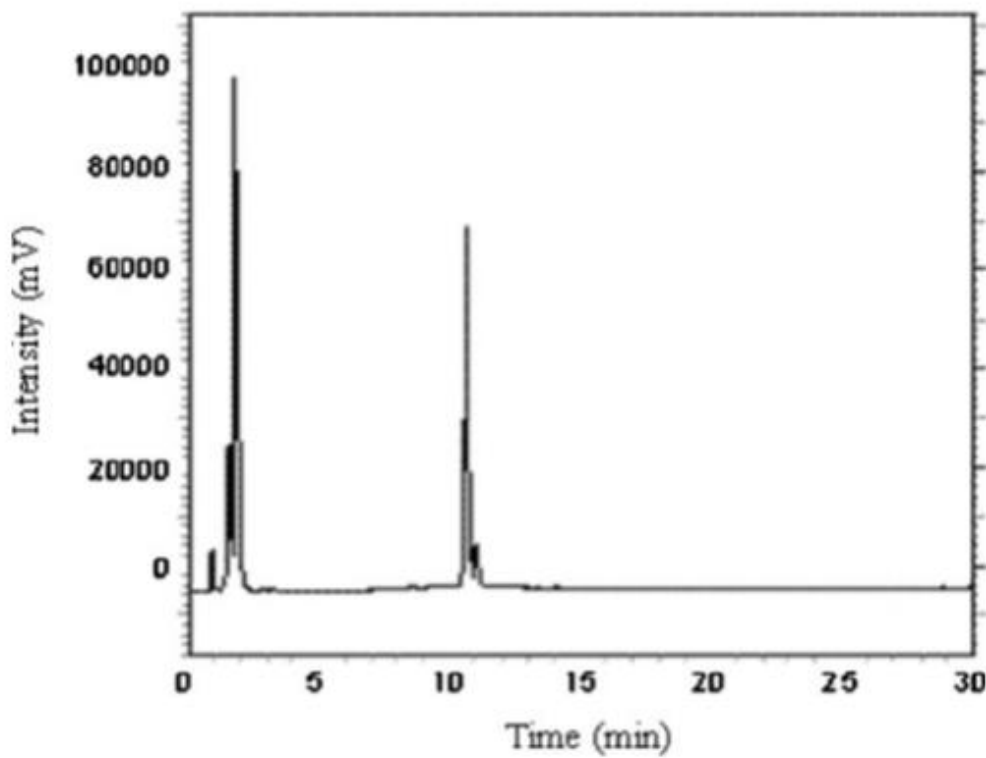


Figura 46. HPLC de fase reversa del extracto en metanol *Kalanchoe pinnata* (Abdellaoui, Destandau, Toribio, Elfakir, Lafosse, Renimel, André, Cancellieri, Landemarre, 2010).

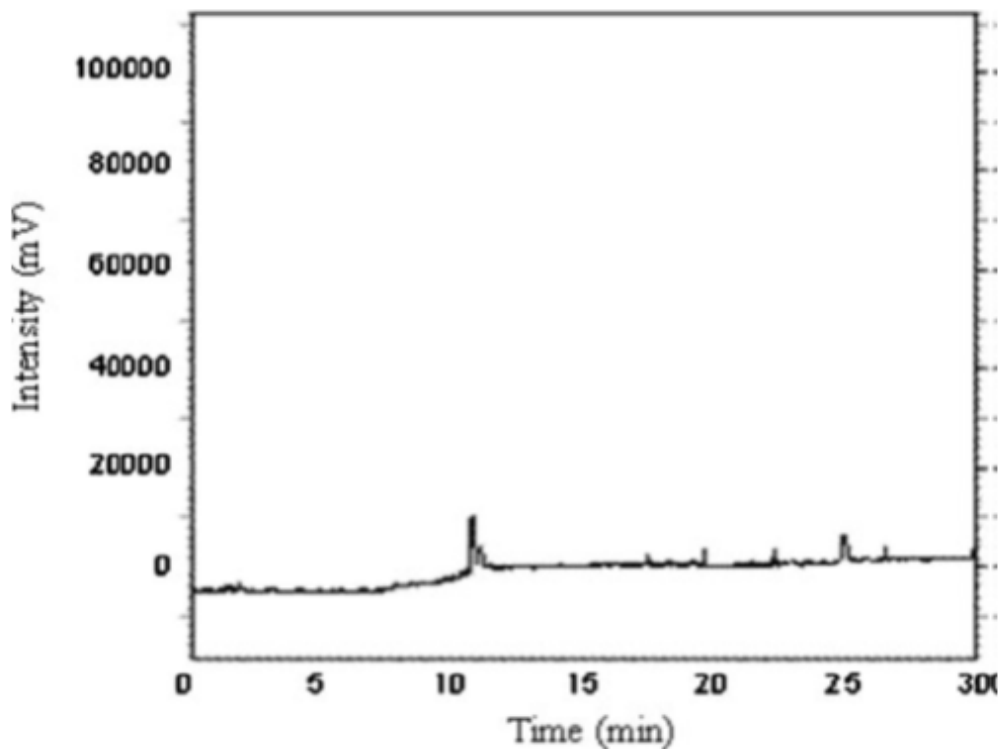


Figura 47. HPLC de fase reversa del extracto en acetato de etilo de *Kalanchoe pinnata* (Abdellaoui, Destandau, Toribio, Elfakir, Lafosse, Renimel, André, Cancellieri, Landemarre, 2010).

En la **Figura 46** y **47** se puede observar que el extracto metanólico fue más rico en contenido que el acetato de etilo, ambos extractos contenían compuestos eluidos alrededor de 12 min, pero en una proporción muy débil en el acetato de etilo. El extracto metanólico presentó otros compuestos polares eluidos en el volumen vacío (Abdellaoui, Destandau, Toribio, Elfakir, Lafosse, Renimel, André, Cancellieri, Landemarre, 2010).

4.3 Cromatografía de gases

Majaz et al (2011), utilizaron el siguiente sistema cromatografico:

- Gas portador: helio
- Caudal: 0.7 ml / min
- Temperatura de la columna: 5 min a 180 ° C
- Temperatura del detector 280 - 290 ° C.
- Volumen inyectado: 1 µL de muestra.
- Potencial de ionización: 70 eV.

- Temperatura de la fuente de iones: 290 ° C.

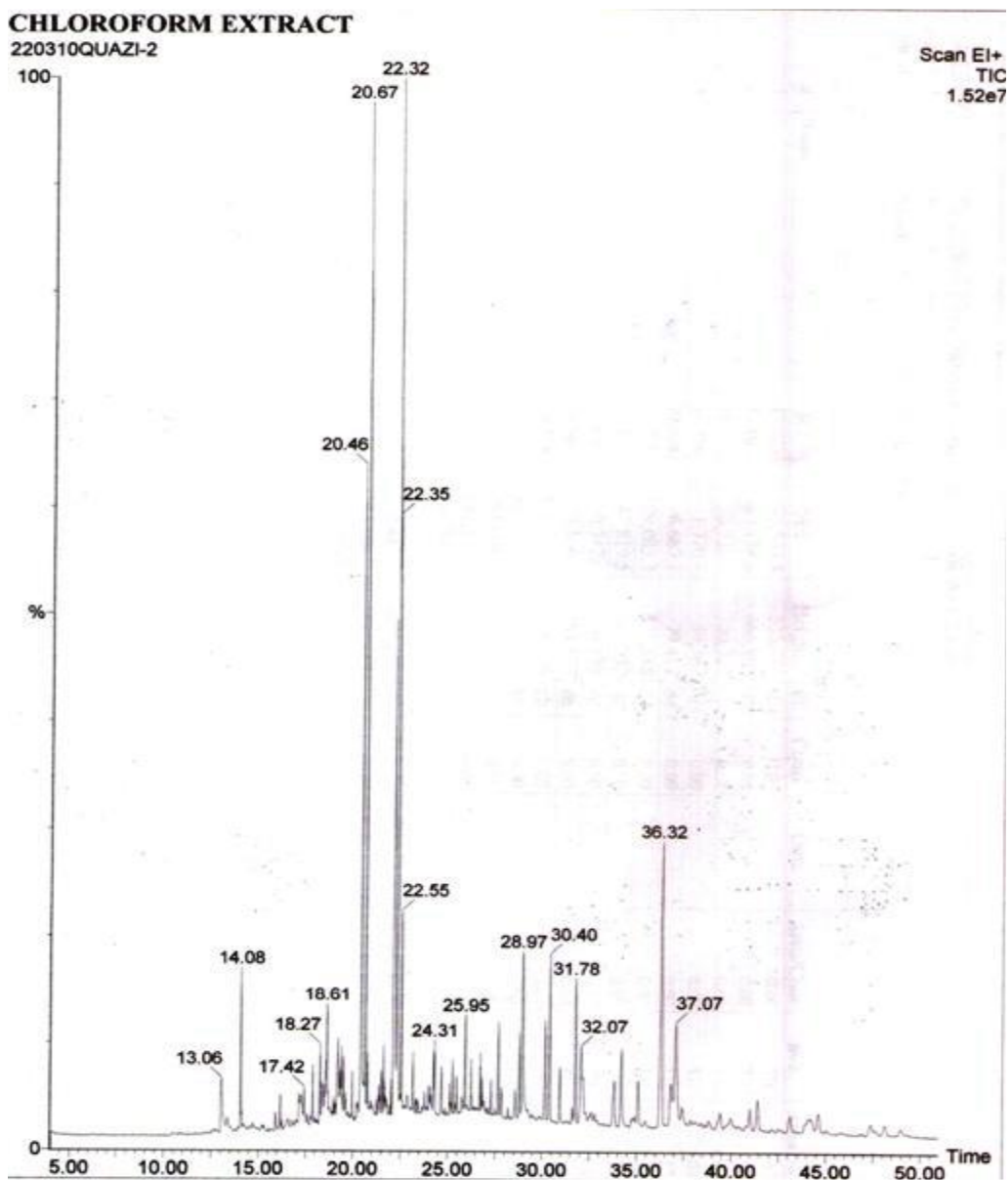


Figura 48. CG para el extracto de *K. pinnata* en cloroformo (Majaz, Nazim, Shaikh, Gomase, Choudhari, 2011)

S. No.	Name	RT	Area (A)	Height	BL	Conc	Units	A/conc	m/z	Area%
1		13.075	85,564.8	535,711	MM	0.00		0.00	TIC	1.67
2		14.102	87,138.6	666,805	MM	0.00		0.00	TIC	1.70
3		18.612	98,726.1	7,000,724	MM	0.00		0.00	TIC	1.93
4		18.924	1,770.4	39,347	MM	0.00		0.00	TIC	0.03
5		19.034	6,687.1	79,412	dd	0.00		0.00	TIC	0.13
6		19.217	109,085.3	675,518	dd	0.00		0.00	TIC	2.13
7		19.364	47,819.5	491,052	dd	0.00		0.00	TIC	0.93
8		19.456	30,747.4	376,129	dd	0.00		0.00	TIC	0.60
9		19.566	20,306.2	253,570	db	0.00		0.00	TIC	0.40
10		20.446	511,244.9	3,955,516	bb	0.00		0.00	TIC	9.99
11		20.629	395,723.8	3,111,630	bb	0.00		0.00	TIC	7.73
12		22.169	491,098.3	3,958,713	dd	0.00		0.00	TIC	9.60
13		22.352	937,544.6	6,627,489	db	0.00		0.00	TIC	18.32
14		22.536	95,700.8	750,374	bb	0.00		0.00	TIC	1.87
15		23.178	22,920.9	183,161	bd	0.00		0.00	TIC	0.45
16		24.296	62,441.9	442,625	db	0.00		0.00	TIC	1.22
17		25.176	12,894.2	121,168	bd	0.00		0.00	TIC	0.25
18		25.249	21,468.0	182,992	db	0.00		0.00	TIC	0.42
19		25.469	20,694.0	166,177	bb	0.00		0.00	TIC	0.40
20		25.946	73,754.4	431,432	bb	0.00		0.00	TIC	1.44
21		26.277	26,776.4	201,552	bd	0.00		0.00	TIC	0.52
22		26.789	41,042.9	356,064	bd	0.00		0.00	TIC	0.80
23		26.863	15,781.6	173,783	dd	0.00		0.00	TIC	0.31
24		27.284	16,823.0	133,426	MM	0.00		0.00	TIC	0.33
25		27.688	57,702.4	415,391	bd	0.00		0.00	TIC	1.13
26		27.834	19,976.5	157,620	db	0.00		0.00	TIC	0.39
27		28.586	22,695.0	174,179	MM	0.00		0.00	TIC	0.44
28		28.824	61,601.7	478,529	bd	0.00		0.00	TIC	1.20
29		28.989	203,248.0	1,262,146	dd	0.00		0.00	TIC	3.97
30		30.145	88,541.1	685,055	bb	0.00		0.00	TIC	1.73
31		30.401	127,118.6	984,709	bb	0.00		0.00	TIC	2.48
32		30.951	46,526.9	354,349	bb	0.00		0.00	TIC	0.91
33		31.776	133,637.9	981,008	MM	0.00		0.00	TIC	2.61
34		32.106	145,933.9	747,893	MM	0.00		0.00	TIC	2.85
35		33.811	77,236.9	491,155	MM	0.00		0.00	TIC	1.51
36		34.196	84,839.0	631,156	MM	0.00		0.00	TIC	1.66
37		35.076	43,705.1	343,011	MM	0.00		0.00	TIC	0.85
38		36.305	449,108.7	2,951,895	MM	0.00		0.00	TIC	8.78
39		36.836	82,568.8	504,613	bd	0.00		0.00	TIC	1.61
40		37.075	239,332.1	1,167,576	dd	0.00		0.00	TIC	4.68

Figura 49. Lista de compuestos probable por CG para el extracto de *Kalanchoe pinnata* en cloroformo (Majaz, Nazim, Shaikh, Gomase, Choudhari, 2011).

La CG del extracto de cloroformo muestra la presencia de 40 fitoconstituyentes (**Figura 49**).

A partir de estas investigaciones fitoquímicos anteriores, se concluyó que el extracto de

cloroformo de la raíz de *Kalanchoe pinnata* contiene gran variedad de flavonoides y esteroides, como son el colesterol y el B-sitosterol que previamente fueron identificados en el estudio por HPLC (**Figura 39, 40 y 41**).

4.4 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

El análisis realizado por Arutselvan et al (2013) de GC-MS reveló la presencia de seis compuestos bioactivos en el extracto de acetato de etilo (**Figuras 50 y 51**). Los compuestos bioactivos que forman el extracto se identificaron con el tiempo de retención, la fórmula molecular, el peso molecular y la concentración (%). El compuesto predominante presente en el extracto de *Kalanchoe floribunda* en acetato de etilo son: el ácido dodecanoico (1,61%), ácido tetradecanoico (39,70%), ácido hexadecadienoico nsplit (11,14%), 9,12-ácido octadecadienoico (Z, Z) (5,45%), Pregnanetriol (4,83%) y otros compuestos restantes de menor nivel sin gran importancia.

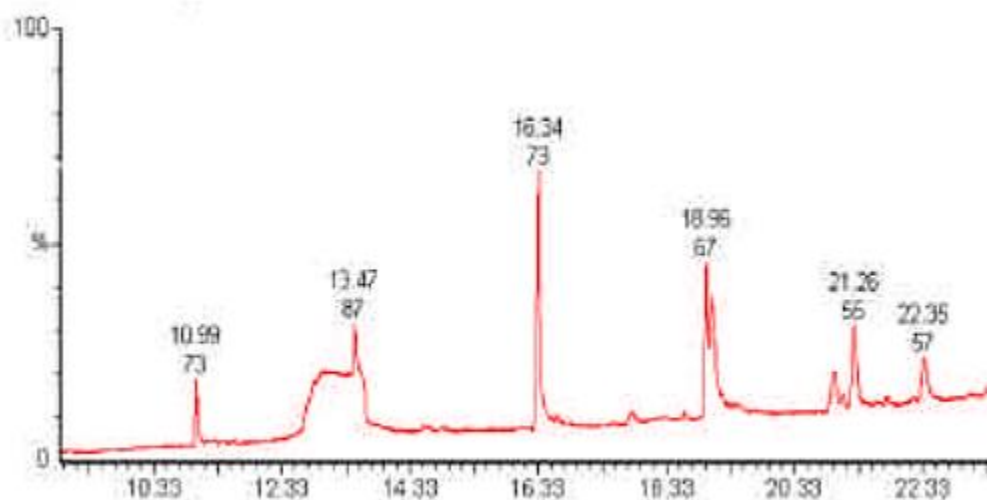


Figura 50. CG-MS para el extracto de *Kalanchoe floribunda* (Arutselvan, Tamil, Jeyasree, Bharathidasan, Kalaivani, Prabakaran, 2013).

RT	Name of the compounds	Molecular Formula	MW	Peak Area%
10.99	Dodecanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200	1.61
13.47	Tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	39.70
16.34	n-Hexadecadienoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	11.14
18.96	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280	5.45
21.26	Pregnanetriol	C ₂₁ H ₃₆ O ₃	336	4.83
22.35	5-(1-Isopropenyl-4,5-dimethylbicyclo(4.3.0) nonan-5-yl)-3-methyl-2-pentenol acetate	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	332	3.15

Figura 51. CG-MS para el extracto de *Kalanchoe floribunda* (Arutselvan, Tamil, Jeyasree, Bharathidasan, Kalaivani, Prabakaran, 2013).

Arutselvan et al (2013) concluyen que los resultados indican que las especies de plantas ensayadas poseen compuestos con propiedades antimicrobianas como el ácido decanoico (ácido Laurico) y el ácido tetradecanoico (ácido mirístico). Esto explica el uso de estas plantas en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades cuyos síntomas pueden implicar infecciones bacterianas y fúngicas, subrayando la importancia del enfoque etnobotánico para la selección de plantas en el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos. También aclara que son necesarias más investigaciones fitoquímicas para identificar los componentes activos causantes de los efectos antibacterianos de algunas de estas plantas medicinales.

CAPITULO 5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN LAS PLANTAS DEL GÉNERO *KALANCHOE*

En este capítulo se describen los principales métodos encontrados para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las plantas del género *Kalanchoe* se basan en el zona de inhibición del crecimiento, medidos en milímetros (mm), estos métodos son adoptados por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) como norma de aceptación general (CLSI, 2019).

Contenido

5.1 Difusión en disco	78
5.2 Susceptibilidad por difusión de agar	80
5.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	83
5.4 Susceptibilidad por difusión de disco.....	85

5.1 Difusión de disco

En el 2011 investigadores analizaron la actividad antibacteriana in vitro del extracto acuso, metanólico y en cloroformo de la raíz de *Kalanchoe pinnata*. Todos los extractos fueron disueltos por separado en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener soluciones de 10 mg/ml. La Ampicilina (1 mg/ml) fue utilizada como agente antibacteriano estándar. La actividad antibacteriana se evaluó empleando cultivos de 24 horas de *Escheria coli* y *Staphylococcus aureus* utilizando como medio el agar Muller Hinton. Las placas inoculadas con microorganismos las mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir la difusión de las soluciones en el medio. Las placas de Petri utilizadas para la detección antibacteriana se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 hora (Majaz, Nazim, Afsar, Siraj, Siddik, 2011).

En la **Figura 52** se observan las dimensiones de los halos de inhibición que rodea a cada uno de los pozos.

Extract	Zone of inhibition (mm)			
	Extracts			
Standard	Chloroform	Methanol	Aqueous	
<i>E. coli</i>	42	13	26	18
<i>S. aureus</i>	34	21	31	26

Figura 52. Diámetro de Inhibición de los extractos de *Kalanchoe pinnata* (Majaz, Nazim, Afsar, Siraj, Siddik, 2011).

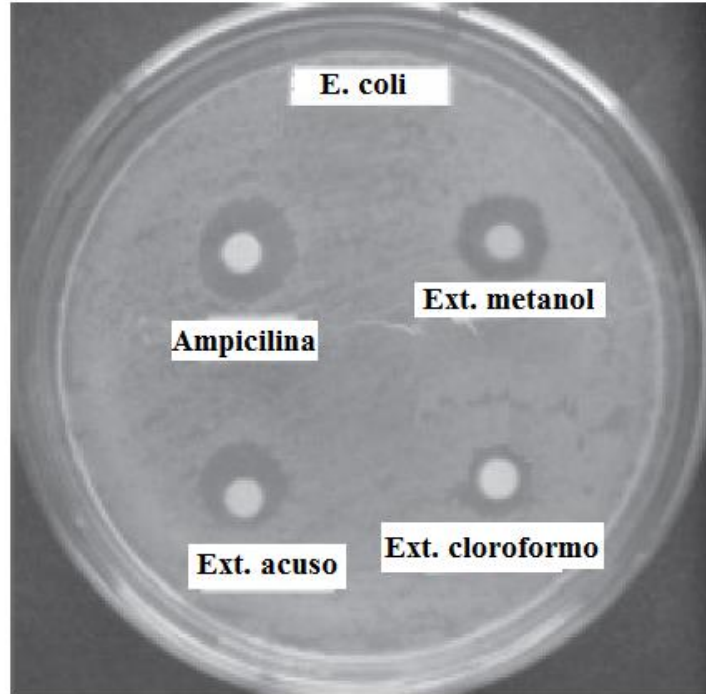


Figura 53. Acción antimicrobiana de los extractos de *Kalanchoe pinnata* en la bacteria *E. coli* (Majaz, Nazim, Afsar, Siraj, Siddik, 2011).

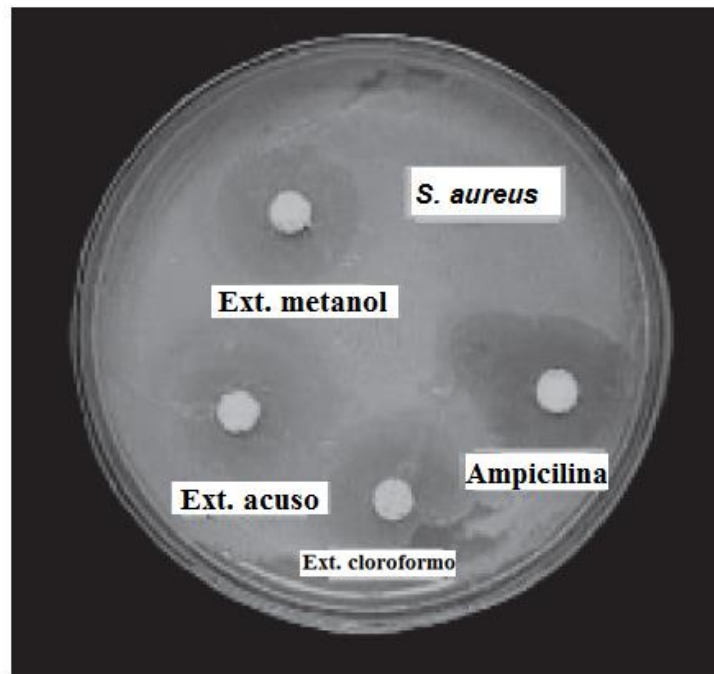


Figura 54. Acción antimicrobiana de los extractos de *Kalanchoe pinnata* en la bacteria *S. aureus* (Majaz, Nazim, Afsar, Siraj, Siddik, 2011).

Los resultados revelan que la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* es alentadora [Figura 52]. El extracto metanólico muestra una buena actividad antimicrobiana contra *Escheria coli* y *Staphylococcus aureus*, en comparación con el cloroformo y extracto acuoso (Majaz, Nazim, Afsar, Siraj, Siddik, 2011).

Nahar et al (2008), determinaron la acción antimicrobiana del extracto crudo de *Kalanchoe daigremontiana* en hexano, tetracloruro de carbono y cloroformo, estas las fracciones solubles acuosas fueron evaluadas mediante el método de difusión en disco. Cada extracto se disolvió por separado en cloroformo y metanol según sea necesario y se aplicó a discos de papel de filtro estéril a 300 µg/disco y se secaron cuidadosamente para evaporar el disolvente residual. Se emplearon discos con 30 µg de kanamicina estándar como control positivo (Nahar, Khan, Rahman, Begum, Rashid, 2008)

Test microorganisms	Diameter of zone of inhibition (mm)				
	HF	CTF	CF	ME	KAN
Gram positive bact.					
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	13 ± 0.2	-	-	15 ± 0.2
Gram negative bact.					
<i>Escherichia coli</i>	-	14.23 ± 0.21	-	-	16 ± 0.25

Figura 55. Actividad antimicrobiana del extracto de *Kalanchoe daigremontiana*: La dimensión de la zona de inhibición se expresa como media, una medida inferior a 8 mm se consideró inactivo; HF: partición soluble en n-hexano; CTF: partición soluble en tetracloruro de carbono; CF: partición soluble en cloroformo; ME: extracto metanólico; KAN: kanamicina (Nahar, Khan, Rahman, Begum, Rashid, 2008).

Nahar et al (2008) concluyeron que la *K. daigremontiana* tiene importantes efectos antimicrobianos, que apoya el uso tradicional de esta planta en diversas enfermedades infecciosas, la partición soluble en tetracloruro de carbono mostró una actividad prominente [Figura 52]. El desarrollo de las cepas de *E. coli* se inhibió fuertemente con la zona de inhibición de 14 mm, mientras que mostró una actividad inhibitoria moderada contra *S. aureus* (13 mm).

5.2 Susceptibilidad por difusión de Agar

Calvopiña (2010), realizó una investigación sobre las hojas de la planta *Kalanchoe pinnata* en extracto seco y tintura al 20%, para evaluar su acción antimicrobiana, usaron el método por difusión de agar, mediante la utilización de las cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Emplearon

para el control positivo, discos de antibióticos comerciales de 30 µg tanto para la Amikacina como para la Kanamicina. Para evaluar la acción antibacteriana de los extractos *Kalanchoe pinnata* se impregnaron los discos de papel de filtro con 8 µl de extracto a una concentración final de 400 µg por disco.

Según la **Figura 56** del manual de pruebas de susceptibilidad de los microorganismos, compartida por Brizuela-Lab (2015) correspondiente al CLSI (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio) del 2015, las dos cepas bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* son susceptibles a Amikacina y Kanamicina.

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible		
B	Amikacina	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16	19-26	20-26
C	Kanamicina	30	<13	14-17	>18	>25	<6	17-25	19-26

Figura 56. Patrones estándar de la zona de inhibición para las cepas *S. aureus* y *E. coli*, utilizada como control de calidad (Brizuela-Lab, 2015).

En las **Figuras 57** y **58** se observa que los controles positivos de calidad presentan zonas de inhibición con un diámetro entre 18 y 23 mm para las dos bacterias analizadas.



Figura 57. Kanamicina: controles positivo (Calvopiña, 2010).



Figura 58. Amikacina: control positivo (Calvopiña, 2010).



Figura 59. Zonas de inhibición de los extracto de *Kalanchoe pinnata* (Calvopiña, 2010).

Calvopiña (2010) concluyo que los extractos de las hojas de *Kalanchoe pinnata* presentan acción antibacteriana antiestafilocócica debido a que sólo la cepa de *Staphylococcus aureus* presento zonas de inhibición de 7 mm para el extracto seco y 9 mm de para la tintura al 20%. Este resultado se debe probablemente a las concentraciones empleadas en esta prueba, ya que

en otras investigaciones fueron 4 veces mayor la cantidad de extracto (Mothana et al., 2009; Bhandari et al., 2000; Duraipandiyan et al., 2006).

5.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Morillo (2018) evaluó el efecto antimicrobiano del extracto de *Kalanchoe pinnata* en etanol sobre la bacteria *E. coli*. Para determinar la CMI, realizó el proceso mediante macrodilución en caldo. Para esto preparo concentraciones de extractos de hojas en varios niveles de *Kalanchoe pinnata*: primer nivel al 25% que corresponde a una concentración de 250 mg/ml, el segundo nivel al 50% que corresponde a una concentración de 500 mg/ml, tercer nivel al 75% que corresponde a una concentración de 750 mg/ml y por último el cuarto nivel al 100% que corresponde a una concentración de 1000 mg/ml. Después procedió a agregar 0.8 ml a cada uno de los tubos de ensayos y adiciono 0.2 ml del cultivo de *E. coli*, los incubo a 37 °C por 24 horas. Seguidamente midió 0.1 ml de cada tubo y lo sembró en placas con Agar Mueller Hilton y los dispersó en toda la placa para poder determinar la UFC de cada concentración. Como control positivo uso el ciprofloxacino.

N° de repetición	Concentración del extracto etanólico de <i>Kalanchoe pinnata</i> (mg/ml)				Control negativo UFC	Control positivo ciprofloxacino UFC
	25%	50%	75%	100%		
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml		
1	2	0	0	0	8000000	0
2	0	0	1	0	8000000	0
3	0	1	0	0	8000000	0
4	0	1	0	0	8000000	0
5	1	0	0	0	8000000	0
6	0	1	0	0	8000000	0
7	0	1	0	0	8000000	0
8	0	0	0	0	8000000	0
9	2	0	1	0	8000000	0
10	0	0	0	0	8000000	0
11	2	0	0	0	8000000	0
12	0	1	0	0	8000000	0
13	1	0	0	0	8000000	0
14	2	0	0	0	8000000	0
15	0	1	0	0	8000000	0
16	0	0	0	0	8000000	0
PROMEDIO	0.625	0.375	0.125	0	8000000	0

Figura 60. Numero de UFC inhibición de las distintas concentraciones del extracto etanólico de *Kalanchoe pinnata* (Morillo, 2018)

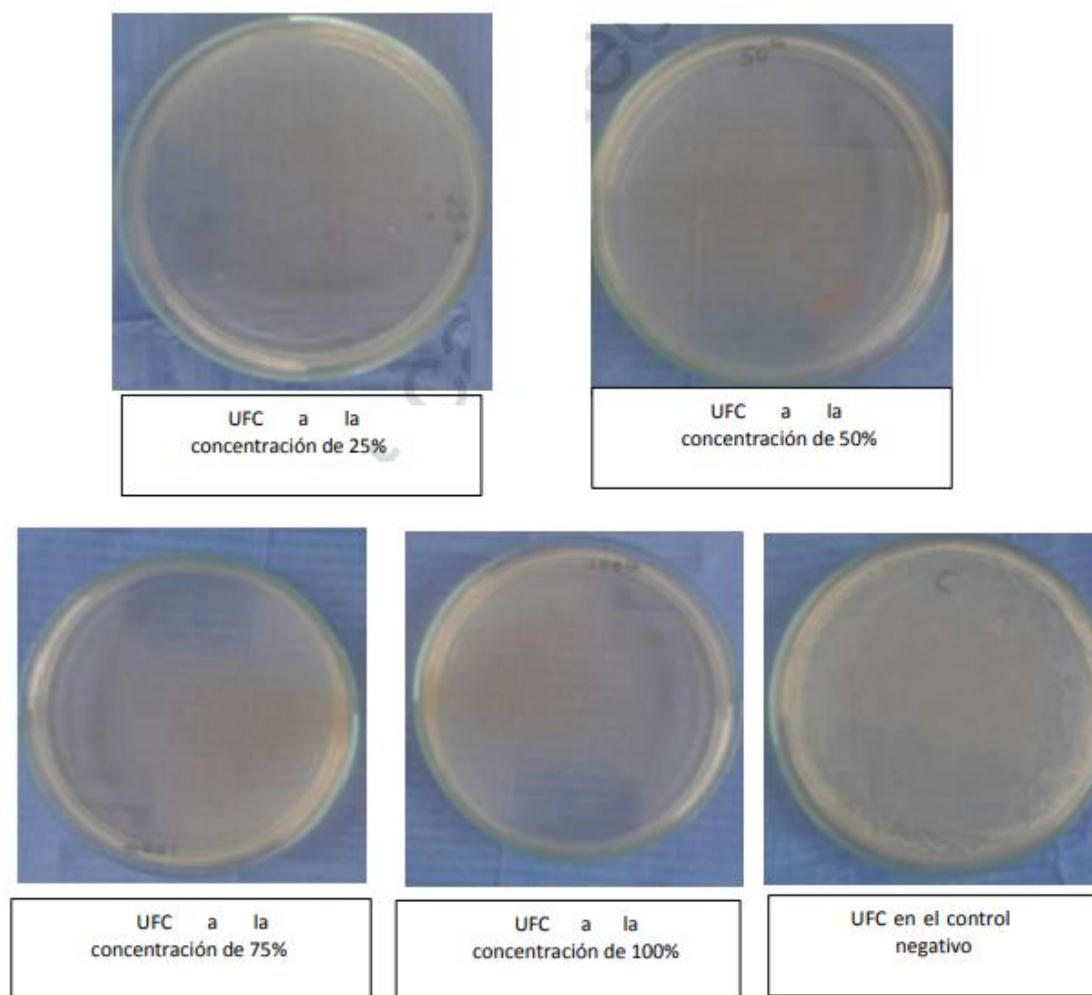


Figura 61. CMI del extracto etanólico de *Kalanchoe pinnata* (Morillo, 2018)

Con lo anterior, Morillo (2018) concluyo que el extracto de *Kalanchoe pinnata* en etanol, posee efecto antibacteriano sobre las cepas de *E. coli*, esto lo comprueba en el crecimiento de UFC debido que desde la concentración al 25% (250mg/ml) observa escasas bacterias (2 UFC), comprobando también que el extracto al 100% presentó concentración mínima bactericida (0 UFC).

5.4 Susceptibilidad por difusión de disco

Morillo (2018) para la prueba de susceptibilidad, utilizo la técnica de difusión de discos, mediante la cual sumergió los discos de papel filtro estériles en cada uno de los niveles de concentraciones del extracto *Kalancho pinnata* en etanol, los cuales fueron tal como

procedió en el ensayo de CMI: primer nivel al 25% que corresponde a una concentración de 250 mg/ml, el segundo nivel al 50% que corresponde a una concentración de 500 mg/ml, tercer nivel al 75% que corresponde a una concentración de 750 mg/ml y por último el cuarto nivel al 100% que corresponde a una concentración de 1000 mg/ml. Posteriormente con una aguja estéril se colocaron sobre las siembras de E. Coli.

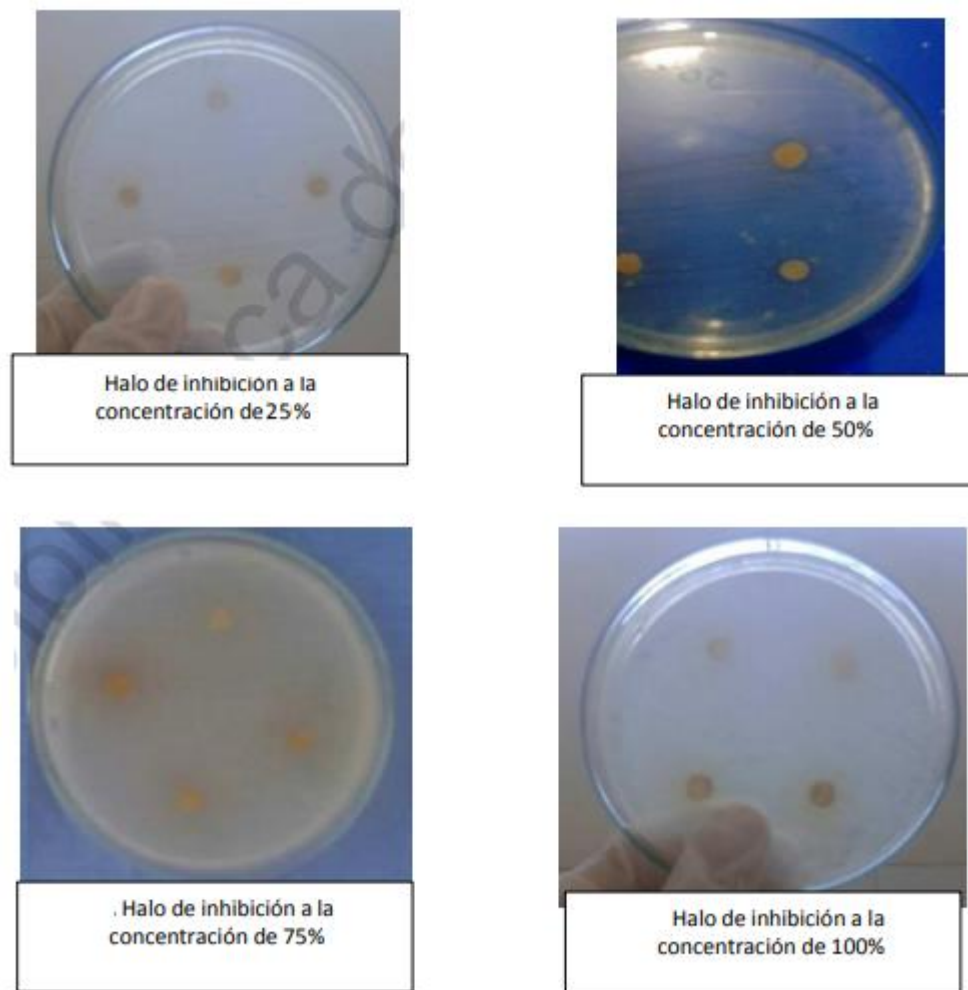


Figura 62. Zonas de inhibición del extracto de *Kalanchoe pinnata* en etanol (Morillo, 2018)

Medición de los halos de inhibición de <i>Kalanchoe pinnata</i>					
N° de repetición	Concentración del extracto etanólico de <i>Kalanchoe pinnata</i> (mg/ml)				Control(mm)
	25%(mm)	50%(mm)	75%(mm)	100%(mm)	
1	8	10	10	10	36
2	7	8	10	8	36
3	6	7	11	10	35
4	7	7	10	10	35
5	8	11	8	9	33
6	7	10	9	11	33
7	8	9	11	9	32
8	6	10	9	10	34
9	7	10	9	11	34
10	10	8	8	12	35
11	8	9	9	9	34
12	9	7	10	9	35
13	7	10	9	8	34
14	9	9	10	10	34
15	8	8	10	11	34
16	8	9	12	10	35
PROMEDIO	7.6875	8.875	9.6875	9.8125	34.3125

Figura 63. Dimisión de las zonas de inhibición de los distintos niveles de concentración del extracto etanólico de *Kalanchoe pinnata* (Morillo, 2018)

Morillo (2018) determino la sensibilidad antibacteriana de la *E. coli*, la cual no presentó ninguna sensibilidad al nivel de concentración del 25% mientras que para los otros de niveles de concentraciones presento sensibilidad límite.

CONCLUSIONES

- El tamizaje fitoquímico realizado a las plantas del género *Kalanchoe* por diferentes autores, permitió reconocer varios tipos de compuestos químicos, obtenidos mediante distintos métodos de extracción. Se determinó que el extracto en etanol y acetato de etilo son una fuente rica de metabolitos secundarios tipo alcaloides, cumarinas, quinonas, flavonoides, fenoles, saponinas, alcaloides, antocianidinas, carbohidratos reductores, quinonas, los cuales son considerados compuestos inhibidores de las bacterias *S. aureus* y *E. coli* (Calvopiña, 2010; Villamizar et al., 2014; Bhatti et al., 2012) ; Mientras que los extractos éter de petróleo y acuosos presentaron levemente la presencia de metabolitos secundarios, esto se puede deber que la mayoría de metabolitos secundarios son solubles en solventes orgánicos, separando con afinidad los compuestos químicos presentes en las plantas del género *Kalanchoe* (Martínez, 2002), de igual forma, cabe recalcar que las propiedades antibacterianas de los extractos naturales para combatir la infecciones por bacterias, dependen directamente de la concentración y la composición de dichos metabolitos, por cual son necesarios los ensayos por HPLC, M/S, CG y CG-M/S (Cabrera, Sánchez, Guerra, Espinoza, Almeida , 2011).
- Se precisa que los compuestos químicos identificados y cuantificados en las plantas del género *Kalanchoe* mediante análisis cuantitativos por HPLC, M/S, CG y CG-M/S, los cuales reportaron la presencia de flavonoides, fenoles y ácidos grasos como: La patuletina, glucosidos de quercetina, B-sisterol, luteolina, ácido láurico, ácido mirístico y miricetina. Los flavonoides y fenoles, identificados en las plantas del género *Kalanchoe* pueden presentar actividad antimicrobiana, debido a que la mayoría de fenoles pueden ocasionar la ruptura de la membrana celular, evitar la unión a proteínas, promueve la inhibición de enzimas y la síntesis de nuevas proteínas (Niño *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2013; Aditya *et al.*, 2012). Estos compuesto fenólicos se oxidan rápidamente y forman quinonas, los cuales son idóneas para atrapar microorganismos (Okwu, Nnamdi, 2011). Además de lo ya mencionado, la presencia de fenoles en las plantas del género *Kalanchoe*

indica que puede convertirse en un buen agente antimicrobiano debido a que los fenoles siguen siendo ampliamente usados como estándar con el que se evalúan otros bactericidas (Morillo, 2018)

A continuación se detallan los compuestos químicos identificados en las plantas del género *Kalanchoe* y su efecto antimicrobiano para combatir las infecciones causadas por bacterias:

-B-sisterol: Presente en la *Kalanchoe pinnata*, ha demostrado que es un compuesto nutricional seguro, no tóxico y efectivo, que tiene sorprendentes beneficios potenciales para la salud en muchas aplicaciones diversas, incluida la actividad antibacteriana (Sen, Dhavan, Shukla, Singh Tejovathi, 2012). Estudios microbiológicos experimentales han demostrado que el B-sisterol tiene actividad antibacteriana contra diferentes especies de bacterias gram positivas y bacterias gram negativas, en nuestro caso *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente, eliminándolos en un lapso de 5 a 10 horas a una concentración de 50 µg/ml (Subramaniam, Keerthiraja, Sivasubramanian, 2014).

-Los flavonoides miricetina, quercetina y luteolina: Identificados en la *Kalanchoe pinnata*, por lo general se encuentran en un orden basado en su concentración quercetina>luteolina>miricetina. La presencia e identificación de estos compuestos en las plantas del género *Kalanchoe* podría contribuir a la actividad antimicrobiana ya que la miricetina, la luteolina y la quercetina tienen actividad antimicrobiana contra los microorganismos patógenos humanos con algunos mecanismos de acción, como la inhibición de los nucleicos y síntesis ácida (Hendra, Ahmad, Sukari, Yunus, Oskoueian, 2011). Además Demetzos y colaboradores (2011) investigaron la actividad antimicrobiana de la miricetina y sus derivados, demostrando que esta podía inhibir las bacterias Gram-positivas.

-Quercetina: Se encuentra identificada en las especies de *Kalanchoe pinnata* y *Kalanchoe daigremontiana*, siendo uno de los flavonoides más importantes reportados en este estudio, ya que presenta actividad antimicrobiana inhibiendo al *S. aureus* en una concentración de extracto de *Kalanchoe* a 20 µg/ml y al *Escherichia coli* a una

concentración entre 300 µg/ml y 400 µg/ml (Nerendra, 2017). Estos resultados están en acuerdo con otras investigaciones reportadas por otros autores para inhibir diferentes microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Aspergillus parasiticus*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otros (Rauha, Remes, Heinonen, Hopia, Kähkönen, Kujala, Pihlaja, Vuorela, Vuorela, 2000; Nitiema, Savadogo, Simpure, Dayeri, Traore, 2012).

-Ácidos grasos: El **ácido láurico** y el **ácido mirístico** se identificaron y cuantificaron en la planta *Kalanchoe floribunda* en una concentración de 1.6% y 39.7 % respectivamente. Según la literatura los ácidos grasos de cadena media (ácido láurico) y ácidos grasos de cadena larga (ácido mirístico) presenta actividad antimicrobiana atacando distintas cepas bacterianas (Huang, Alimova, Myers, Ebersole 2011; Batovska, Todorova, Tsvetkova, Najdenski, 2009).

- Cabe resaltar que la concentración y tipos de compuestos químicos presentes en las plantas del género *Kalanchoe*, dependen del disolvente utilizado para la extracción y de la especie de la planta. Con la información suministrada en esta monografía se puede establecer que las plantas del género *Kalanchoe* reportadas, la que presentaron mayor contenido de metabolitos secundarios son la *Kalanchoe floribunda*, *Kalanchoe pinnata* y *Kalanchoe daigremontiana*. De igual forma el disolvente con mayor concentración de metabolitos fueron el etanol y el acetato de etilo.
- Con todo lo mencionado anteriormente, se puede establecer que las plantas del género *Kalanchoe* si pueden contribuir a un tratamiento promisorio y eficaz contra enfermedades infecciosas producidas por bacterias como la *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, evitando así el uso indebido de antibióticos que produzcan que estas cepas bacterianas se vuelvan inmunes a ellos. También es necesario aclarar que los resultados obtenidos sobre las plantas del género *Kalanchoe* deben someterse a estudios en animales y humanos para determinar su efectividad en organismos complejos, incluidos estudios de toxicidad, así como un examen de sus efectos sobre la microbiota intestinal normal beneficiosa.

RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar esta recopilación y análisis de información disponible en la literatura para establecer nuevos estudios clínicos que permitan valorar la efectividad de los extractos de las plantas del género *Kalanchoe* con fines farmacéuticos para combatir las enfermedades originadas por microorganismos de relevancia médica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdellaoui S., Destandau, E., Toribio, A., Elfakir, C., Lafosse, M., Renimel, I., André, P., Cancellieri, P., Landemarre, L. (2010). Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: extraction, purification, and identification [Moléculas bioactivas en hojas de *Kalanchoe pinnata*: extracción, purificación e identificación]. *Anal Bioanal Chem*, pág.1329–1338.
- Aditya, R., Ramesh, C., Riaz, M., Prabhakar, B. (2012). Anthelmintic and antimicrobial activities in some species of mulberry [Actividades antihelmínticas y antimicrobianas en algunas especies de morera]. *J. Pharm. Pharm. Sci*, 4, 335-338.
- Akinpelu, D. (2000). Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves [Actividad antimicrobiana de las hojas de *Bryophyllum pinnatum*]. *Fitoterapia*, 71(2), 193-194.
- Al-Abd, N. Mohamed-Nor, Z., Mansor, M., Azhar, F., Hasan, M., Kassim, M. (2015). Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization of *Melaleuca cajuputi* extract [Antioxidante, actividad antibacteriana y caracterización fitoquímica del extracto de *Melaleuca cajuputi*.] *BMC Complement. Altern. Med*, 15, 385-398.
- Aldana, J. (2010). Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones y subfracciones obtenidas a partir de hojas de *Elaeagia utilis* sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C.
- Allorge, L. (1995). *Kalanchoe* de Madagascar. Karthala, pág. 252.
- Álvarez F., Olaechea P., Palomar M., Insausti J., López M. (2010). Epidemiología de las bacteriemias primarias y relacionadas con catéteres vasculares en pacientes críticos ingresados en servicios de medicina intensiva. *Med. Intensiva* [online], 34 (7), 437-445.
- Arias, I. (2011). Evaluación de la actividad antitumoral de diferentes extractos de varias especies de *Kalanchoe* en una línea celular de cáncer de próstata. Instituto Politécnico nacional., pag. 44 - 90.
- Aripaca, D. (2009). Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. Pontificia Universidad Javeriana. pág., 101 – 139.

- Arutselvan, C., Tamil, S., Jeyasree, J., Bharathidasan, R., Kalaivani, R., Prabakaran, M. (2013). Preliminary phytochemical analysis, antibacterial activity and GC-MS analysis of *Kalanchoe floribunda* Wight&Arn [Análisis fitoquímico preliminar, actividad antibacteriana y análisis GC-MS de *Kalanchoe floribunda* Wight&Arn]. *BioMedRx*, 1 (3), 280 – 283.
- Okwu, D., Nnamdi, F. (2011). Two flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial Activity [Dos flavonoides de *Bryophyllum pinnatum* y su actividad antimicrobiana]. *Pharmaceutical Chemestrt Journal*, 3, 1 – 10.
- Batovska, D., Todorova, I., Tsvetkova, I., Najdenski, H. (2009). Antibacterial Study of the Medium Chain Fatty Acids and Their 1-Monoglycerides: Individual Effects and Synergistic Relationships [Estudio antibacteriano de los ácidos grasos de cadena media y sus monoglicéridos 1: efectos individuales y relaciones sinérgicas]. *Polish Journal of Microbiology*2009, Vol. 58 (1), 43 – 47. Recuperado de <http://www.pjmonline.org/wp-ontent/uploads/2015/12/vol5812009043.pdf>
- Bhandari, D., Nath, G., Ray, A., Tewari, P. (2000). Antimicrobial activity of crude extracts from *Berberis asiatica* stem bark [Actividad antimicrobiana de extractos crudos de la corteza del tallo de *Berberis asiatica*]. *Pharmaceutical Biology*, 38, 254-257.
- Bhatti, M., Kamboj, A., Kumar, A. (2012). Phytochemical Screening and In-Vitro Evaluation of Antioxidant Activities of Various Extracts of Leaves and Stems of *Kalanchoe crenata* [tamizaje fitoquímico y evaluación in vitro de las actividades antioxidantes de diversos extractos de hojas y tallos de *Kalanchoe crenata*]. *Journal of Pharmacy Research*, 5, 3967-3972.
- Bio-nica (2008). Bacterias que causan enfermedades humanas. Accedido el 15 de febrero 2019, recuperada de <http://www.bio-nica.info/biblioteca/BacteriasEnfermedades.pdf>
- Brizuela-Lab (2015). Tabla de Interpretación de los Resultados - Método de Difusión en Agar (Normas CLSI 2015). Accedido el 5 de marzo de 2019, recuperada de <http://www.brizuela-lab.com.ar/manuales/Tablan.pdf>.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (2000). *Biochemistry and molecular biology of plant* [Bioquímica y biología molecular de plantas]. Rockville, USA: American Society of Plant Physiologists.

- Calvopiña, G. (2010). Determinación de la actividad antimicrobiana de las hojas de *Kalanchoe pinnata*. Universidad de Granma., pag. 11 – 46.
- Cabrera, R., Sánchez, Y., Guerra, D., Espinoza, A., Almeida, M. (2011). Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de *Bryophyllum pinnata*. Revista química viva, 1, 1 – 8.
- Centro diagnostico biométrico (2011). Identificación microbiana mediante espectrometría de masas. Accedido el 17 de febrero 2019, recuperada de [http://cdb.hospitalclinic.org/noticias/identificacion-microbiana-mediante-espectrometría-de-masas](http://cdb.hospitalclinic.org/noticias/identificacion-microbiana-mediante-espectrometria-de-masas)
- Centro de control estatal de equipos médicos (1999). Guía para la caracterización química, fisicoquímica y mecánica de biomateriales. Accedido el 18 de febrero de 2019, recuperada de <http://www.eqmed.sld.cu/Documents/Documentos%20regulatorios/Guias/gt10.pdf>.
- Coy, C., Parra, P., Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *raputia heptaphylla* (rutaceae). Universidad Militar Nueva Granada. Pág. 5- 6.
- CLSI (2019). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29^o edition CLSI Supplemental M100. Wayne Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute. Accedido el 13 de noviembre de 2019, recuperada de [http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20E D29:2019&format=SPDF](http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20E%20D29:2019&format=SPDF).
- Da Silva, J., Pereira, M., Diniz, A., Siqueira J., y Souza, I. (2009). Atividade inibitória das folhas e caule de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a microorganismos com diferentes perfis de resistência a antibióticos [Características de la actividad y la estructura de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a microorganismos con diferentes características de resistencia a los antibióticos]. Revista brasileira de Farmacognosia. 19(3), 2 – 5.
- Demetzos, C., Angelopoulou, D., Kolocouris, A., Daliani, I., Mavromoustakos, T. (2011). Structure elucidation, conformational analysis and thermal effects on membrane bilayers of an antimicrobial myricetin ether derivative [Elucidación de la estructura, análisis conformacional y efectos térmicos sobre las bicapas de membrana de un

- derivado de éter de miricetina antimicrobiano]. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 38:703–710.
- De Oliveira, A., Morais, J., Da Silva, T., Neto, N., Nakau, J., Tomaz, J., Peporine, N., Lira, L., Zucolotto, S. (2015). Quantification of Chemical Marker of *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) Leaves by HPLC–DAD [Cuantificación del marcador químico de *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) Hojas por HPLC – DAD]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38, 795–800.
- Díaz, M., Lugo, Y., Fonte, L., Castro, I., López, O., Montejo, I. (2017). Evaluation of the antimicrobial activity of fresh extracts of *Morus alba L.* leaves [Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de *Morus alba L.*]. *Scielo*, 40, 3.
- Domingo, D. (2003). Plantas con actividad antimicrobiana. *Revista española de quimioterapia*, 16 (4), 385 – 393.
- Domínguez, M. (2004). Elucidación estructural y actividad antimicrobiana de los metabolitos presentes en la *Rhoe Discolor L.* Her Hance. *EBSCO*, 8(3), 55 – 56.
- Dos Santos, L., Vinicius, M., Aragao, E., Rodrigues, V., Frazao, M., Soares, S., y Schwartz, E. (2015). Ultraviolet-B radiation effects on phenolic profile and flavonoid content of *Kalanchoe pinnata* [Efectos de la radiación ultravioleta B sobre el perfil fenólico y el contenido de flavonoides de *Kalanchoe pinnata*]. In *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148, 73-81.
- Duraipandiyan, V., Ayyanar, M., Ignacimuthu, S. (2006). Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India [Actividad antimicrobiana de algunas plantas etnomedicinales utilizadas por la tribu Paliyar de Tamil Nadu, India]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6, 35.
- FAO (2012). Prevención de la *E. coli* en los alimentos. Accedido el 17 de febrero 2019, recuperada de http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf.
- Garcés H. y Sinha N. 2009. The “Mother of thousands” (*Kalanchoe daigremontiana*): A plant model for asexual reproduction and CAM studies [La "Madre de los miles" (*Kalanchoe daigremontiana*): un modelo de planta para la reproducción asexual y estudios CAM]. *Cold Spring Harbor*, 10, 133-145

- García, J. E., Ramírez, B. C., Robles, G., Zañudo, J., Salcedo, A. L., & García de Alba Verduzco, J. E. (Mayo-Agosto de 2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, 39, 29-44.
- Gallegos-Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Anales de la Facultad de Medicina.*, 77(4), 327-332.
- Gershenzon, J., Kreis, W. (1999). Introducción: bioquímica, role and biotechnology af secondary metabolites. *Byochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glycosides and steroid saponins* [Introducción: bioquímica, papel y biotecnología de metabolitos secundarios. *Bioquímica de terpenoides: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, esteroles, glucósidos cardíacos y saponinas esteroides*]. En *Biochemistry of plant secondary metabolism, annual Plan review*, 2, 1 – 15.
- Ghasemzadeh1, A., Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human [Flavonoides y ácidos fenólicos: Papel y actividad bioquímica en plantas y humanos]. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6697-6703.
- Gill, S. (1992). *The ethnomedical uses of plants in Nigeria* [Los usos etnomédicos de las plantas en Nigeria]. University of Benin Press, 46, 143.
- Gutiérrez, M., Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas identificación de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter No. 122*. Pág., 2 - 5.
- Hendra, R., Ahmad, S., Sukari, A., Yunus, M., Oskoueian, E. (2011). Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit [Análisis de flavonoides y actividad antimicrobiana de varias partes de *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit]. *International journal of molecular sciences*, 12(6), 3422 – 3431. <https://doi:10.3390/ijms12063422>
- Huang, C., Alimova, Y., Myers, T., Ebersole, J. (2011). Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms [Los ácidos grasos de cadena corta y media exhiben actividad antimicrobiana para microorganismos orales]. *Center*

- for Oral Health Research, 56(7), 650- 654. [Http://doi:10.1016/j.archoralbio.2011.01.011](http://doi:10.1016/j.archoralbio.2011.01.011)
- Instituto Nacional de seguridad e higiene en el trabajo (INSHT) (2012). *Staphylococcus aureus*. Accedido el 17 de febrero 2019, recuperada de <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus%20aureus.pdf>.
- Bacteria (2010). Bacterias. Accedido el 15 de febrero de 2019, recuperada de <https://biologicaliga.files.wordpress.com/2008/08/bacteria2010.pdf>.
- Lizcano, A., Vergara, J. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *myrcianthes rhopaloides* y *pasiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos. Pontifica Universidad Javeriana.
- Lock, O. (1988). Investigación Fitoquímica: Métodos de Estudios de Productos Naturales. Fondo Editorial. PUCP 1era Edición. .
- López, D. (2011). Análisis del RNAm del gen que codifica para la enzima escualeno sintasa (*sqs*) en cultivo de células de *Kalanchoe daigremontiana*". Instituto politécnico nacional. Pág. 28 – 75. Recuperado de <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/7286>
- Maguna, F., Romero, A., Garro, O., Okulik, N. (2006). Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Universidad Nacional de Nordeste. pág. 3.
- Majaz, Q., Nazim, S., Shaikh, S., Gomase, P., Choudhari A. (2011). Phytochemical analysis of chloroform extract of roots of *Kalanchoe pinnata* by HPLC and GCMS [Análisis fitoquímico del extracto de cloroformo de raíces de *Kalanchoe pinnata* por HPLC y GCMS]. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2(7), 1693-1699.
- Majaz, Q., Nazim, S., Afsar, S., Siraj, S., Siddik, P. (2011). Evaluation of antimicrobial activity of roots of *Kalanchoe pinnata* [Evaluación de la actividad antimicrobiana de raíces de *Kalanchoe pinnata*]. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 5, 93 – 96.

- Martínez, A. (2002). Esteroles: Curso de Farmacognosia y Fitoquímica (en línea). Accedido el 6 de marzo de 2019, recuperada de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esteroles2001.pdf>.
- Merchant, I; Packer, R. (1980). Bacteriología y Virología Veterinarias. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Misra, S., Dixits, S. (1979) Antifungal activity of leaf extract of some higher plants. Acta Botanica India, 7,147-150.
- Morillo, T. (2018). Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Kalanchoe pinnata* sobre *Escherichia coli* (Tesis para optar el grado académico de bachiller en medicina). Universidad nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Mothana R., Lindequist, U., Gruenert, R., Bednarski (2009). Studies of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqotra [Estudios de los potenciales anticancerígenos, antimicrobianos y antioxidantes in vitro de plantas medicinales yemeníes seleccionadas de la isla Soqotra]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 9, 7.
- Nahar, K., Khan, M., Rahman, M., Begum, B., Rashid, M. (2008). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Bryophyllum daigremontianum* [Actividades antimicrobianas y citotóxicas de *Bryophyllum daigremontianum*]. Dhaka Univ. J. Pharm. Sci, 7, 99-101.
- Nazar, J., Lavados, A., Daher, O., Bischoff, M. (2010). Análisis microbiológico, epidemiológico y evolución clínica de los pacientes con bacteriemia en el Hospital Zonal de Esquel en el período 2007-2009. Rev. Argent. Microbiol, 42 (3), 151-164.
- Nerendra, E. (2017). Antibacterial properties of quercetina [Propiedades antibacterianas de la quercetina]. Microbiology Research, 8 (1), 6877.
<https://doi.org/10.4081/mr.2017.6877>
- Niño, J., Mosquera, O., Correa, Y. (2012). Antibacterial and antifungal activities of crude plant extracts from colombian biodiversity [Actividades antibacterianas y antifúngicas de extractos de plantas crudas de la biodiversidad colombiana]. Revista de Biología Tropical, 60, 1535-1542.

- Nitiema, L., Savadogo, A., Simporé, J., Dayeri, D., Traore, A. (2012). In vitro antimicrobial activity of some phenolic compounds (Coumarin and Quercetin) against gastroenteritis bacterial strains [Actividad antimicrobiana in vitro de algunos compuestos fenólicos (cumarina y quercetina) contra cepas bacterianas de gastroenteritis]. *International Journal of Microbiological Research*, 3 (3): 183-187. [https://doi: 10.5829/idosi.ijmr.2012.3.3.6414](https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2012.3.3.6414)
- Noti Jenck (2008). Cromatógrafo de gases - MDGC/GCMS-2010. Accedido el 12 de febrero de 2019, recuperada de <https://www.notijenck.com.ar/notas/cromatografo-de-gases-mdgcgcms-2010>.
- Oh, J., Jo, H., Cho, A., Kim, J., Han, J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various leaf and herbal teas [Actividad antioxidante y antimicrobiana de varias infusiones de hierbas]. *Food Control*, 31, 403-409.
- Oliver, B. (1983). Medicinal plants in tropical West Africa III Anti-infection the rap with higher plants [Plantas medicinales en el nido tropical Africa III Anti-infección el rap con plantas superiores]. *J. Ethnopharmacology*, 9, 1-83.
- Okwu D. E., Josiah C., (2006). Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants [Evaluación de la composición química de dos plantas medicinales nigerianas]. *Afr J Biotechnol*, 5(4), 357-361.
- Osorio, E. (2009). Aspectos básicos de farmacognosia. Accedido el 21 de marzo de 2019, recuperada [de https://www.academia.edu/16696556/Aspectos_b%C3%A1sicos_de_farmacognosia](https://www.academia.edu/16696556/Aspectos_b%C3%A1sicos_de_farmacognosia)
- Pal, S., Nag A. (1992). Further studies on anti-inflammatory profile of the methanolic fraction of the fresh leaf extract of *Bryophyllum pinnatum*. [Otros estudios sobre el perfil antiinflamatorio de la fracción metanólica del extracto fresco de hoja de *Bryophyllum pinnatum*]. *Fitoterapia*, 3, 451-459.
- Pal, S., Nag, A. (1999). Neuropsychopharmacological profile of the methanolic fractions of *Bryophyllum pinnatum* leaf extract [Perfil neuropsicofarmacológico de las fracciones metanólicas de extracto de hoja de *Bryophyllum pinnatum*]. *J. Pharm Pharmacol*, 51, 313-318.

- Palacios, M. (2013). Curso de farmacognosia y fitoquímica: Metabolitos primarios y secundarios. Accedido el 15 de enero de 2019, recuperada de http://files.selvafarma.webnode.es/200000192-6def76ee8d/TEMA_04.pdf
- Paz, L., De León, P., Darío y Ramírez Ponce. (2004 – 2006). Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de Cuidados Críticos, Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Essalud, Lima, Perú. *Acta Médica Peruana*, 25 (3), 140-147.
- Pava, T. (2010). Actividad antimicrobiana de extractos de *Allium sativum* y *Zingiber officinale* sobre microorganismos de importancia en patologías infecciosas de cavidad oral. *Pontificia universidad javeriana*, 29 – 35.
- Pemán, J., Cantón, E., Linares, S., Roselló, E., Borrell, N., Ruiz-Pérez-de-Pipaon MT., Guinea J., García J., Porras, A., García, A., Pérez, L., Suárez, A., Alcoba, J., García, G. (2011). Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Bloodstream Fungal Isolates in Pediatric Patients: a Spanish Multicenter Prospective Survey [Epidemiología y susceptibilidad antifúngica de aislados fúngicos del torrente sanguíneo en pacientes pediátricos: un estudio prospectivo multicéntrico español]. *J. Clin. Microbiol*, 49 (12), 4158-4163.
- Pérez, M. (2015). Perfil fitoquímico de cultivos en suspensión de *Kalachoe draigemontiana*. Instituto Politécnico Nacional, 20 – 79.
- Pontificia Universidad Católica de Chile. (1999). Espectrómetro de masas. Accedido el 10 de febrero de 2019, recuperada de http://www7.uc.cl/sw_educ/qda1106/CAP2/2A/2A3/index.htm.
- Pfaller, M A. and Diekema, D. J. Epidemiology of invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem [Epidemiología de la Candidiasis invasiva: un problema persistente de salud pública]. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007. 20 (1), 133-163.
- Raba, J., Messina, G., Bertolino, F., Pereira, S., Aranda, P. (2018). Química analítica I, tema 2. Universidad Nacional de San Luis UNSL, 12 – 18. Recuperado de <https://www.studocu.com/en/document/universidad-nacional-de-san-luis/quimica-analitica/lecture-notes/tema-2-p-h-apuntes-2/2826307/view>.
- Rajsekhar, P., Arvind, R., Ramachandran, M., Jini, K., Sharadha, R. (2016). A comparative study on the extracts of *Kalanchoe pinnata* (linn.) pers. using chromatographic

- techniques. [Un estudio comparativo sobre los extractos de *Kalanchoe pinnata* (linn.) Pers. usando técnicas cromatográficas]. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 7(1), 345-348.
- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia, A., Kähkönen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela, H., Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds [Efectos antimicrobianos de extractos de plantas finlandesas que contienen flavonoides y otros compuestos fenólicos]. International Journal Food Microbiol, 56, 3-12. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00218-X)
- Reyes, F., Palou, E., López, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. Temas selectos de ingeniera de alimentos, 68 – 78.
- Rios, J., Recio, M., Villar, A. (1988) Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literatura [Métodos de detección para productos naturales con actividad antimicrobiana: una revisión de la literatura]. Journal of Ethnopharmacology, 23: 127 – 149.
- Robineau, L. (1995) Hacia una Farmacopea Caribeña. Accedido el 23 de febrero de 2019, recuperada de <http://www.manioc.org/recherch/T17003>.
- Rojas, J. (2010). Caracterización fitoquímica de compuestos presentes en la subfracción de las hojas de *Iseria laevis* (rubiáceas) con actividad anticariogénica. Pontificia Universidad javeriana, 47 – 48.
- Ruiz, E., Suarez, M. (2005). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. Revista Cenic, 46, 3.
- Sánchez, A. (1990). Enfermedades de las aves. Ediciones ENPES. La Habana.
- Seija, V. (2010). Género *staphylococcus*. Sección III: Etiopatología Microbiológica. Accedido el 20 de abril de 2019, recuperada de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>
- Sen, A., Dhavan, P., Shukla, K., Singh, S., Tejovathi, G. (2012) Analysis of IR, NMR and antimicrobial activity of β -sitosterol isolated from *Momordica charantia* [Análisis de IR, RMN y actividad antimicrobiana de β -sitosterol aislado de *Momordica charantia*]. Sci Secure J Biotech, 1(1), 9–13.

- Sofowora, A. (1993). Medical plants and traditional medicine in Africa [Plantas medicinales y medicina tradicional en África]. Spectrum books Ltd. Ibadan, 156-158.
- Soltis, M., Ortega, F., & Santos Guerra, A. (2001). Phylogenetic relationships and evolution of Crassulaceae inferred from MATK sequence data [Relaciones filogenéticas y evolución de Crassulaceae inferidas a partir de datos de secuencia MATK]. American Journal of Botany, 88, 76 - 91.
- Subramaniam, S., Keerthiraja, M., Sivasubramanian, A. (2014). Synergistic antibacterial action of E-sitosterol-D-glucopyranoside isolated from *Desmostachya bipinnata* leaves with antibiotics against common human pathogens [Acción antibacteriana sinérgica del E-sitosterol-D-glucopiranosido aislado de las hojas de *Desmostachya bipinnata* con antibióticos contra patógenos humanos comunes]. Brazilian journal of pharmacology, 24, 44 – 50. Recuperado de <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0102695X14701322?token=95294169475F5916A335833EC09026AF13F4C661C58B027EA1043609D4862CA343CBE7D5F543DA646F26C2456C8A19D9>.
- Tibavizco D., Rodríguez J., Silva E., Cuervo S., Cortés J. Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus* Biomédica. Accedido el 20 de agosto de 2018, recuperada de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84327216>> ISSN 0120-4157.
- Torres, J. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de *Luma chequen* (molina) a. gray “arrayán” frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen Tesis doctoral). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 30 – 45.
- Urbina vinos Blog. (2016). Técnicas de Análisis Instrumental en Enología. Accedido el 10 de septiembre de 2018, recuperada de <http://urbinavinos.blogspot.com/2016/02/tecnicas-de-analisis-instrumental-en.html>.
- Urióstegui-Flores, A. (Febrero de 2015). Hierbas medicinales utilizadas en la atención de enfermedades del sistema digestivo en la ciudad de Taxco; Guerrero. México. Rev. Salud Pública., 17(01), 85-96.
- Villamizar, L., Mosquera, N., Mejía, A., Muñoz, P., & Pombo, O. (2014). Hierba de Bruja *Kalanchoe pinnata*. Fund. Universitaria Juan N. Corpas, 3 – 29.

Valencia, C. (1995). Fundamentos de Fitoquímica. Editorial Trillas S.A. pág., 235.

William, F. (2013). Cromatografía de gases. SlideShare. Accedido el 10 de septiembre de 2018, recuperada de <https://es.slideshare.net/ecorrod/clase3-2007-gases>.