



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”



**Actividad antibacteriana y tamizaje fitoquímico de las hojas de *Kalanchoe*
gastonis-bonnieri en cepas de referencia internacional.**

Trabajo presentado ante la Ilustre Universidad de Los Andes para optar al título de
Licenciada en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Lauren Gabriely Belandria Velazco

CI: V-25.537.367

Katty del Valle Jimenez Zapata

CI: V-22.114.649

Tutor:

Dra. Ysbelia Miyeli Obregón Díaz

Mérida, junio de 2023

DEDICATORIA

Este trabajo es el resultado de mi esfuerzo y entrega, dedicado primeramente a Dios, por ser mi guía en todo momento, sentir su amor y protección, me ha permitido lograr lo que hoy ya es una meta cumplida.

A mis padres Gabriel y Raquel, quienes han sido mi apoyo fundamental, su formación y educación desde niña reflejan la mujer que soy, este logro también es de ustedes, que Dios les de larga vida y salud, para que sigamos celebrando grandes momentos en nuestras vidas.

A mi hermana y amiga, Mariel, sus palabras de aliento y fuerza, me ayudaron a no dejar mis estudios, quiero ser ejemplo para ella, y que nunca olvide que con constancia y esfuerzo se logran grandes cosas.

A mi tutora, la Dra. Ysbelia Obregón, quien me ha apoyado desde el día que la conocí, espero siga estando presente en mi vida, y que pueda verme triunfar.

A mi familia y amigos, que de alguna u otra manera desde el inicio de la carrera universitaria han estado acompañándome y apoyándome.

Lauren Belandria

AGRADECIMIENTOS

Han pasado muchas cosas desde que inicié la carrera universitaria; a pesar de los obstáculos, sigo aquí de pie y con ganas de lograr muchos objetivos, espero Dios me dé salud y larga vida, que mis seres queridos me vean feliz y exitosa.

Agradecida con Dios y la Virgen, me han dado fortaleza y sabiduría para lograr las cosas que he pedido de todo corazón.

A mis padres, Gabriel y Raquel, por darme la vida, por acompañarme, guiarme, aconsejarme; sé que con mucho esfuerzo me han apoyado a pesar de los momentos difíciles. Han estado conmigo cuando más lo he necesitado, gracias por todo, los amo.

A mi hermana, Mariel, la pequeña gigante, mi amiga, cerca o lejos, me ha animado y motivado a seguir adelante, te amo.

A la Ilustre Universidad de Los Andes, especialmente a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, tantas anécdotas desde antes de comenzar la carrera universitaria, entre risas, lágrimas y estudio junto a mis compañeros de clase, fue una bonita experiencia.

A mi profesora, la Dra. Ysbelia Obregón, profesional de admirar, gracias por la paciencia, apoyo, los conocimientos brindados; además del amor y cariño transmitido, su ayuda fue fundamental en la realización de este trabajo.

Al jurado evaluador, la Dra. Alida Pérez y la Dra. Yndra Cordero; agradecida por su aporte y sugerencias en este estudio.

A los profesores y personal técnico que labora en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, gracias por el apoyo brindado en la parte experimental de este trabajo.

A todos los profesores, que fueron parte fundamental en mi formación académica durante estos años, gracias por las enseñanzas; quienes, a pesar de las adversidades, siguen en pie de lucha para mantener la Universidad abierta porque aman lo que hacen.

A mis compañeros de Universidad y futuros colegas, gracias a quienes desde los primeros semestres han estado presente, hemos celebrado buenas calificaciones, cumpleaños, reímos, lloramos; ustedes han sido parte de este largo camino, aunque algunos se fueron del país los tengo presente, los llevaré siempre en mi corazón, Scarleht, Lina, Mary, Francis, Ana, Yessica, Scarlett, Josué, Miguel, María, Paola, Teresa; espero verlos siendo exitosos en su carrera profesional.

A mi familia, gracias porque me han brindado su apoyo a lo largo de la carrera universitaria.

A mi amiga, Jennifer, muchos años de amistad y gratos momentos compartidos, gracias por ser parte de mi vida, te quiero.

A mi amiga y vecina, Ketina, gracias por el cariño, ayuda y palabras de ánimo que nunca me faltan; mi admiración porque has luchado hasta vencer la batalla siempre de la mano de Dios, te quiero.

Finalmente, gracias a las personas que llegaron a mi vida cuando menos lo esperaba y han sido parte de este camino, me han impulsado y motivado a continuar; son especiales para mí, siempre los llevaré en mi corazón.

Lauren Belandria

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ESQUEMAS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	4
Planteamiento del Problema.....	4
Justificación de la Investigación.....	6
Objetivos de la Investigación.....	7
<i>Objetivo General</i>	7
<i>Objetivos Específicos</i>	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	8
<i>Alcances de la Investigación</i>	8
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	9
Trabajos Previos.....	9
Antecedentes Históricos o Epistemológicos.....	15
Bases Teóricas.....	16
Familia Crassulaceae.....	16
Género <i>Kalanchoe</i>	19
Especie <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i>	23
Productos Naturales.....	27
Extractos Vegetales.....	33
Tamizaje Fitoquímico.....	36
Bacterias.....	40

ÍNDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

Antibiótico.....	47
Actividad Antibacteriana.....	49
Definición Operacional de Términos.....	52
Operacionalización de las Variables.....	55
Hipótesis.....	58
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO.....	59
Tipo de Investigación.....	59
Diseño de Investigación.....	59
Población y Muestra.....	60
<i>Unidad de Investigación.....</i>	<i>60</i>
<i>Selección del Tamaño de la Muestra.....</i>	<i>60</i>
Sistema de Variables.....	60
Instrumento de Recolección de Datos.....	61
Procedimiento de la Investigación.....	61
Diseño de Análisis.....	76
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	78
Resultados.....	78
Discusiones.....	85
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	90
Conclusiones.....	90
Recomendaciones.....	91
BIBLIOHEMEROGRAFÍA.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

N°		Pág.
1	Algunos compuestos químicos aislados en la familia Crassulaceae.....	17
2	Estructura química de algunos metabolitos aislados del género <i>Kalanchoe</i>	21
3	Especie <i>Kalanchoe gastonis-bonnierei</i>	24
4	Algunos metabolitos aislados de la especie <i>Kalanchoe gastonis-bonnierei</i>	26
5	Pared celular de las bacterias Gram positivas.....	42
6	Pared celular de las bacterias Gram negativas.....	44

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pág.
1	Clasificación taxonómica de la Familia Crassulaceae.....	17
2	Clasificación taxonómica del género <i>Kalanchoe</i>	20
3	Clasificación taxonómica de la especie <i>Kalanchoe gastonis-bonniieri</i>	25
4	Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana de las hojas de <i>Kalanchoe gastonis-bonniieri</i> en cepas de referencia internacional.....	56
5	Operacionalización de la variable independiente: Composición química de las hojas de <i>Kalanchoe gastonis-bonniieri</i>	57
6	Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).....	72
7	Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas.....	75
8	Pesos obtenidos y porcentaje de rendimiento de los extractos vegetales de hexano y etanol de las hojas de <i>Kalanchoe gastonis-bonniieri</i>	78
9	Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos obtenidos de las hojas de <i>Kalanchoe gastonis-bonniieri</i>	79
10	Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de las hojas de..... <i>Kalanchoe gastonis-bonniieri</i>	80
11	Resultados obtenidos para la determinación de la actividad antibacteriana de extractos de <i>Kalanchoe gastonis-bonniieri</i>	82
12	Reporte de los resultados ilustrados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de <i>Kalanchoe gastonis-bonniieri</i>	83

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Nº		Pág.
1	Procedimiento empleado para la separación e identificación de los componentes de las hojas <i>Kalanchoe gastonis-bonnierei</i>	62
2	Procedimiento para la obtención de los extractos de hexano y etanol de las hojas de <i>Kalanchoe gastonis-bonnierei</i>	65
3	Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas <i>Kalanchoe gastonis-bonnierei</i> por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer).....	71

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO
DE LAS HOJAS DE *Kalanchoe gastonis-bonnierei* EN CEPAS DE
REFERENCIA INTERNACIONAL

Trabajo de Grado II

Autores:

Lauren Gabriely Belandria Velazco

CI: V-25.537.367

Katty del Valle Jimenez Zapata

CI: V-22.114.649

Tutor:

Dra. Ysbelia Miyeli Obregón Díaz

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

Al género *Kalanchoe* pertenecen algunas plantas usadas en la medicina tradicional para tratar enfermedades como el cáncer, infecciones, quemaduras, inflamaciones, entre otras. El objetivo del trabajo fue confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* en cepas de referencia internacional. El diseño de esta investigación fue experimental, de campo y laboratorio. La planta se recolectó en el sector Campo de Oro de la ciudad de Mérida, en el Jardín de Plantas Medicinales "Dr. Luis Ruiz Terán" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, esta fue llevada al Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de dicha facultad para realizar el secado y molienda de las hojas, la obtención de los extractos fue por reflujo usando los disolventes de hexano y etanol. A través de las pruebas químicas de laboratorio se identificaron los metabolitos secundarios, determinándose la presencia de triterpenos y esteroides en el extracto de hexano, además de esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides en el de etanol. La evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico fue realizada mediante el método de Kirby-Bauer a una concentración de 10 mg/mL, dicho extracto fue activo frente las cepas de *Staphylococcus aureus* (8 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm) y *Klebsiella pneumoniae* (7 mm).

Palabras Clave: *Kalanchoe gastonis-bonnierei*, actividad antibacteriana, tamizaje fitoquímico, cepas de referencia internacional.

INTRODUCCION

La búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana en fuentes no tradicionales como las plantas superiores, es importante porque existe la posibilidad de encontrar metabolitos con buena actividad antimicrobiana frente a las bacterias resistentes a antibióticos y con otras propiedades que permitan su utilización como agentes quimioterapéuticos, desinfectantes o como preservativos en productos farmacéuticos o en alimentos (Mantilla y Sanabria, 1995).

Las plantas han necesitado desarrollar mecanismos químicos de defensa que posibilitan su supervivencia frente al ataque de microorganismos y herbívoros. Dichos mecanismos han contribuido con el amplio espectro de sustancias orgánicas propias de las mismas. A toda esa diversidad de compuestos que el hombre extrae de las plantas, aprovecha o intenta darle alguna utilización los denominamos productos naturales (Ringuelet y Viña, 2013). Un producto natural está formado por todos los compuestos de la naturaleza, siendo estos los metabolitos secundarios. La importancia de estos radica en la propia función biológica en la que son biosintetizados, pueden ser útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos, pueden servir como modelos para la preparación de sustancias bioactivas, de materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico y/o interés industrial, estructuras privilegiadas usando el concepto de farmacología para aquellos productos que son capaces de interactuar con diversas proteínas y realizar acciones útiles para la salud en procesos patológicos (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Con respecto al desarrollo y aplicación del tamizaje fitoquímico se han reportado en la literatura esquemas de trabajo que comprenden a su vez el uso de diferentes solventes de extracción. Es importante señalar que los resultados que se pueden obtener mediante estas técnicas ofrecen solo una visión de la composición química de

la planta a estudiar y que no puede tomarse en ningún caso como un resultado indiscutible, debido a que en la presencia o ausencia de un metabolito pueden influir ciertos parámetros, como la época de recolección, la concentración o pueden producirse alteraciones de alguno de ellos por la influencia de la temperatura (Miranda y Cuellar, 2001; Peña, 2002).

Además, la ciencia moderna analizando y estudiando los efectos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades para agrupar aquellas que poseen efectos similares, conocer los principios activos responsables de aliviar o curar enfermedades, separar estos de las plantas que lo contienen, para determinar sus estructuras químicas, sintetizarlos, formular modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y así dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios (Canales, Carazo y Centeno, 2011).

Las plantas del género *Kalanchoe* a nivel mundial, son utilizadas para curar distintas enfermedades como la bronquitis, la tos, el sarampión y el cáncer (Villamizar, Mosquera, Mejia, Muñoz y Pombo, 2014). Es por esto que es necesario la realización de un estudio sobre este género, con el objetivo de identificar las propiedades que favorezcan el tratamiento de infecciones producidas por bacterias y que ayuden a precisar los compuestos químicos que le brindan las características antimicrobianas (Gómez, 2019).

Varias razones justifican la realización de esta investigación. Entre ellas, que la especie seleccionada *Kalanchoe gastonis-bonnieri* no ha sido estudiada a gran escala a pesar del uso terapéutico que posee, por ello se quiere conocer más sobre las potencialidades que tiene en el tratamiento de diversas enfermedades. Los organismos mundiales, encargados de cuidar por la salud humana, recomiendan y promueven la práctica de terapias tradicionales y alternativas cuando éstas han demostrado su

utilidad y representan un riesgo mínimo (Organización Mundial de la Salud, 2007 y 2014).

La presente investigación centra su interés sobre el estudio basado en la actividad antibacteriana y tamizaje fitoquímico, ya que se pretende corroborar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnieri* en cepas de referencia internacional.

Dicha investigación ha sido sistematizada de la siguiente manera. El Capítulo I: El Problema, formado por los siguientes subtítulos: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II: Marco Teórico, en este se enmarcan los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos o Epistemológicos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. El Capítulo III: Marco Metodológico, describe el Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Unidad de Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Procedimientos o Metodología de la Investigación y Diseño de Análisis. El capítulo IV está titulado como Resultados y Discusiones, y el capítulo V está titulado y compuesto por, las Conclusiones y Recomendaciones.

CAPITULO I

El Problema

Planteamiento del Problema

A través del tiempo, el conocimiento de las propiedades medicinales de las plantas se ha transmitido al interior y entre las comunidades humanas para diversos fines, incluyendo el tratamiento de enfermedades infecciosas. La tradición de “curar con plantas” tiene soporte científico, debido a que los compuestos activos producidos durante el metabolismo secundario vegetal, son generalmente responsables de diversas actividades biológicas (Silva y Fernandes, 2010). Las plantas medicinales son materia prima esencial de muchos químicos para medicamentos, por ejemplo: antimaláricos, antidiabéticos y terapias contra el cáncer; ya que poseen numerosos componentes químicos activos como ácidos grasos, esteroides, alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y terpenos, los cuales pueden tener una actividad biológica en humanos provocando diversos efectos o respuestas en el organismo, ya sean positivas o negativas (Raimi, Kopaopa, Mugivhisa, Lewu, Amoo y Olowoyo, 2020).

El desarrollo de la resistencia a los antibióticos es un proceso natural e inevitable. Es así porque los microorganismos son seres vivos que a lo largo de su evolución han desarrollado estrategias que les permitan explorar nuevos nichos y sobrevivir. Los antibióticos no son invención del hombre, están presentes desde cientos de millones de años antes de que los humanos empezaran a poblar el planeta. Los microorganismos durante siglos se han enfrentado con compuestos diversos, de los que se derivan los antibióticos y por consecuencia pueden actualmente tener resistencia de entrada (Martínez, 2008).

La resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos constituye un serio problema de salud a nivel mundial y un reto aún mayor para el futuro, es causa de mortalidad incrementada, prolongación de las enfermedades tanto en personas y animales. Asimismo, afecta la salud, los medios de subsistencia y la seguridad alimentaria, aumenta el costo de los tratamientos médicos, y ejerce un impacto directo sobre la salud y la actividad económica en general (Serra, 2017).

Un punto importante a destacar es la resistencia a los antibióticos, esta surge cuando un microorganismo desarrolla la capacidad de sobrevivir ante la presencia de un antibiótico al que normalmente es sensible. Esto provoca un aumento de la dificultad que supone el tratamiento de infecciones y un incremento significativo del riesgo de propagación de estas mismas enfermedades, provocando asimismo la aparición de formas más graves de éstas (Murray, Ikuta, Sharara, Swetschinski, Robles, Gray, Han, Bisignano, Rao, Wool, Johnson, Browne, Chipeta, Fell, Hackett, Haines-Woodhouse, Kashef, Kumaran, McManigal y Naghavi, 2022). A lo largo de los años, cada vez más microorganismos, los cuales han sido expuestos a crecientes cifras de agentes antibacterianos en las más variadas concentraciones, eventualmente han desarrollado resistencia a prácticamente todos los antibióticos en uso (Hollis y Ahmed, 2013).

Una vez descrita la situación actual del problema de investigación, se plantea el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* en cepas de referencia internacional?

Justificación e Importancia de la Investigación

El uso de plantas para el tratamiento de diversas enfermedades e infecciones es una gran alternativa para la humanidad, ya que existe la posibilidad de que en los extractos de las mismas se encuentren metabolitos que posean actividad antibacteriana frente a cepas resistentes a antibióticos, al igual de que estos inhiban o no el crecimiento de dichas cepas (Critchley, Blosser-Middleton, Jones, Thornsberry, Sahm y Karlowsky, 2003; Dartois, Sánchez, Cabezas, Chi, Dubbelde, Dunn, Granja, Gritzen, Weinberger, Ghadir, y Parr, 2005). Así mismo la realización del tamizaje fitoquímico permite determinar la presencia o ausencia de los principales metabolitos de una planta, y aquellos que resulten del estudio pueden ejercer una acción terapéutica potencial, así como propiciar su obtención para la elaboración futura de productos farmacéuticos (Sharapin, 2000).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, se seleccionó a la planta del género *Kalanchoe* debido a la gran cantidad de compuestos químicos y uso tradicional reportado, para contrarrestar distintas enfermedades, entre las que destacan la acción antifúngica, anticancerígena, úlceras gástricas, antiinflamatoria, vasoconstrictora, diurética, antimicrobiana, antiséptico urinario y de acción sobre el sistema nervioso central. Para dar a conocer los usos terapéuticos 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).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* en cepas de referencia internacional.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* por la técnica de reflujo en caliente.
- Identificar cualitativamente la presencia de metabolitos en los extractos obtenidos de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* por medio del tamizaje fitoquímico.
- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas por medio del método de difusión de disco (Kirby-Bauer) frente a cepas ATCC.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

La presente investigación tiene como finalidad obtener conocimientos sobre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei*, con el propósito de brindar una mayor información sobre su posible uso medicinal, ya que esta es la primera investigación de la especie realizada en Mérida, Venezuela.

Limitaciones de la Investigación

El desarrollo del presente trabajo de investigación se vio limitado por la escasez y el alto costo de los materiales necesarios para la ejecución de la parte experimental en el laboratorio, también se presentaron algunas fallas en los servicios públicos los cuales obstaculizaron la ejecución de la misma.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Navarro, Agosto y Hipólito (2023), publicaron un trabajo titulado Composición fitoquímica y propiedades antioxidantes de la planta (mala madre) *Kalanchoe pinnata*. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la composición de fitoconstituyentes y de propiedades antioxidantes de las hojas de un extracto crudo de *Kalanchoe pinnata*. Para la extracción de los fitoconstituyentes utilizaron dos metodologías, realizando una comparación visual de los extractos obtenidos por Extracción Rápida con Agua Caliente Presurizada (ERACP) y Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU), tomando en cuenta que para EAU hicieron 3 ciclos de 10 minutos cada uno mientras que la (ERACP) solo tuvo un ciclo debido a que el agua caliente presurizada dañaba el material vegetal. Se observó que, a medida que aumentaron los ciclos de (EAU) el extracto aumentó de color, este hecho muestra la relación proporcional entre la cantidad de metabolitos obtenidos y los ciclos de extracción. Para la determinación de compuestos fitoquímicos, se utilizó la primera fracción recolectada de (ERACP) y la fracción correspondiente al 3° ciclo de (EAU). Los resultados indican que los constituyentes encontrados en el extracto acuoso de las hojas de *Kalanchoe pinnata* fueron taninos, terpenoides, esteroides y glucósidos. Por otro lado, evaluaron las propiedades antioxidantes, los análisis fueron: poder reductor de los antioxidantes, donde demostraron que a medida que aumentó la concentración de 0,04 a 0,06 mg/mL se registró una mayor capacidad reductora. El segundo análisis fue la actividad estabilizante del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) que indicó que el ácido ascórbico presentó en promedio 97,76 % de capacidad estabilizante, mientras que las hojas de *Kalanchoe pinnata* tuvieron 20,93 unidades

menos, lo cual equivale al 76,83 % de capacidad estabilizante de radicales libres, ambas muestras obtuvieron una capacidad mayor al 50 % evidenciando un alto potencial antioxidante; también evaluaron el contenido fenólico total, donde se utilizó una curva de calibración de ácido gálico con concentraciones de 0,001 hasta 0,05 mg/mL que mostró una concentración de 0,04 mg/mL, dando como resultado 156,59 miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo (mg EAG/g); igualmente se determinó la habilidad para descomponer peróxido de hidrógeno, usando diferentes concentraciones del extracto acuoso (de 0,04 a 0,08 mg/mL). Los resultados obtenidos indicaron que a 0,04 mg/mL se determinó un 65,4 % de capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno; y por último realizaron un barrido de radicales superóxido, utilizando como referencia el ácido ascórbico. En esta prueba se considera que el aumento de absorbancia indica una mayor concentración de radicales superóxido, los resultados mostraron una disminución de la absorbancia al aumentar la concentración de extracto indicando, de esta manera, que el extracto de la planta en estudio mostró la capacidad de barrido de radicales libres, capacidad comparable con la observada en el ácido ascórbico. Los metabolitos identificados indicaron que las hojas de la planta podrían tener propiedades antioxidantes, ya que se observó que el extracto presentó alta actividad de secuestro de radicales libres, poder reductor, capacidad de secuestrar radicales superóxidos y descomponer peróxido de hidrógeno. Esto convierte a las hojas y posiblemente a la planta completa en objeto de estudio importante por su posible aplicación en patologías que estén relacionadas con procesos inflamatorios y la presencia de especies reactivas de oxígeno.

Rivero, Prieto, Hernández, Zaragoza y Madariaga (2022), realizaron un trabajo de investigación titulado Efecto antihelmíntico y antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Kalanchoe daigremontiana*. Los investigadores trabajaron con cinco concentraciones 200 mg/mL, 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL y 12,5 mg/mL del extracto hidroalcohólico de la planta para determinar su efecto antihelmíntico, realizaron las pruebas de inhibición de la eclosión, inhibición de la

motilidad y mortalidad larvaria sobre *Haemonchus contortus*. Se encontró una tasa de inhibición de la eclosión de los huevos (IEH %) diferente con respecto a los controles positivos y negativos en el rango 100-200 mg/mL (99,5 %). Por otro lado, la mortalidad (MOR %) también fue significativamente diferente con respecto a los controles, observándose los valores más altos a la concentración de 50 y 25 mg/mL (16,4 y 14,5 %, respectivamente). En cuanto a la inhibición de la motilidad (IMOT %), el valor más alto fue a 200 y 100 mg/mL (85,2 y 73,1 %, respectivamente). Los valores de las concentraciones de 50 % (CL₅₀) y 90 % (CL₉₀) para la eclosión de los huevos fueron de 66,5 y 87,3 y de 1,5 y 240,9 mg/mL para la inhibición de la motilidad en las larvas de la fase L3 de *H. contortus*. Por otro lado, evaluaron la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico sobre *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de dicho extracto, emplearon el método de microdilución en caldo, prepararon diluciones seriadas dobles (de 400 a 0,781 mg/mL) por duplicado (100 µL por pocillo), donde mostró actividad sobre las bacterias, determinándose una (CMI) de 100 mg/mL sobre *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes*, y 0,781 mg/mL para *B. subtilis* y *S. aureus*. Estos resultados señalan el potencial efecto antihelmíntico y antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *K. daigremontiana*, contra *H. contortus*, bacterias Gram negativas y Gram positivas, mostrando el mejor efecto sobre la inhibición de la eclosión de huevos y la motilidad larvaria de *H. contortus* y sobre el crecimiento de *B. subtilis* y *S. aureus*. Concluyendo que dicho extracto puede utilizarse como alternativa natural para el control o tratamiento de las enfermedades asociadas a estos microorganismos, aunque es necesaria la identificación de los metabolitos secundarios asociados a estas actividades biológicas, así como ensayos de toxicidad *in vitro* e *in vivo*.

Molina (2022), en su trabajo titulado Evaluación antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales de *Vernonanthura patens* y *Kalanchoe pinnata* en condiciones de laboratorio. Su objetivo fue determinar la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos obtenidos en ambas plantas, mediante diferentes pruebas químicas se identificaron metabolitos secundarios como flavonoides, fenoles, taninos, antraquinonas y esteroides, encontrándose estos en grandes cantidades en el extracto etanólico de *V. patens*; por otro lado, en el extracto etanólico de *K. pinnata*, además de los metabolitos antes mencionados, se determinaron saponinas en bajas concentraciones; la actividad antibacteriana de este último se realizó mediante Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a *Pseudomonas* sp., a una concentración 0,5 mg/mL y *Escherichia coli* fue a 0,7 mg/mL, a pesar de existir inhibición en esta última no fue comparable frente al antibiótico usado como control positivo. De igual manera se comparó el extracto alcohólico de *V. patens* a diferentes concentraciones con el antibiótico control, siendo eficaz para la inhibición de *Pseudomonas* sp., sin embargo, frente a *E. coli* se observó que ninguno de los tratamientos fue efectivo a pesar de presentar un halo de inhibición. Con respecto a la actividad antifúngica de *Fusarium* sp., se evaluaron dos periodos de incubación (5 y 10 días), utilizando tres tratamientos a diferentes concentraciones 0,5; 0,6 y 0,7 mg/mL respectivamente; en cuanto al extracto alcohólico de *K. pinnata*, luego de 5 días de haber inoculado el microorganismo se evaluaron tres tratamientos frente a dos controles, uno positivo y uno negativo, observándose que el tratamiento 2 y 3 tenían más similitud con el control positivo, sin embargo, el tratamiento 1 no fue eficiente en este periodo de tiempo ya que se asemejó más al control negativo. Seguidamente, pasado los 10 días de incubación el porcentaje de inhibición obtenido fue mayor en los tres tratamientos con efectos fungicidas. En cuanto al extracto etanólico de *V. patens*, a los 5 días de incubación el tratamiento 1 y 2 frente al control negativo mostraron una diferencia significativa, sin embargo, el tratamiento 3 se consideró como el más eficiente debido a la similitud frente al control positivo, y después de 10

días de incubación se evidenció que los tres tratamientos tienen similitud comparado con el control positivo; por lo tanto, son efectivos.

Saleem, Lakshmi, Baby, Nujahath, Nissi, Anusha, y Kumar (2022), en su trabajo titulado Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* y *Kalanchoe delagoensis*. El objetivo del estudio fue evaluar las posibles propiedades antimicrobianas del extracto etanólico de las hojas de ambas especies. Los extractos fueron obtenidos mediante el método de soxhlet usando etanol como solvente. En el análisis fitoquímico realizado con la mezcla de los extractos de ambas especies, observaron la presencia de alcaloides, esteroides, fenoles, glucósidos y flavonoides. La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *K. gastonis-bonnierei*, el de *K. delagoensis* y la mezcla del extracto de ambas especies se realizó por el método de difusión en pozos de agar frente a seis bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la mezcla de las dos especies mostró actividad contra *E. coli* ($38,6 \pm 1,5$ mm), *K. pneumoniae* ($35 \pm 1,5$ mm), *S. aureus* ($33,67 \pm 0,53$ mm), *B. subtilis* ($31 \pm 1,0$ mm), *S. typhi* ($28,5 \pm 1,07$ mm) y *P. aeruginosa* ($28 \pm 1,07$ mm); en el extracto de *K. delagoensis* la actividad fue para *S. aureus* ($36,2 \pm 0,53$ mm), *K. pneumoniae* ($35 \pm 1,23$ mm), *E. coli* ($35 \pm 1,2$ mm), *S. typhi* ($31 \pm 1,7$ mm) *B. subtilis* ($30 \pm 1,05$ mm) y *P. aeruginosa* ($28 \pm 1,7$ mm) Por último, el extracto *K. gastonis-bonnierei* presentó actividad contra *K. pneumoniae* ($37,06 \pm 0,3$ mm), *E. coli* ($35 \pm 1,02$ mm), *S. aureus* ($33,72 \pm 0,32$ mm), *B. subtilis* ($32 \pm 1,5$ mm), *S. typhi* ($30 \pm 1,68$ mm) y *P. aeruginosa* ($26 \pm 1,34$ mm). Se espera que este estudio conduzca al establecimiento de algunos compuestos que podrían usarse para formular fármacos antimicrobianos nuevos y más potentes de origen natural.

Valenzuela (2020), en su trabajo titulado Estudio Farmacognóstico de las especies *Kalanchoe gastonis-bonnierei* y *Kalanchoe daigremontiana*. Realizó un control de calidad, para lo cual se evaluó el contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico (HCl), humedad y grasas totales; para la especie *K. gastonis-bonnierei*, los resultados fueron de $2,06 \pm 0,228$ %, $20,26 \pm 0,29$ %, $0,25 \pm 0,04$ % y $2,48 \pm 0,09$ % respectivamente, mientras que para *K. daigremontiana* los valores dieron de $4,46 \pm 0,313$ %, $19,05 \pm 0,07$ %, $0,44 \pm 0,04$ % y $1,07 \pm 0,04$ %. Además, preparó el extracto total de las hojas de cada una de las especies con una mezcla de solventes diclorometano-metanol (1:1) mediante maceración estática, obteniéndose un porcentaje de rendimiento de 10,62 % y 11,68 %; respectivamente. Por otro lado, tomando en cuenta el modo de consumo de las hojas, se preparó la infusión y el jugo de las mismas, obteniéndose un mayor rendimiento en el jugo en relación a la infusión. En el extracto de diclorometano-metanol se identificó los principales grupos de productos naturales, mediante el tamizaje fitoquímico, determinándose la presencia de flavonoides, esteroides, terpenos, taninos y glucósidos cardiotónicos, en ambas especies. A partir del método espectrofotométrico, se evaluó el contenido de flavonoides totales, mediante una curva de calibración partiendo de la quercetina y el ácido gálico como activo de referencia; la especie *K. daigremontiana* presentó mayor contenido correspondiente a $11,04 \pm 0,50$ mg EQ/g de extracto seco (expresados en mg EQ/g extracto) en relación a *K. gastonis-bonnierei*, esta contiene $7,81 \pm 0,53$ mg EQ/g extracto seco. La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu y se estableció que el extracto diclorometano-metanol (1:1) de *K. daigremontiana* posee un porcentaje de $55,74 \pm 1,06$ mg EAG/g. Además, mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH), se evaluó su actividad antioxidante, en donde se estableció que *K. daigremontiana* presenta mayor capacidad antioxidante a una concentración de 0,01 mg/mL con un porcentaje de inhibición del $57,04 \pm 0,48$ % y un IC_{50} 0,00843 mg/mL del 18,99 %. Finalmente, mediante el bioensayo en *Artemia salina*, se halló que la infusión de la *K. daigremontiana* y el jugo de *K. gastonis-bonnierei* son inocuos.

Antecedentes Históricos o Epistemológicos

Existen muchos documentos que relatan como las plantas se utilizan con fines terapéuticos en todo el mundo y desde tiempos remotos. Sin embargo, la idea de utilizar como medicamento un compuesto “puro” obtenido a partir de una planta con acción terapéutica, surge en 1803 con el aislamiento de los primeros alcaloides. El farmacéutico alemán Friedrich Wilhelm Adam Sertürner los descubre intentando obtener el principio activo del opio. En 1819, Pelletier y Caventou, dos químicos franceses aislaron dos alcaloides diferentes a partir de muestras de corteza de cinchona, la quinina y la cinchonina. En 1826, Heinrich Emanuel Merck obtiene la morfina a partir del opio (*Papaver somniferum* L.) y en 1831 se aísla la atropina de la planta *Atropa belladonna* L. La primera droga semisintética, la aspirina, creada por Bayer aparece en 1899 (Barquero, 2007).

El empleo de las plantas para la alimentación del hombre y la curación de diversas enfermedades, convierte a la medicina herbaria en la alternativa principal para la atención primaria de la salud. Esta experiencia fue transmitida de generación en generación, a tal punto, que, en la actualidad, en pleno siglo XXI, son denominadas plantas de uso tradicional, lo cual continuará hasta el fin de los tiempos (García, Roche, Blanco y Rodríguez, 2009).

La planta estudiada en esta investigación es procedente de la familia Crassulaceae, su nombre viene del latín crassus, -a, -um, que significa "espeso, graso, denso" por las hojas que son espesas, está integrada por arbustos y plantas herbáceas suculentas o crasas, incluidas en 35 géneros. El género *Kalanchoe* fue publicado por Michel Adanson en 1763. La especie *Kalanchoe gastonis-bonnierii* fue descrita por Raym. - Hamet & Henry Perrier y publicado en Annales des sciences naturelles; Botanique, para el año 1912 (Singab, El-Ahamdy, Labib y Fekry, 2011).

Bases Teóricas

Familia Crassulaceae

Aspectos Botánicos

Las Crasuláceas, forman una gran familia de plantas del orden Saxifragales, generalmente son plantas herbáceas, algunas subarborescentes y relativamente pocas arbóreas o acuáticas. Estas plantas almacenan agua en sus hojas suculentas, ya que su hábitat lo conforman típicamente zonas secas y calurosas, donde el agua es escasa (Christenhus y Byng, 2016).

Distribución geográfica

La mayoría de las Crasuláceas crecen como rupícolas en zonas áridas, semiáridas o templadas. Se distribuyen por casi todo el mundo, excepto en la Polinesia, y son escasas en Australia y Sudamérica (Pérez-Calix, 2008; Ramírez Ulloa, 2017; Thiede y Egli, 2007; Van Ham, 1995).

Clasificación taxonómica

La familia está integrada por 35 géneros, número que podrá variar según los diferentes criterios de clasificación y aproximadamente 1500 especies, que se distribuyen prácticamente en todo el mundo. Entre los géneros importantes están: *Sedum*, *Crassula*, *Echeveria*, *Kalanchoe*. La familia Crassulaceae, se clasifica taxonómicamente de la siguiente forma (Tabla 1) (Aguilar y Bastidas, 2016).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la Familia Crassulaceae

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Saxifragales
Familia	Crassulaceae

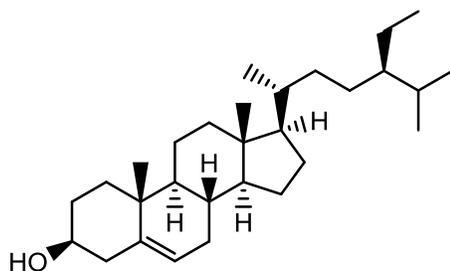
Tomado y modificado de Aguilar y Bastidas, 2016.

Compuestos químicos aislados

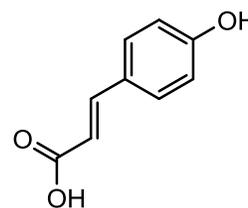
La familia es reconocida por su alto contenido de mucílagos, calcio y cloro en altas concentraciones, además de presentar esteroides como el β -sitosterol [1], también se han identificado fenoles (ácido cumárico [2], ferúlico [3], ácido *p*-hidro-xibenzoico [4] caféico); brioofilina [5], flavonoides y ácidos acético [6] (Figura1) (Cabrera, 2005).

www.bdigital.ula.ve

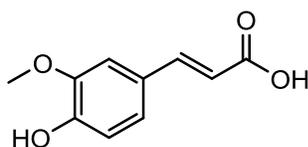
Figura 1. Algunos compuestos químicos aislados en la familia Crassulaceae



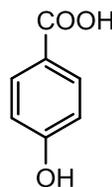
β -sitosterol [1]



Ácido cumárico [2]



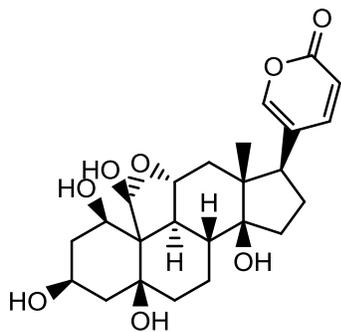
Ácido ferúlico [3]



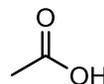
Ácido *p*-hidroxibenzoico [4]

Tomado y modificado de Navarro, Agosto y Hipólito, 2023.

Figura 1. Algunos compuestos químicos aislados en la familia Crassulaceae (continuación).



Briofilina [5]



Ácido acético [6]

Tomado y modificado de Navarro, Agosto y Hipólito, 2023.

Usos etnobotánicos

El uso externo de las hojas en su forma natural o machacada y aplicada sobre la frente contra cefalea o dolor de cabeza. También se recomienda el uso oral del jugo de la hoja contra el resfrío y la decocción de estas contra el dolor de pecho y la tos (Cabrera, 2005).

Actividad farmacológica o biológica

La briofilina presente en el extracto acuoso de las hojas es citotóxica, antiséptica, antienterocolítica, bactericida y activa contra los trastornos intestinales ligados a bacterias patógenas, el ácido cumárico es bactericida, colerético e inhibe la síntesis de prostaglandinas y lipoxigenasas. El ácido ferúlico es analgésico, antiagregante plaquetario, antidismenorreico y antiespasmódico. Además de presentar sales de potasio que inducen a una actividad diurética (Cabrera, 2005).

Género *Kalanchoe*

Aspectos botánicos

El género *Kalanchoe* comprende cerca de 125 especies (Remib, 2008). Muchas de ellas son conocidas como “madre de miles” debido a que desarrollan plántulas en los márgenes de las hojas, utilizando reguladores de crecimiento que son clave en los procesos de organogénesis y embriogénesis (Garcés, Champagne, Townsley, Park, Malho, Perdroso y Sinha, 2007). Diversos estudios llevados a cabo en las especies de *Kalanchoe* se han realizado en el campo de la fisiología vegetal debido a que se ha utilizado como modelo para el estudio del metabolismo del ácido crasuláceo, son plantas suculentas y xerófilas, adaptadas a la sequía (García y cols., 2009; Singab y cols., 2011).

Distribución geográfica

Son originarias del continente africano especialmente de los países de Mozambique y Madagascar, pero se encuentran en diferentes partes del mundo (Allorge, Wiart y Teo, 1995). En países como México diversas especies de este género se encuentran en Michoacán, Puebla, Querétaro, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Remib, 2008; Maurice, 1993). En Venezuela la especie *K. daigremontiana*, invade zonas semiáridas al norte del país, en el estado Mérida hay varias especies entre ellas: *K. fedtschenkoi*, *K. pinnata*, *K. gastonis-bonnieri* y *K. beharensis* (Herrera, Chacón, Flores, Benzo, Martínez, García y Hernández, 2011).

Clasificación taxonómica

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, hierba de lechuga y pericón (Villamizar, Mosquera, Mejía, Muñoz y Pombo, 2014). Algunas de las especies más estudiadas dentro de este género son: *K. pinnata*; *K. brasiliensis*; *K. daigremontiana*; *K. gastonis-bonnieri*; *K. marmorata* y *K. verticilata* (Milad, El-Ahmady y Singab, 2014). Se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación taxonómica del género *Kalanchoe*

Familia	Crassulaceae
Subfamilia	Kalanchoideae
Género	<i>Kalanchoe</i>

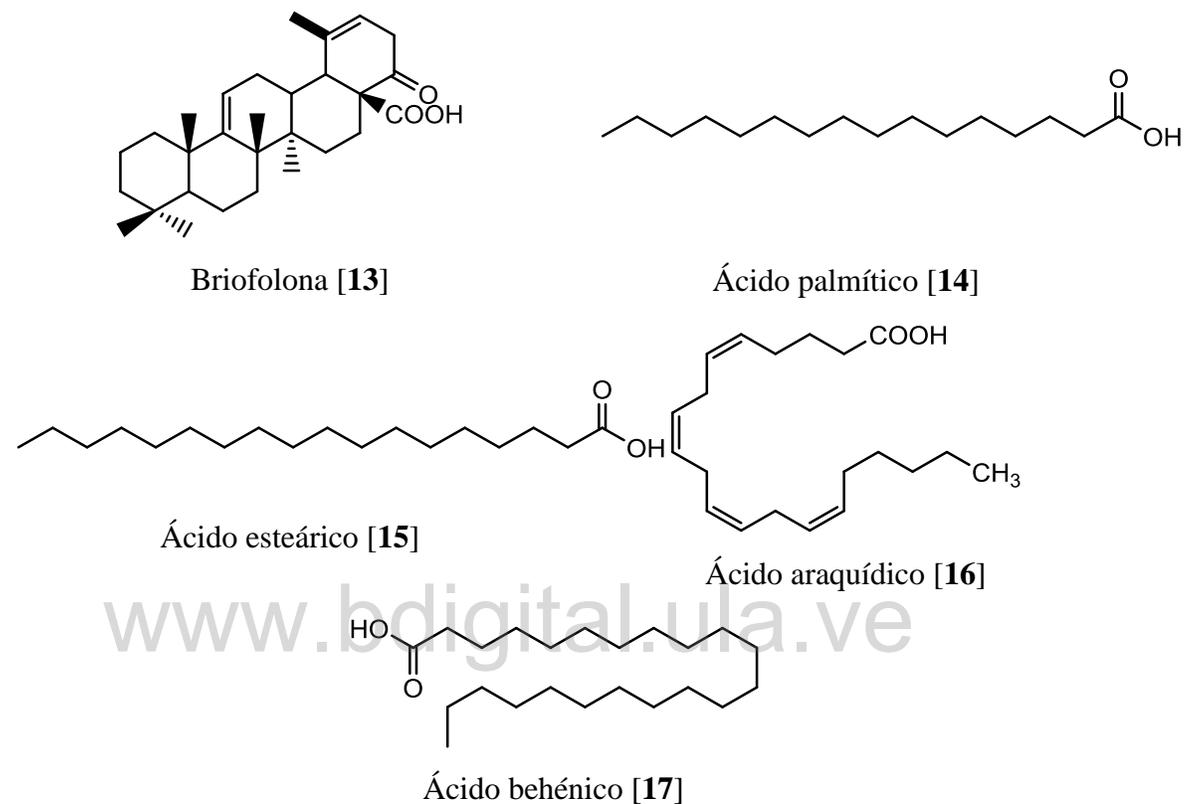
Tomado y modificado de Aguilar y Bastidas, 2016.

Metabolitos aislados del género *Kalanchoe*

Diversos autores han aislado e identificado los constituyentes químicos del género *Kalanchoe*, los cuales pueden ser clasificados principalmente en: flavonoides, cumarinas, bufadienólidos, fenoles, triterpenos, esteroides, fenantrenos y ácidos grasos (Milad y cols., 2014).

Entre los compuestos que se han aislado de plantas de este género destacan (Figura 2) flavonoides como la quercetina [7] y el kaempferol [8]; cumarinas como la 5-hidroxicumarina [9]. Entre los bufadienólidos se encuentran: bersaldegenina-1,3,5-ortoacetato [10] y daigremontianina [11] de *K. daigremontiana* y *K. tubiflora*; también triterpenos, esteroides y fenantrenos de hojas frescas de *Kalanchoe pinnata* como son briofilol [12], briofolona [13]; finalmente fueron identificados ácidos grasos de la especie antes mencionada, encontrándose el ácido palmítico (C16) [14],

Figura 2. Estructura química de algunos metabolitos aislados del género *Kalanchoe* (continuación).



Tomado y modificado de Quintero, 2018.

Usos etnobotánicos

En la medicina tradicional, las plantas de este género se han utilizado para el tratamiento de enfermedades periodontales, infecciones, quemaduras o enfermedades reumáticas, heridas, artritis, disentería, fiebre, tos, cólera, enfermedades urinarias, así como para aliviar dolores de cabeza (Singab y cols., 2011). Sin embargo, en el campo de la etnomedicina, solo *K. brasiliensis* se ha descrito en la literatura como un remedio para tratar el cáncer de próstata humano (Stefanowicz, Asztemborska, Krauze, Godlewska, Gucwa, Moniuszko, Stochmal y Ochocka, 2020).

Actividad farmacológica y/o biológica

El género *Kalanchoe* posee efectos antiulcerosos, antimicrobianos, analgésicos, hipoglucemiantes, cardiovasculares y antiinflamatorios (Garcés y cols., 2007). Los extractos crudos o el jugo de las especies de estas plantas también exhiben propiedades anticancerígenas (Stefanowicz y cols., 2020).

Especie *Kalanchoe gastonis-bonnierei*

Aspectos botánicos

Se define la especie de la siguiente manera: plantas herbáceas anuales, bienales o perennes, sub-arbustivas o arbustivas, carnosas en general. Las hojas son opuestas, carnosas, suculentas, persistentes por una cutícula con pocas estomas que les disminuye la transpiración, su abundante parénquima, acuífero le permite superar condiciones de vida en suelos arenosos de extrema sequía. Las flores están agrupadas en inflorescencias provistas de brácteas que poseen 5 sépalos, 5 pétalos, 5 a 10 estambres, los 5 carpelos que forman el gineceo son libres entre sí. Las inflorescencias son panículas terminales de hasta 50 cm de largo, de color rojizo con semillas numerosas. Además, el fruto es un polifolículo con muchas semillas pequeñas provistas de albumen (Figura 3) (Aguilar y Bastidas, 2016).

Figura 3. Especie *Kalanchoe gastonis-bonnierii*



Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

www.bdigital.ula.ve

Distribución geográfica

La especie *Kalanchoe gastonis-bonnierii* es originaria de Madagascar (África), habiendo sido descubierta por el científico Gastón Bonnier en Francia 1887. Los franceses y los belgas extendieron su cultivo por el mundo desde el Congo Belga, hasta Manaus en Brasil donde se la conoce como Jacaré, llevaron la planta al corazón del Amazonas y por todos sus afluentes llegó a la cuenca del Amazonas, que abarca países como Colombia, Perú, Brasil y Ecuador. Al Ecuador llegó con los viajeros del Amazonas por los ríos Napo, Pastaza y Zamora, en la época de oro del cacao, a ciudades como Chone, Vinges y Guayaquil (Tabla 3) (Lucas, 2014).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de la especie *Kalanchoe gastonis-bonnierei*

Familia	Crassulaceae
Subfamilia	Kalanchoideae
Género	<i>Kalanchoe</i>
Especie	<i>Kalanchoe gastonis-bonnierei</i>

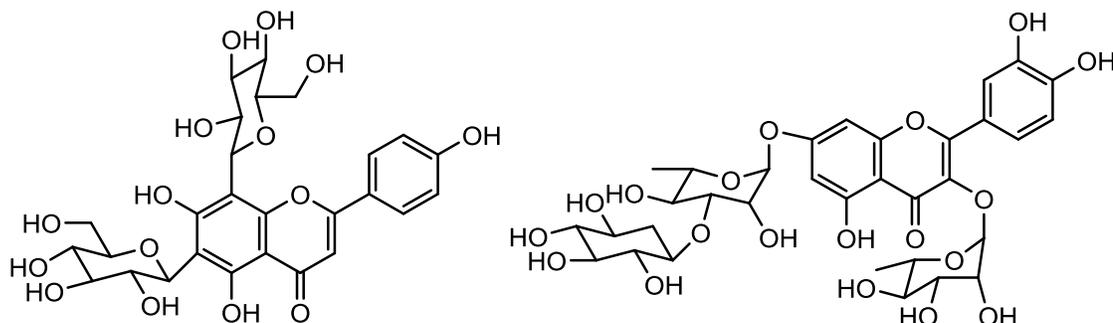
Tomado y modificado de Aguilar y Bastidas, 2016.

Metabolitos aislados de la especie *Kalanchoe gastonis-bonnierei*

La *Kalanchoe gastonis-bonnierei* es rica en alcaloides, triterpenos, glucósidos, flavonoides, esteroides y lípidos, el jugo de la planta contiene bufadienólidos, estos son muy similares en estructura y actividad como los otros glucósidos, digoxina y digitoxina cardiacos (drogas usadas para el tratamiento clínico del paro cardíaco congestivo y de las condiciones que los producen) (Costa, Correa y Casanova, 2015).

Estudios realizados a *Kalanchoe gastonis-bonnierei* han confirmado la presencia de compuestos terpénicos y fenólicos como los flavonoides: 6-C- β -D-glucopiranosil 8-C- β -D-glucopiranosil-apigenina (vicenin-2) [18] 3-O- α -ramnopiranosido-7-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 3) - α -L-ramnopiranosido [19] (Figura 4) (Costa y cols., 2015).

Figura 4. Algunos metabolitos aislados de la especie *Kalanchoe gastonis-bonniери*



6-C-β-D-glucopiranosil-8-C-β-D-glucopiranosil-apigenina (vicenin-2)

[18]

3-O-α-ramnopiranosido-7-O-β-D-glucopiranosil (1→3) -α-L-ramnopiranosido

[19]

Tomado y modificado de Costa, Correa y Casanova, 2015.

Usos etnobotánicos

Kalanchoe gastonis-bonniери, es efectiva para el tratamiento de varios tipos de cáncer, tumores, leucemias, lupus, miomas, complicaciones pulmonares y renales, diabetes, bronquitis, úlceras, quemaduras, problemas cutáneos, entre otras enfermedades. Lo que la hace aún más sorprendente es que al ser un inmune estimulante y un efectivo renovador celular, ayuda a combatir el VIH, existiendo casos de personas que ahora tienen controlada la cantidad de VIH en la sangre (Maila, 2013).

Actividad biológica

El extracto acuoso en crudo de *K. gastonis-bonniери* contiene propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras y vasodilatadoras (Miranda, Puebla, Guzmán y Huacuja, 2003). La actividad antifúngica también ha sido evaluada mediante la

técnica de dilución en microplaca, esto ha sido probado en diferentes extractos (Legramandi, 2011).

Productos Naturales

Los seres vivos son capaces de sintetizar una gran variedad de compuestos, pero se define “producto natural” o “metabolito secundario”, que se usa como sinónimo, aquél que es propio de una especie, se le conoce también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza (Marcano y Hasegawa, 2002). Pueden ser clasificados en primarios y secundarios:

Metabolitos primarios

Son todos aquellos que son esenciales para el funcionamiento de toda materia viva, responsables de su estructura y de todas las reacciones necesarias para mantener el estado vital y posibilitar el crecimiento, el desarrollo y la reproducción. Comprenden los glúcidos o hidratos de carbono, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos (Ringuelet y Viña, 2013).

Metabolitos secundarios

Las plantas contienen múltiples componentes químicos que se pueden tipificar como activos porque provocan diversos efectos o respuestas en el organismo, el perfil que los describe es referido como actividad biológica. Estas son fuente de un gran número de productos metabólicos de importancia comercial y son usados en las industrias farmacéutica, alimenticia, de cosméticos y como fuentes de numerosas sustancias de interés agroquímico (Karuppusamy, 2009). Se estima que más de 100.000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas (Bhalla, Narasimhan y Swarup, 2005). Se agrupan en cuatro clases principales: terpenos, entre los que se

encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales; los compuestos fenólicos como las cumarinas, flavonoides, lignina y taninos; los glucósidos (saponinas, glucósidos cardiacos, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos); y alcaloides (Ávalos y Pérez, 2009).

Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios, más de 40.000 moléculas diferentes (Ávalos y Pérez, 2009). Sus esqueletos carbonados se forman por la unión de dos o más de estas unidades de 5 C, de ahí que también se los denomina isoprenoides. Son liposolubles, o sea solubles en solventes orgánicos, aunque algunos se encuentran solubles en el contenido celular por estar formando parte de glucósidos o poseer alguna transformación estructural (Ringuelet y Viña, 2013).

Síntesis de terpenos

Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP. El isopentenil difosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos (Ávalos y Pérez, 2009).

Compuestos fenólicos

Son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides, muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro (Ávalos y Pérez, 2009). Derivados de los compuestos fenólicos:

- Las cumarinas: son una amplia familia de lactonas, más de 1500 identificadas en más de 800 especies de plantas, que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación. Algunas muestran fototoxicidad frente a insectos, tras activarse por luz UV, acción llevada a cabo por bloqueo de la transcripción y de la reparación de ADN, provocando la muerte celular (Ávalos y Pérez, 2009).
- Los flavonoides: se encuentran entre los compuestos fenólicos. Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo las principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación (Ávalos y Pérez, 2009).
- La lignina: es un polímero altamente ramificado de fenilpropanoides. Se encuentra covalentemente unida a la celulosa y a otros polisacáridos de la pared celular. Es insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos, lo que hace muy difícil su extracción sin degradarla. Se forma a partir de tres derivados fenilpropanoides: los alcoholes coniferílico, cumarílico y sináplico, de manera que cada uno de ellos puede formar numerosos enlaces y ramificaciones haciendo que cada lignina pueda ser única. También tiene función protectora dado que su resistencia mecánica evita que las plantas sean

alimento para animales y, además, su naturaleza química hace que sea difícil digerirla por los herbívoros (Ávalos y Pérez, 2009).

- Los taninos: son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas. El nombre de tanino procede de la antigua práctica de utilizar extractos vegetales para convertir la piel animal en cuero (en el curtido, se unen al colágeno aumentando su resistencia al calor, al agua y a microorganismos) (Ávalos y Pérez, 2009).

Biosíntesis de compuestos fenólicos:

La ruta del ácido malónico: es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores (Ávalos y Pérez, 2009).

La ruta del ácido shiquímico: es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shiquímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales. La fenilalanina y el triptófano se encuentran entre los aminoácidos esenciales para los animales que se incorporan en la dieta. La tirosina no es esencial en el sentido de que los animales pueden sintetizarla por hidroxilación de fenilalanina. La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina. Esta enzima está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos. Las reacciones posteriores a la catalizada por PAL son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes. Los ácidos trans-cinámico y p-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido caféico, cuya principal función es ser

precursores de otros derivados más complejos: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides (Ávalos y Pérez, 2009).

Glucósidos

Su nombre hace referencia al enlace glucosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glucósidos de particular interés: saponinas, glucósidos cardiacos y glucósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glucósidos (Ávalos y Pérez, 2009).

- Saponinas: se encuentran como glucósidos esteroideos, alcaloides o bien glucósidos triterpenos. Son por tanto triterpenoides o esteroideos que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar, por ejemplo), en cuyo caso se denominan sapogeninas. La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas (Ávalos y Pérez, 2009).
- Glucósidos cardíacos: son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glucósidos o de agliconas (Ávalos y Pérez, 2009).
- Glucósidos cianogénicos: son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos, pero se degradan cuando la planta es aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN) (Ávalos y Pérez, 2009).
- Glucosinolatos: también llamados glucósidos del aceite de mostaza, se degradan y desprenden sustancias volátiles responsables del aroma, el olor

y el gusto de condimentos como la mostaza y de vegetales como el repollo, brócoli o coliflor (Brassicaceae) (Ávalos y Pérez, 2009).

Alcaloides

Son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina. Se encuentran en el 20 % aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas. En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas, la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes y analgésicos (Ávalos y Pérez, 2009).

Biosíntesis de los alcaloides:

Las rutas biosintéticas son diversas y los precursores que utilizan las plantas son los aminoácidos: L-ornitina, L-arginina, L-lisina, histidina, L-fenilalanina, L-triptófano o L-tirosina; y en menor proporción otros compuestos que pueden intervenir como la L-prolina, el ácido antranílico, el ácido nicotínico, y otros. El heterociclo requiere de procesos inter o intramoleculares (Bruneton, 2001), pudiendo participar una única molécula de aminoácido (como en el caso de la higrina, de la peletearina), dos moléculas del mismo aminoácido (para la formación de los alcaloides quinolizidínicos y bencilisoquinoleínas), dos aminoácidos diferentes (para el caso de la tubulosina), o varias moléculas del mismo aminoácido como en el caso de la esparteína (Ringuelet y Viña, 2013).

En general la estructura carbonada del aminoácido es mantenida intacta en la estructura del alcaloide, mientras que el carbono del ácido carboxílico sufre descarboxilación. En algunos casos la molécula requiere carbonos suplementarios, y éstos pueden ser proporcionados por grupos acetatos (en el caso de los tropanos), dimetilalilpirofosfatos (en las ergolinas y furoquinoleínas), o por el secologanósido en el caso específico de los alcaloides indolmonoterpénicos; es decir que, el resto de la molécula deriva de otras vías (la vía del acetato, la vía del ácido shiquímico o la vía del ácido mevalónico). Las variaciones estructurales encontradas en los diferentes alcaloides, que se han ido sumando al screening o mapa alcaloídico, surgen de reacciones de oxidación, esterificación, acoplamiento, etc (Ringuelet y Viña, 2013).

Extractos vegetales

Los extractos son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado, se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Los extractos según su consistencia y concentración de principio activo, se clasifican en: extractos fluidos, secos, blandos y los crioextractos (Carrión y García, 2010).

Métodos de extracción

La extracción consiste en la separación de los diferentes componentes presentes en la matriz vegetal por medio de un solvente (polar o apolar). En estudios de investigación comúnmente son utilizadas las técnicas de extracción por maceración, percolación y soxhlet, extracción por reflujo, debido a que presenta ventajas a nivel económico (Ochoa y Sarmiento, 2018).

Maceración

Es una técnica de extracción sólido/líquido siendo un procedimiento simple y ampliamente utilizado, el cual implica dejar la planta (pulverizada) para remojar en un solvente adecuado en un contenedor cerrado a temperatura ambiente. El método es adecuado tanto para la extracción inicial como a granel, puede aumentar la velocidad de la extracción realizando agitación ocasional o constante de la preparación (usando agitadores o mezcladores para garantizar una mezcla homogénea). Finalmente, el proceso se detiene cuando se produce un equilibrio alcanzado entre la concentración de metabolitos en el extracto y el material vegetal. Después de la extracción, el material vegetal residual tiene que estar separado del solvente. Esto implica una clarificación por decantación, que generalmente es seguido por un paso de filtración (Sarker, Latif, y Gray, 2006).

La principal desventaja de la maceración es que el proceso puede tomar desde unas pocas horas hasta varias semanas. La maceración también puede consumir grandes volúmenes de solvente y puede conducir a la posible pérdida de metabolitos y/o material vegetal. Además, algunos compuestos pueden no extraerse de manera eficiente si son poco solubles a temperatura ambiente. Por otro lado, como la extracción se realiza a temperatura ambiente, es menos probable que la maceración conduzca a la degradación de los metabolitos termolábiles (Sarker, Latif y Gray, 2006). Por lo general, la técnica de extracción se usa en frío, la cual referencia a el uso de un solvente específico sobre una muestra por un tiempo prolongado, teniendo como ventaja el uso de equipos sencillos sin gasto de energía y la capacidad de extraer la mayoría de las propiedades del material vegetal (Handa, Khanuja, Longo y Rakesh, 2008).

Percolación

Es un método que consiste en que el disolvente (generalmente alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa la masa de droga pulverizada siempre en un solo sentido, alcanzando concentraciones crecientes de tal modo que el equilibrio entre el solvente dentro y fuera del marco nunca se alcanza, por lo que la droga bañada siempre por nuevas proporciones de disolvente acaba por ceder todos sus componentes solubles de manera progresiva (Carrión y García, 2010).

Extracción por Soxhlet

Es un método de extracción continua que se lleva a cabo usando un disolvente orgánico, el cual fluye a través de la muestra contenida en un dedal poroso de celulosa o vidrio. Las ventajas más importantes de esta extracción son el contacto continuo de la muestra con una porción de disolvente, simplicidad, bajo costo de adquisición y la posibilidad de grandes cantidades de muestra (Canosa, 2008).

El mecanismo de funcionamiento es el siguiente: cuando se calienta el solvente depositado en el recipiente colector, se evapora y sus vapores ascienden, se condensan en el refrigerante y caen sobre la muestra que se encuentra envuelta en celulosa. El solvente se acumula hasta que el sifón se activa y transfiere el solvente cargado de aceite hasta el recipiente colector. Con el solvente nuevamente en recipiente colector se inicia de nuevo el proceso de extracción y continúa realizándose el tiempo necesario para extraer todo el aceite del sólido (Asociación Escuela de Estudiantes de Ingeniería Química, 2001).

Extracción por reflujo

En el proceso de reflujo, el material previamente disuelto en el solvente elegido, se somete a ebullición. Para evitar que un calentamiento excesivo evapore el solvente se utiliza un sistema de reflujo que consiste en enfriar el vapor del solvente con un refrigerante y devolverlo al balón que contiene el material para continuar el proceso, esto además garantiza que no haya pérdidas ni de material ni de solvente durante el proceso de extracción. La temperatura elevada del disolvente permite una mejor extracción de los componentes deseados, ya que la solubilidad de la mayoría de las sustancias aumenta con la temperatura. Este método presenta el inconveniente de que muchos compuestos termolábiles se alteran o descomponen a la temperatura de ebullición del disolvente (Lamarque, Zygadlo, Labuckas, López, Torres y Maestri, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Tamizaje fitoquímico

Se basa fundamentalmente en la identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de productos naturales, a través de reacciones y análisis químicos bien descritos en la literatura. “El tamizaje fitoquímico se le realiza consecutivamente a los extractos etéreo, alcohólico y acuoso del producto natural con el fin de identificar y comparar los metabolitos secundarios extraídos con cada disolvente de diferentes polaridades” (Pujol, Tamargo, Salas, Calzadilla y Acevedo, 2020). Estos se identifican por medio de pruebas de coloración y precipitación.

Pruebas para alcaloides

Reacción de precipitación con reactivo de Mayer

Este reactivo precipita la mayoría de los alcaloides en medio ácido favoreciendo la formación de precipitados cristalinos de color blanco (Orantes, 2008), cuando el yoduro de potasio reacciona con el cloruro de mercurio forma un precipitado rojo de yoduro de mercurio, el cual es soluble en exceso de iones de yoduro dando la formación de un anión complejo incoloro (Coy, Parra y Cuca, 2014).

Reacción de precipitación con reactivo de Dragendorff

Este reactivo contiene yoduro de bismuto potasio, donde al reaccionar $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ con el ácido (HCl) y con yoduro de potasio, forma complejos de color naranja (Orantes, 2008; Ardila, 2014).

Prueba para triterpenoides y/o esteroides

La identificación de estos metabolitos secundarios se realiza con el ensayo de Liebermann-Burchard que consiste en una reacción donde el esteroles se oxida por la presencia del ácido sulfúrico que forma una molécula que contiene un doble enlace adicional. En la etapa inicial de esta prueba ocurre la protonación del grupo OH del esteroles habiendo una pérdida de agua y obteniéndose el ión carbonio 3,5 colestadieno que constituye la primera parte para la formación de color (Orantes, 2008; Ardila, 2014). Para la identificación de esteroides también se utiliza el ensayo de Vainillina-ácido ortofosfórico el cual detecta el núcleo esteroidal presente en la molécula (Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009).

Prueba de fenoles

Los fenoles reaccionan con cloruro férrico dando distintas coloraciones dependiendo del compuesto con que reaccionan. Una coloración negra grisácea puede corresponder a catecol, pero si su coloración es negro azulado hay una posible presencia de pirogalol, esta prueba identifica compuestos fenólicos mediante la formación de un complejo de fenol (Orantes, 2008).

Prueba de saponinas (Ensayo de espuma)

Las saponinas, glucósidos de compuestos esteroideos y triterpenoidales, se manifiestan por la formación de una espuma persistente cuando se agita el vegetal con agua (Marcano y Hasegawa, 2002). Al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, en una probeta por 15 segundos, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar una solución acuosa de un jabón. Esta es una prueba presuntiva de saponinas, ya que existen otras sustancias que también pueden formar espuma (Medinilla, 1993).

Prueba para taninos

El Ensayo de gelatina-sal consiste en la observación de un precipitado ya que los taninos tienen la propiedad de reaccionar con las proteínas formando compuestos insolubles (Orantes, 2008).

Prueba para flavonoides

La identificación de estos metabolitos secundarios se realiza por medio de las pruebas de Shinoda (Zn/HCl) y Leucoantocianidinas. La primera, es la reacción del magnesio en medio ácido, que reduce el flavonoide generando un producto coloreado

que va del rojo anaranjado al violeta, presentándose la siguiente reacción química (Delporte, 2010).

Prueba para cumarinas

La identificación cualitativa de estos metabolitos se realiza por medio de la prueba de Erlich, donde se genera una lactonización del ácido cis-O-hidroxicinámico o ácido cumarínico, determinándose la presencia de grupo furano, la muestra se disuelve en etanol y se agrega una solución de p-dimetilaminobenzaldehído, en etanol y después cloruro de hidrógeno gaseoso, formándose una coloración naranja (Carvajal y cols., 2009).

Prueba para quinonas

Se comportan como indicadores, en solución neutra su color varía desde amarillo hasta casi negro. La reducción alcalina con ditionito de sodio o con hidruro de boro y sodio los convierte en compuestos menos colorados: quinoles, los cuales se re-oxidan simplemente agitando la solución al aire. La oxidación es más rápida en la medida que aumenta el número de OH libres en la molécula (Marcano y Hasegawa, 2002).

Se identifica por medio de la prueba de Borntrager, que se fundamenta en la hidrólisis de los enlaces glucosídicos y se produce una oxidación de las antronas y los antranoles hasta antraquinonas generando la formación de complejos de color rojo (Carvajal y cols., 2009).

Prueba para antraquinonas

Son generalmente hidroxiladas y las hidroxiantraquinonas dan coloraciones específicas con álcali o acetato de magnesio en etanol (rojo), y fluorescente en ácido

acético glacial; las antronas se acoplan con p-nitrosodimetilanilina al 0,1 % en piridina y producen colores verdes, azules, violetas, etc., dependiendo del patrón de hidroxilación. Esta reacción es típica de las antronas. La antrona misma se usa para la cuantificación colorimétrica de carbohidratos (Marcano y Hasegawa, 2002). Si la capa orgánica toma una coloración roja al alcalinizarla con hidróxido de amonio, hay antraquinonas presentes (Marcano y Hasegawa, 2002).

Prueba para lactonas

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, aunque otros compuestos láctónicos pueden dar también positivo este ensayo. En estas condiciones se considera la presencia de esta familia de compuestos por la aparición de una coloración y un precipitado (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

Glucósidos cardiotónicos

En la identificación de estos compuestos se realiza la prueba de Baljet que identifica lactonas α , β -insaturadas y se basa en la formación de un complejo formado entre el ácido pícrico y la lactona α , β y γ insaturada, que presenta coloración rojo claro a oscuro (Orantes, 2008; Ardila, 2014).

Bacterias

Las bacterias poseen un tamaño medio que oscila entre 2 y 10 μm . Su citoplasma está repleto de ribosomas; el material genético, constituido por ácido desoxirribonucleico (ADN), forma un conglomerado compacto (nucleoide) carente de membrana nuclear. La membrana citoplasmática está rodeada externamente por una

pared dura y elástica, de peptidoglicano (glucopéptido, mureina), que confiere la forma a la célula. Por su morfología, las bacterias se clasifican en cocos, cuando tienen forma redondeada, y bacilos, cuando muestran una morfología alargada (Prats, 2005).

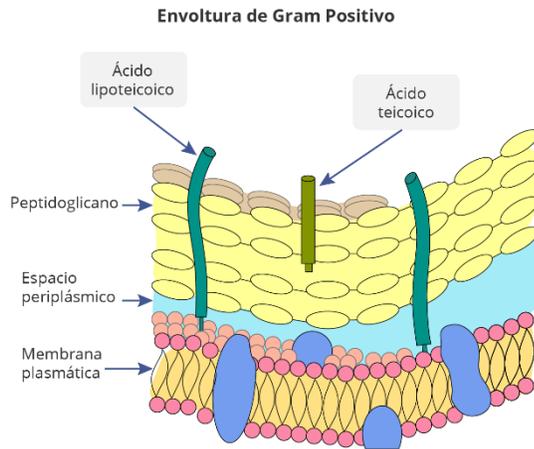
Las bacterias se clasifican en dos grupos diferentes en función de la estructura de su pared. Un grupo, las denominadas Gram positivas, sólo poseen peptidoglicano; el otro, las denominadas Gram negativas, tienen adosada por fuera del peptidoglicano una membrana rica en lipopolisacáridos. Algunas bacterias tienen una cápsula rodeando la pared; también pueden poseer flagelos, que facilitan su movilidad, y fimbrias (Pili), que desarrollan varias funciones, fundamentalmente de adherencia. En las bacterias, además del ADN cromosómico (nucleoide) puede existir ADN extra cromosómico formando plásmidos (Prats, 2005).

Bacterias Gram positivas

Posee una pared celular gruesa de varias capas y está formada principalmente por peptidoglucano. Esta capa es lo suficientemente porosa como para permitir la difusión de metabolitos a la membrana plasmática, es un elemento clave para la estructura, replicación y la supervivencia en las condiciones normales hostiles (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Tomando en cuenta el fundamento de la tinción de Gram, las bacterias Gram positivas se tiñen de morado al tomar el colorante primario cristal violeta debido a su gran capa de peptidoglucano donde queda atrapada luego de utilizar la solución de lugol formando un complejo insoluble, al decolorar con una mezcla de alcohol-acetona, la capa densa se deshidrata cerrándose y evitando la salida del colorante (Figura 5) (Ramírez, García, Longa, Sánchez, Nieves, Velazco, Araque y Mosqueda, 2006).

Figura 5. Pared celular de las bacterias Gram positivas



Tomado y modificado de Morales, 2018.

Dentro de este grupo de bacterias Gram positivas se puede mencionar:

www.bdigital.ula.ve

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 (coccal) 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 (Seija, 2010).

Pueden dividirse en cepas patógenas y relativamente no patógenas, basándose en la síntesis de la enzima coagulasa. Las cepas coagulasa positiva como *S. aureus* son muy resistentes al calor, la desecación y la radiación; por encontrarse en fosas nasales

y piel de seres humanos pueden penetrar rápidamente en los alimentos y producir enterotoxinas que lo hacen peligroso y causar graves infecciones crónicas como: la intoxicación alimentaria estafilocócica, además de abscesos localizados, síndrome de shock tóxico y síndrome de la piel escaldada (Prescott, Harley y Klein, 1999).

Enterococcus faecalis

Son cocos anaerobios facultativos y pueden soportar rangos de temperatura de 10 a 45 °C. Crecen en agar sangre formando colonias blancas no hemolíticas, pero pueden ser α o β -hemolíticas. Toleran muy bien el NaCl al 6,5 %, las sales biliares y además hidrolizan la esculina. Estas características sirven para distinguir de otros cocos Gram positivos catalasa negativos. La mayor parte de las infecciones humanas por enterococos se origina a partir de la flora intestinal del mismo paciente, aunque también pueden adquirirse a través de agua o alimentos contaminados. Las infecciones por estos microorganismos pueden ser frecuentes en el aparato urinario y en el torrente sanguíneo o en los pacientes con larga estancia hospitalaria o que hayan recibido antibióticos de amplio espectro durante un tiempo prolongado (Ramos, 2012).

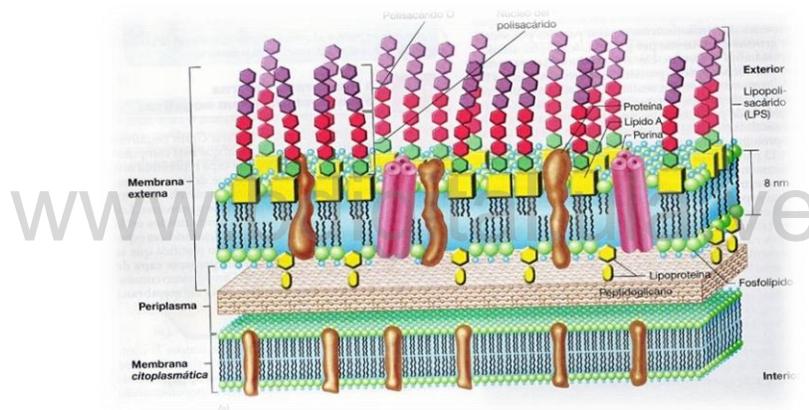
Bacterias Gram negativas

Las paredes de las bacterias Gram negativas son más complejas, la pared celular contiene dos capas situadas en la parte externa de la membrana citoplasmática, fuera de ella hay una capa delgada de peptidoglucano que representa menos del 10 % del peso de la pared celular. Contiene una membrana externa, la cual es única de las bacterias Gram negativas, el espacio entre la superficie externa de la membrana citoplasmática y la superficie interna de la membrana externa es conocido como espacio periplasmático que contiene enzimas importantes para la degradación de macromoléculas (proteasas, lipasas, fosfatasa) también, es responsable de la

producción de sistemas de transporte activos y factores de virulencia que la hacen patógenas (De Moreno, 1988).

Al tomar en cuenta su diferenciación por la coloración de Gram, luego de agregar el decolorante alcohol-acetona, el alto contenido de lípidos en su estructura quedan poros que permiten la salida del colorante primario cristal violeta para luego tomar el colorante secundario de contraste la Safranina tomándose de un color rosado (Figura 6) (Ramírez, y cols., 2006).

Figura 6. Pared celular de las bacterias Gram negativas



Tomado y modificado de Tortora, Funke y Case, 2007.

En relación a las bacterias Gram negativas se describen:

Escherichia coli

Es un bacilo Gram negativo, con una sola cadena espiral de ADN, móvil, aerobio y anaerobio facultativo, con flagelos peritricos. La mayoría forma fimbrias y *pilis*, muchas cepas producen una pequeña microcápsula y muy pocas elaboran macrocápsulas, y no fabrican esporas. En las pruebas bioquímicas es positiva al indol,

descarboxilasa de lisina, fermentación de manitol y gas a partir de glucosa. Es la bacteria más frecuentemente encontrada en la materia fecal de hombres y animales. Su nicho ecológico natural es el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora nativa intestinal. Las infecciones producidas por cepas de *E. coli* patógenas pueden estar limitadas a mucosas o bien diseminarse. Cuatro síndromes clínicos que pueden resultar son: infección de vías urinarias, sepsis, meningitis y enfermedad diarreica (Romero, 2007).

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae es una bacteria Gram negativa, difundida en la naturaleza (agua, vegetales, alimentos) perteneciente al género *Klebsiella*. Interviene en procesos neumónicos, que a diferencia de la neumonía neumocócica, se caracteriza por tener una tendencia clara a la necrosis, con formación de abscesos y elevada mortalidad, especialmente en alcohólicos y enfermos hospitalizados (Pumarola, 1995). Es un patógeno capaz de causar infecciones del tracto urinario, en heridas, en los dispositivos intravasculares e invasivos, de las vías biliares, peritonitis y meningitis; sin embargo, casi todas las infecciones causadas por esta bacteria se adquieren en hospitales, también ocurren en quienes se encuentran debilitados por varias enfermedades subyacentes (Mendell, Bennett y Dolin, 2006).

Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo pequeño de 1 a 2 μm (micra) Se caracterizan por producir uno o más pigmentos como la plocianina y el pigmento eritrogénico (Paraje y Paraje, 1976). Son Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos. Son móviles por un flagelo polar, poseen fimbrias y pilis. Forman una microcápsula compuesta por polisacáridos, no forman esporas, no fermentan los azúcares. Esta especie se ha encontrado

frecuentemente en infecciones hospitalarias, se observan en personas con inmunidad deprimida. Pueden instalarse en cualquier órgano o tejido (Romero, 2007).

Mecanismos de resistencia

La resistencia exitosa de las bacterias a la acción de los antimicrobianos requiere la interrupción o la alteración de uno o más de los pasos esenciales para una acción antimicrobiana eficaz. Estas alteraciones o mecanismos de resistencia pueden aparecer de diversas maneras, pero el resultado final es la pérdida parcial o completa de la eficacia antibiótica (Forbes, Sahm y Weissfeld, 2009).

Estos mecanismos han formado parte de la evolución de las bacterias como un medio de supervivencia. Sin embargo, con la introducción de los antibióticos en la práctica médica, los microorganismos de importancia clínica tuvieron que adoptar medidas de resistencia adecuadas para adaptarse a las presiones del ataque. Una amplia variedad de bacterias de importancia clínica o cualquier microorganismo aislado puede adquirir numerosos genes y volverse resistente a todo el espectro de agentes antimicrobianos disponibles (Forbes, Sahm y Weissfeld, 2009).

Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos desarrollando mecanismos que impiden al mismo ejercer su función, estos son:

- Inactivación del antibiótico por enzimas: La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las betalactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas (Daza, 1998).
- Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana: las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios). En otras

ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente (Daza, 1998).

- Alteración por parte de la bacteria de su punto diana, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico: aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos) (Daza, 1998).

Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica excesivamente el estudio de la resistencia de las bacterias a los distintos antimicrobianos (Daza, 1998).

Antibiótico

Se denomina a cualquier sustancia química producida por un microorganismo, utilizada para eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos infecciosos. Una propiedad común a todos los antibióticos es la toxicidad selectiva: presentan una toxicidad hacia los organismos invasores superior a la que muestran frente a animales o seres humanos (Velázquez, 2008).

En un principio, el término antibiótico solo se empleaba para referirse a los compuestos orgánicos de origen biológico, los cuales se obtienen de cultivos de bacterias (*Bacillus*, *Streptomyces*) u hongos (*Penicillium*, *Cephalosporium*), que resultan tóxicos para otros microorganismos. En la actualidad también se emplea para denominar compuestos sintéticos, los producidos exclusivamente por síntesis química

o semisintéticos, cuando a partir de un núcleo básico del antibiótico producido por el microorganismo, se modifican algunas de sus características químicas para mejorar sus propiedades farmacocinéticas o su espectro, incluso, para disminuir su toxicidad (Velázquez, 2008).

Mecanismo de acción de los antibióticos

Para conseguir destruir o inhibir a los microorganismos, los antibióticos deben atravesar la barrera superficial de la bacteria y después fijarse sobre su diana, es decir, sobre alguna de las estructuras o mecanismos bioquímicos que le son necesarios para multiplicarse o para sobrevivir. Los mecanismos de acción de los antibióticos son diversos y a veces múltiples, pero todos operan en alguno de los siguientes puntos: impidiendo la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o de la pared celular, o bien alterando la membrana celular de la bacteria sobre la que actúan (Daza, 1998).

Los antibióticos pueden ejercer su acción a través de los siguientes mecanismos:

Inhibición de la síntesis de la pared

Las bacterias poseen una pared celular que les confiere rigidez y resistencia a la lisis osmótica. La síntesis de dicha pared es un proceso complejo en el que intervienen numerosas enzimas y que tiene lugar en diferentes fases. La mayor parte de los antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular son bactericidas, ejercen su acción cuando la bacteria está en fase de crecimiento activo, dando lugar a la muerte de la bacteria por lisis celular (Suárez, 2007).

Alteración de la membrana citoplasmática

Actúa como una barrera selectiva regulando el medio intracelular bacteriano. Las polimixinas se comportan como compuestos catiónicos con afinidad específica por los receptores de polifosfato situados en la membrana celular de las bacterias, ocasionando una alteración de la permeabilidad de la membrana bacteriana. Son bactericidas, presentando más actividad sobre las bacterias Gram negativas (Suárez, 2007).

Inhibición de la síntesis proteica

Hay algunos antibióticos que se unen a los ribosomas de la bacteria y bloquean la acción del ARN mensajero (ARNm), inhibiendo la síntesis de proteínas. El ribosoma bacteriano consta de dos subunidades denominadas 50s y 30s (Suárez, 2007).

Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos

Los antimicrobianos pueden bloquear la síntesis de ácidos nucleicos interfiriendo la replicación del ADN o impidiendo la transcripción. Estos actúan frente a diversas bacterias anaerobias y protozoos; en presencia del sistema de transporte anaerobio se producen unos productos intermedios transitorios que actúan lesionando el ADN bacteriano (Suárez, 2007).

Actividad antibacteriana

Es la capacidad propia de una sustancia o compuesto químico de inhibir, destruir, impedir el crecimiento y proliferación de una población bacteriana e inhibir su acción patógena. Sólo puede ser medida cuantitativamente en pruebas *in vitro* (Fica, 2005).

Técnicas para la determinación de la actividad antibacteriana

Las pruebas de susceptibilidad microbiana son técnicas esenciales en la investigación y los resultados pueden variar dependiendo de una gran cantidad de factores involucrados en el desarrollo de las mismas (Bakht, Humaira, Madiha y Haq, 2015). Desde la selección de las plantas, el tipo de extracción, la elección de bioensayos apropiados hasta detalles como la cantidad de inóculo y técnica utilizada para la determinación de actividad antimicrobiana, pueden influir en los resultados de una manera contundente (Ramírez y Marín, 2009).

Los ensayos de sensibilidad deben estar estandarizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. Los métodos para evaluar la actividad de extractos sobre bacterias y hongos suelen ser similares, variando la preparación del inóculo, medio de cultivo, temperatura y el tiempo de incubación (Cowan, 1999).

Método de difusión en disco (Kirby-Bauer)

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles (Barry, Amsterdam, Coyle, Gerlach y Thornsberry, 1979). La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue publicado por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) y la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés, World Health Organization) y adoptada por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, antes NCCLS) como norma de aceptación general. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos (National Committee for Clinical Laboratory, 2000).

El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se deposita un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se siembra en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Hacek, Dressel y Peterson, 1999).

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 $\mu\text{g/mL}$ (Aripaca, 2009). La CMI se ha establecido como "gold Standard" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (National Committee for Clinical Laboratory, 2000).

Métodos de dilución

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y la (CMB) como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio

libre del compuesto evaluado, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos (Ramírez y Marín, 2009).

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CMI es determinada después de la incubación. Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar CMI, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Ramírez y Marín, 2009).

En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas, la principal desventaja es la cantidad necesaria de muestra a evaluar (Ramírez y Marín, 2009).

Definición Operacional de Términos

Presurizar

Mantener la presión atmosférica normal en un recinto, independientemente de la presión exterior (Real Academia Española, 2014).

Motilidad

La noción de motilidad proviene del vocablo inglés motility. El término refiere a la capacidad de moverse: desplazarse para abandonar un lugar y pasar a ocupar otro diferente (Pérez y Gardey, 2019).

Cardiotónico

Relativo a una sustancia que tiende a aumentar la eficacia de las contracciones del musculo cardiaco. Agente farmacológico que aumenta la fuerza de las contracciones miocárdicas (Grupo Océano, 2001).

Biopelículas

www.bdigital.ula.ve

En microbiología, las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen agregados y rodeados por una matriz extracelular que ellos mismos producen. La matriz extracelular está conformada por proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN) extracelular y exopolisacáridos (EPS) (Allewell, 2016).

Opalescencia

Aspecto lechoso e irisado de algunas disoluciones. Reflejos de ópalo (Diccionario Enciclopédico Larousse, 2009).

Perennes

Es una planta que vive durante más de dos años. Las plantas perennes se denominan también vivaces. No todas las plantas son vivaces, sino que una buena

parte de las hierbas, las plantas que no desarrollan tallos leñosos (de madera), son anuales o bienales (viven solo uno o dos años) (Font Quer, 1953).

Gineceo

Verticilo floral femenino de las plantas fanerógamas, constituido por uno o más carpelos, que forman el pistilo (Real Academia Española, 2014).

Etnomedicina

La Etnomedicina, comprendida dentro de la Antropología Médica, estudia la medicina tradicional o popular de un determinado grupo cultural. La Antropología Médica es una ciencia experimental y dialógica que nace como desarrollo crítico de un campo de estudio definido como medicina tradicional o popular (Tabakián, 2017).

Rupícolas

Se trata del conjunto de plantas que viven en las rocas compactas y prácticamente desnudas; ambientes caracterizados por unas condiciones extremas, cuyo factor común es la falta de suelo. Dentro de dicho ambiente, la mayoría de las especies está especializada para vivir en las fisuras, por lo cual también se le denomina vegetación fisurícola o casmofítica. Unas especies enraízan en las paredes y paredes verticales y otras lo hacen en afloramientos rocosos poco o nada inclinados. Son plantas que a menudo presentan adaptaciones a la escasez y penuria hídrica que padecen en estos ambientes (Programa Fomento de la Cultura Científica y Tecnológica, 2008).

Operacionalización de las Variables

Para operacionalizar el sistema de variables o el evento de estudio con el respectivo criterio de análisis, es necesario la definición conceptual y la operacional de las mismas. En tal sentido, las variables se operacionalizan con la finalidad de identificar los elementos y datos empíricos que expresan su presencia. En esta investigación las variables (discretas) que no admiten valores intermedios, los indicadores derivarán de las bases teóricas. El proceso de la operacionalización de las variables garantizará que los objetivos propuestos sean alcanzados (Tabla 4 y 5) (Pérez, 2009; Hurtado, 2010).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 4. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonniieri* en cepas de referencia internacional.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
<p>Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de <i>Kalanchoe gastonis-bonniieri</i></p>	<p>Dependiente</p> <p>Cuantitativa</p> <p>Discreta</p>	<p>Es la capacidad propia de una sustancia o compuesto químico de inhibir, destruir, impedir el crecimiento y proliferación de una población bacteriana e inhibir su acción patógena. Sólo puede ser medida cuantitativamente en pruebas <i>in vitro</i> (Fica, 2005).</p>
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
<p>-Método de difusión en disco (Kirby-Bauer).</p>	<p><u>Cepas Gram positivas:</u></p> <p>-<i>Staphylococcus aureus</i></p> <p>-<i>Enterococcus faecalis</i></p> <p><u>Cepas Gram negativas:</u></p> <p>-<i>Escherichia coli</i></p> <p>-<i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>-<i>Klebsiella pneumoniae</i></p>	<p>-Sensible</p> <p>- Intermedio</p> <p>-Resistente</p> <p>-Presencia de los halos de inhibición en bacterias Gram positivas y Gram negativas.</p>

Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

Tabla 5. Operacionalización de la variable independiente: Composición química de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonniieri*.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de las hojas de <i>Kalanchoe gastonis-bonniieri</i>	Independiente Cualitativa Discreta	La fitoquímica es la disciplina científica que tiene como objeto la obtención de los compuestos elaborados por las plantas a través de la extracción, aislamiento, purificación y elucidación de la estructura química (Sánchez, 2022).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
Se mide mediante: -Pruebas químicas preliminares: reacciones de coloración o precipitación, fluorescencia y micro sublimación.	Las pruebas químicas cualitativas a realizar para: - Alcaloides: prueba de Dragendorff, Wagner y Mayer. - Triterpenos y/o Esteroles: prueba de Liebermann Burchard. - Compuestos fenólicos: prueba de cloruro férrico. - Saponinas: prueba de espuma. - Taninos: prueba con gelatina. - Flavonoides: prueba Shinoda y NaOH al 10 %. - Cumarinas: prueba con hidróxido de amonio. - Antraquinonas: prueba con hidróxido de amonio. - Quinonas: prueba con ácido sulfúrico concentrado. - Lactonas: ensayo de Baljet. - Glucósidos cardiotónicos: prueba Keller-Kilani	- Alcaloides: aparición de turbidez o precipitado - Triterpenos y/o Esteroles: coloración azul o verde y violeta para triterpenos. - Compuestos fenólicos: coloración de azul a negro. - Saponinas: formación de abundante espuma. - Taninos: precipitado blanco. - Flavonoides: coloración naranja a rojo para flavonas; rojo para flavonoles y magenta para flavononas. - Cumarinas: La presencia de fluorescencia azul violeta. - Antraquinonas y quinonas: coloración roja - Lactonas: coloraciones roja, violeta o rosa. - Glucósidos cardiotónicos: anillo marrón o violeta.

Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023

Hipótesis

Estudios anteriores de varias especies del género *Kalanchoe*, han reportado la presencia de una amplia variedad de metabolitos secundarios tales como alcaloides, terpenos, esteroides, saponinas, cetonas, taninos y fenoles; además de mostrar diversas actividades biológicas, por lo que es de esperar que los extractos de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnieri* presenten una composición química similar y posean actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Los tipos de investigación se definen por un objetivo en particular y características específicas. Mediante la investigación confirmatoria se desea comprobar una hipótesis, la cual requiere explicación y predicción (Hurtado, 2010). Esta investigación fue de tipo confirmatoria, ya que se quiso confirmar la relación que existe entre la actividad antibacteriana y la composición química de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* en cepas de referencia internacional.

Diseño de la investigación

El diseño de investigación abarca el proceso de recolección de datos, así como la parte experimental en el caso de una investigación confirmatoria, con un diseño de campo y de laboratorio. La investigación presentó un diseño experimental, de campo y de laboratorio, la muestra fue recolectada en el Jardín de Plantas Medicinales "Dr. Luis Ruiz Terán" adscrito a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, la cual se analizó en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones "Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro" de dicha facultad. El investigador dominó las condiciones bajo las cuales se realiza el experimento y modificó sus variables independientes para obtener resultados (Palella y Martins, 2006). Además, la investigación fue contemporánea ya que, la recolección sucedió durante el desarrollo de la investigación y transversal porque las muestras se recolectaron solo una vez (Hurtado, 2010).

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La población, ha sido definida por Arias (2006), como el “conjunto finito o infinito de elementos con características comunes, para los cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación, esta queda limitada por el problema y por los objetivos del estudio” (p. 81). Mientras que la muestra es un subconjunto que representa parte de la población que será objeto de estudio. Específicamente la unidad de investigación está representada por la especie *Kalanchoe gastonis-bonnierei*, situada en el Jardín de Plantas Medicinales "Dr. Luis Ruiz Terán" adscrito a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, la cual se analizó en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de dicha facultad.

Selección del Tamaño de la muestra

La “n” muestral estuvo representada por 1375 gramos de hojas frescas de la especie *Kalanchoe gastonis-bonnierei*.

Sistema de Variables

Existen diferentes tipos de variables, según su función se clasifican en variable dependiente, es aquella que se modifica por acción de la variable independiente, en ella se miden los efectos o consecuencias, para luego dar los resultados en la investigación, y la variable independiente es la causa que genera y explica los cambios en la variable dependiente (Arias, 2006). Las variables relacionadas con el sistema de investigación son las siguientes:

•Variable dependiente (VD): Actividad antibacteriana de los extractos las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnieri*.

•Variable independiente (VI): Composición química de los extractos de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnieri*.

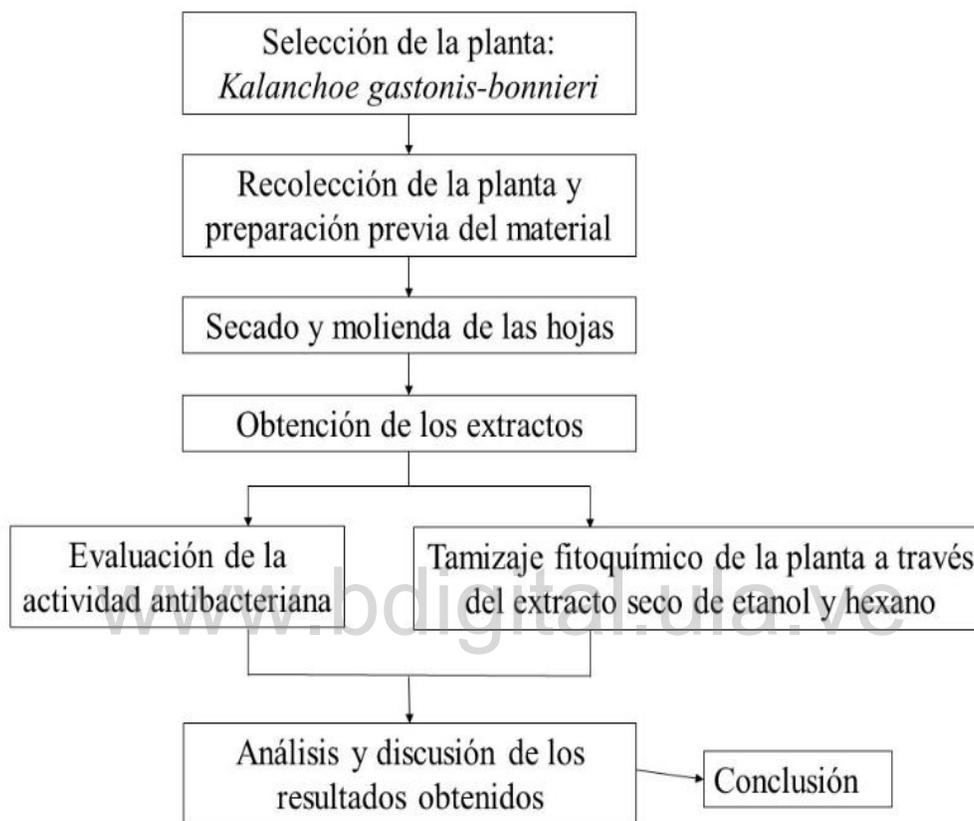
Instrumentos de Recolección de Datos

El instrumento de recolección de datos lo constituye cualquier recurso del que se vale el investigador para aproximarse a los fenómenos en estudio, y obtener de ellos la información requerida. Las técnicas de recolección de datos son las distintas formas de obtener la información en diferentes modalidades como son oral y escrita (Arias, 2006). En esta investigación se empleó el uso de tablas que permitieron clasificar las variables de estudio, y además reportar los resultados de la identificación de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnieri*, así como la presencia de los halos de inhibición en las pruebas de susceptibilidad pudiendo clasificar a los microorganismos como sensibles o resistentes, frente a los extractos obtenidos de las hojas.

Procedimientos de la Investigación

El investigador debe describir con detalle, paso por paso, el procedimiento que llevará a cabo durante la investigación. Esta descripción permite no sólo verificar que el procedimiento utilizado cumplió con los requerimientos metodológicos del proceso de investigación (Esquema 1) (Hurtado, 2010).

Esquema 1. Procedimiento empleado para la separación e identificación de los componentes de las hojas *Kalanchoe gastonis-bonnierei*.



Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

Recolección de la muestra

La planta se recolectó en el sector Campo de Oro de la ciudad de Mérida, en el Jardín de Plantas Medicinales “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, posteriormente fue llevada al Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”.

Secado del material vegetal

Se recolectaron 1375 gramos de las hojas frescas, las cuales se colocaron en una caja de cartón, en un lugar fresco y seco, al cabo de un tiempo se procedió a completar el secado en la estufa a una temperatura de 40 °C por 24 horas, se secó, pesó y trituró obteniendo 93,11 gramos de muestra, luego se almacenó en sobres de papel a temperatura ambiente para su posterior uso y elaboración de los extractos vegetales.

Método utilizado para la preparación de los extractos

Luego de la obtención de la planta, se llevó a cabo para la preparación de los diferentes extractos orgánicos mediante la técnica de extracción por reflujo a una temperatura suave que oscila alrededor de los 40 o 60 °C (Carrión y García, 2010).

- **Preparación del Extracto de Hexano:** para la preparación de este extracto vegetal se colocaron 93,11 gramos de las hojas previamente secadas y molidas, en un balón aforado con 500 mL de hexano destilado (solvente orgánico no polar), esta preparación se llevó a cabo mediante la técnica de extracción por reflujo a una temperatura de 40 °C por 1 hora, usando como disolvente hexano, al tener el extracto líquido se dejó enfriar y posteriormente se filtró en una fiola con la ayuda de un embudo cubierto con papel de filtro. Luego se colocó el balón en el rotavapor a 80 rpm y 50 °C para recuperar el hexano, esto se produce a presión reducida y temperatura controlada, lo que permite que el punto de ebullición de los disolventes sea menor que a presión atmosférica, ocurre la evaporación de solventes seguida de una condensación de los vapores, donde el disolvente pasa de líquido a vapor y de nuevo a líquido. Lo que quedó en el balón concentrado (el extracto de hexano de las

hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei*) se trasvasó a un frasco de vidrio color ámbar previamente pesado, colocándolo en la estufa para dejarlo secar totalmente, obteniendo 1,5 gramos del extracto con un rendimiento de 1,61 % (Esquema 2).

- **Preparación del Extracto de Etanol:** en la elaboración del extracto de etanol se utilizaron las hojas molidas, que previamente habían sido sometidas a un proceso de extracción con hexano. Mezclamos el material con 500 mL de etanol (solvente polar al 96 %), realizando el calentamiento por 1 hora y filtración del extracto líquido de la misma manera que en el procedimiento anterior (hexano), obteniendo 3,85 gramos del extracto con un rendimiento de 4,13 % (Esquema 2).

www.bdigital.ula.ve

Esquema 2. Procedimiento para la obtención de los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonniieri*.



Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

Identificación de metabolitos secundarios

El tamizaje fitoquímico permite la evaluación rápida, con reacciones de coloración y precipitación, las cuales son sensibles, reproducibles y de bajo costo. Con la identificación cualitativa previa de los grupos químicos presentes podemos orientar la extracción de los grupos de mayor interés (Lock, 1994).

Determinación de alcaloides

En este ensayo se utilizaron los reactivos de: Dragendorff, Mayer y Wagner, en tres tubos se disolvió una porción de la muestra de los extractos en 2 mL de ácido

clorhídrico (HCl) al 10 %, se llevó a calentamiento en baño de María por quince minutos, se dejó enfriar y luego se filtró la muestra. Posteriormente se dividió el filtrado en 3 tubos de ensayo identificados para cada reactivo. Seguidamente se adicionaron a el respectivo tubo 2 a 3 gotas de sales de metales pesados como el ioduro de potasio (reactivo de Dragendorff), el ioduro de potasio y mercurio (reactivo de Mayer) y la sal del reactivo de Wagner; en este caso se obtuvieron resultados negativos para la determinación de alcaloides. Se considera como positiva las pruebas que formen un precipitado naranja a rojo (Wagner), precipitado blanco a naranja (Mayer) y precipitado blanco a naranja (Dragendorff) (Ochoa y Sarmiento, 2018).

Determinación de triterpenos y esteroides

Se realizó mediante el ensayo de Liebermann Bouchard, en 2 tubos de ensayo se disolvió una porción de ambos extractos con diclorometano y se mezcló con 0,5 mL de anhídrido acético, se adicionó cuidadosamente por la pared de cada tubo 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Un ensayo positivo se tiene por un cambio de color: rosado-azul muy rápido; verde intenso, visible, aunque rápido; verde oscuro-negro al final de la reacción (Calvopiña, 2010).

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos. Esta reacción también se emplea para diferenciar las estructuras esteroidales de las triterpénicas, las primeras producen coloraciones que van desde azul a azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura (Calvopiña, 2010).

Determinación de compuestos fenólicos

Se diluyó una pequeña cantidad de la muestra en agua y se agregaron unas gotas de solución de cloruro férrico al 5 % (FeCl_3), la coloración verde-negra indica la positividad de la prueba en el extracto de etanol (García y cols., 2019).

Determinación de saponinas

En el tubo de ensayo se colocó una porción del extracto y 1-2 mL de agua, agitándose vigorosamente por 1 minuto para observar la altura de la espuma. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido, si es < 5 mm indica que la prueba es negativa, si es de 5-10 mm se considera positiva, > 15 mm indica un alto contenido de saponinas (García y cols., 2019).

Determinación de taninos

En un tubo de ensayo se colocaron de 1-2 mg de muestra y disolvieron con 3 mL de agua, luego se adicionaron 2 mL de solución de gelatina al 1 %; la formación de un precipitado blanco indica la presencia de taninos (García y cols., 2019).

Determinación de flavonoides

- **Reacción de Shinoda:** se disolvieron 2 mL del extracto de etanol y hexano, se adicionaron 2 gotas de HCl concentrado por las paredes del tubo, luego se colocaron trozos de magnesio metálico cuidadosamente; la formación de una coloración naranja a rojo indica la presencia de flavonas, si es rojo flavonoles y si es magenta flavononas (García y cols., 2019).

- **Hidróxido de sodio al 10 %:** se adicionaron 0,5 mL de NaOH; la formación de una coloración de amarillo a rojo indica la presencia de xantonas y flavonas, de café a naranja flavonoles; de purpura a rojizo chalconas y azul de antocianidas. En el ensayo se observó una coloración de naranja a café en el tubo con el extracto de etanol (García y cols., 2019).

Determinación de cumarinas

Se disolvió una alícuota de las muestras en 1 mL de etanol y se agregaron dos gotas de hidróxido de amonio concentrado, luego se observaron en cámara de luz ultravioleta a 365 nm; es positiva la prueba cuando presenta una fluorescencia azul-violeta y la ausencia de la misma indica la negatividad (Marcano y Hasegawa, 2002).

Determinación de antraquinonas

Se disolvió 1-2 mg de muestra en 3 mL de etanol, se adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado, la ausencia de una coloración roja indica la negatividad de la prueba (Marcano y Hasegawa, 2002).

Determinación de quinonas/antraquenos

Se colocó de 1-2 mg de los extractos vegetales en una cápsula de porcelana, se agregó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado a la porción de los extractos. La ausencia de una coloración roja indica la negatividad para quinonas (Marcano y Hasegawa, 2002).

Determinación de lactonas sesquiterpénicas

Se agregó una porción del extracto a un tubo de ensayo, se disolvió una porción del extracto en etanol, luego se adicionó una gota de hidróxido de potasio 2 N en metanol. Se calentó la mezcla a ebullición de 1 a 2 minutos, se dejó enfriar y se llevó a pH de 1 con ácido clorhídrico 0,5 N. Se adicionó una gota de cloruro férrico al 1 %. Las coloraciones roja, violeta o rosa indican que la prueba es positiva para este metabolito (García y cols., 2019).

Determinación de glucósidos cardiotónicos

Se realizó mediante la prueba Keller-Kilani: se disolvieron 20 mg de los extractos en 5 mL de agua destilada, se agregaron 2 mL de ácido acético glacial y posteriormente se adicionaron algunas gotas de cloruro férrico al 5 %. Las soluciones se vertieron en tubos de ensayo con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. La formación de un anillo marrón en la interfaz indica la presencia de glucósidos cardiotónicos, al igual que la formación de un anillo violeta debajo del anillo marrón o bien en la fase de ácido acético; un anillo verdoso también puede formarse gradualmente, indicando la presencia de estos compuestos (Bulugahapitiya, 2013).

Determinación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en disco (Kirby- Bauer)

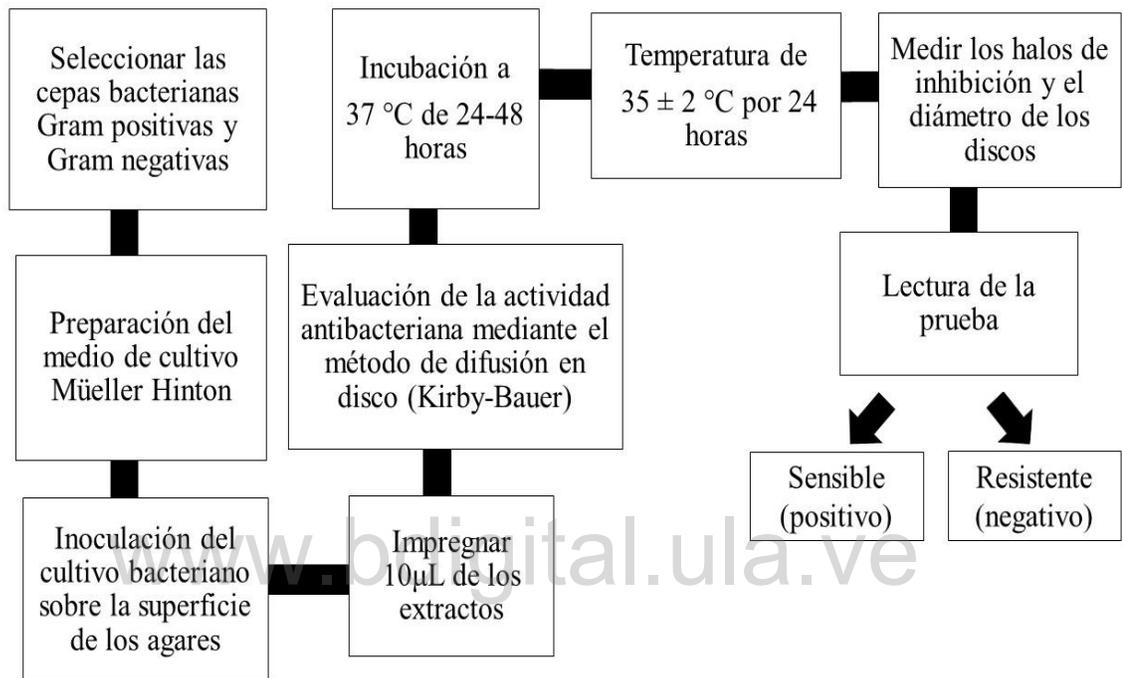
Para la determinación de la actividad antibacteriana, se preparó el medio de cultivo sólido (Müller Hinton), las temperaturas de incubación variaron dependiendo del microorganismo en cuestión, siendo la temperatura de 37 °C para la mayoría de las bacterias; el tiempo de incubación también puede variar de 24-48 horas. Una vez cultivadas las cepas en el medio inclinado, se realizó entre la preparación del inóculo, según la escala de Mc Farland. Luego se inoculó y sembró sobre la superficie de los

agares Müeller-Hinton (bacterias), se incubaron invertidas a 35 ± 2 °C por 24 horas, posteriormente se midieron los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos (Sánchez, Castillo y García, 2016).

El diámetro del halo de inhibición depende de la sensibilidad o resistencia del microorganismo, así como también de la solubilidad de los extractos y de la tasa de difusión a través del agar. Por eso, es importante controlar muy bien el medio de cultivo, su espesor, el tiempo de incubación y la concentración de bacterias inoculadas. Si se presentan zonas de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos, la medición de esos diámetros de inhibición y su comparación con los valores de los cuadros de referencia, permitirá establecer si la cepa presenta sensibilidad, sensibilidad media o resistencia al extracto (Rodríguez, Gamboa, Hernández y García, 2005).

Esta prueba se desarrolló en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la asesoría de las Profesoras Yndra Cordero, Ysbelia Obregón y el técnico de laboratorio el Sr. Emilio Salazar (Esquema 3).

Esquema 3. Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas *Kalanchoe gastonis-bonnierei* por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer).



Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

Bacterias estudiadas

Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies pertenecen a las bacterias Gram positivas y tres pertenecientes a las bacterias Gram negativas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), las bacterias fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes a cargo de la Licenciada María Eugenia Nieves (Tabla 6).

Tabla 6. Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).

Bacterias Gram positivas (ATCC)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
Bacterias Gram negativas (ATCC)	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 23357
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

Preparación de placas

En las placas de Petri se preparó el medio de cultivo colocándose aproximadamente 20 mL de Agar Müeller Hinton (Merck®) estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

Preparación de pre-inóculos bacterianos

Las cepas a ensayar se incuban en agar Müeller-Hinton a 37 °C por 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo microbiano, ya que es en ese tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano (Anon, 2003).

Preparación de los inóculos bacterianos

Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en tubos 13x100 previamente estéril que contenían 5 mL de una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,85 % hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón de McFarland (10^{6-8} UFC/mL).

Inoculación de las placas

Una vez preparada las placas, se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con cada uno de los inóculos bacterianos previamente preparados en solución de NaCl al 0,85 % (bacterias en estudio), utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

Preparación de los discos

Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (UV), durante toda una noche. Previo a la preparación del inóculo se impregnaron los discos de papel con 10 μ L de la muestra en estudio a una concentración comprendida 10 mg/mL. También se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar y como control negativo discos impregnados con 10 μ L del solvente dimetil sulfóxido (DMSO).

Colocación de los discos impregnados

En las placas de Petri con Agar Müeller-Hinton previamente inoculados con cada cepa estudio, se colocaron los discos impregnados con 10 μ L de la dilución de 10 mg/mL de la muestra a ensayar y se colocaron los discos de antibióticos comerciales como control positivo (Tabla 7) correspondiente a cada una de las cepas en estudio, además del control negativo; usando una pinza metálica previamente esterilizada (Bauer, Kirby, Sherris, y Turck, 1966).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 7. Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas.

Cepas Bacterianas ATCC	Halos de Inhibición en mm					
	E (15 µg)		AMP (10 µg)		PIP(100 µg)	
	CLSI	CE	CLSI	CE	CLSI	CE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	≥23	26	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	≥17	10	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	≥21	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	≥21	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	-	-	≥21	18

Leyenda: Lectura de los halos de la inhibición de los antibióticos realizados en el laboratorio frente a cepas ATCC: Eritromicina (**E**), Ampicilina (**AMP**), Piperacilina (**PIP**), Milímetros (**mm**), Lectura de los halos de inhibición recomendados por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínicos (**CLSI**), Halos de Cepas ensayadas obtenidos (**CE**).

Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

Pre-incubación e incubación de las placas

Después de haber colocado los discos en las placas con agar Müeller-Hinton previamente inoculados, estas se dejaron en la nevera a temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 minutos (pre-incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con sus diferentes muestras difundieran a través del agar, para luego llevarlas a la estufa durante 24 horas a temperatura de 37 °C en posición invertida en atmósfera aeróbica (incubación).

Lectura de las placas

Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 horas estas fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresó en milímetros (mm) (Bauer, Kirby, Sherris y Turck, 1966).

Diseño de Análisis

Existen dos tipos de enfoques de investigación: cuantitativo y cualitativo, a través de los cuales los datos fueron analizados; el primero es secuencial y probatorio, cada etapa precede a la siguiente y no se pueden eludir los diferentes pasos del mismo, aquí se analizaron numéricamente los datos recolectados de la unidad de estudio, con el fin de medir la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonniei*. Por otra parte, el enfoque cualitativo no se basa en mediciones ni expresiones numéricas, sino en las características de la unidad de investigación, y está

representado por las características químicas observadas en las pruebas preliminares de identificación, que se llevaron a cabo en el tamizaje fitoquímico, Posteriormente se relacionó el crecimiento bacteriano *in vitro* de cada una de las cepas en estudio contra la acción antibacteriana que presentaron los extractos obtenidos de la especie. La planta fue procesada en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei*, fueron sometidas a un proceso de extracción por reflujo, realizando extractos con dos solventes orgánicos (hexano y etanol) que fueron concentrados hasta la sequedad con la implementación de un rotavapor a presión y temperatura controlada, obteniéndose 1,5 gramos del extracto de hexano y 3,85 gramos del extracto de etanol (Tabla 8).

Tabla 8. Pesos obtenidos y porcentaje de rendimiento de los extractos vegetales de hexano y etanol de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei*.

Parte de la planta	Peso	Peso del extracto	Rendimiento del extracto
Hojas secas y molidas	93,11 g	Extracto de hexano 1,5 gramos	1,61 %
		Extracto de etanol 3,85 gramos	4,13 %

Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

Estudio fitoquímico preliminar

Los extractos obtenidos a partir de las hojas de la planta *Kalanchoe gastonis-bonnierei*, fueron sometidos a las distintas pruebas químicas preestablecidas para conocer el grupo de metabolitos secundarios presentes en la muestra; siendo de forma cualitativa la revelación de cada uno de los componentes por fenómenos químicos de reacción como: viraje de color, precipitados, turbidez del medio, y fluorescencia por

exposición a la luz UV, estos indicaron presencia o ausencia de los metabolitos presentes de la planta en estudio (Tabla 9 y 10).

Tabla 9. Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos obtenidos de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnieri*.

Pruebas Químicas	Hexano	Etanol
Alcaloides		
Dragendorff	-	-
Wagner	-	-
Mayer	-	-
Triterpenos/esteroles	(+) rojo	-
	(+) verde	(++) verde
Compuestos fenólicos	ND	(+) verde → negro
Saponinas	-	-
Taninos	ND	-
Flavonoides		
Shinoda	-	-
NaOH 10 %	-	(++) naranja → café
Cumarinas	-	-
Antraquinonas	-	-
Quinonas	-	-
Lactonas sesquiterpenicas	-	-
Glucósidos cardiotónicos	-	-

Leyenda: Negativo: (-), Positivo: (+), Moderado: (++) , No Determinado: **ND**

Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

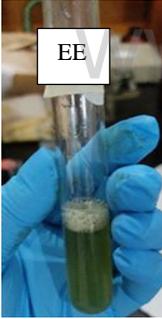
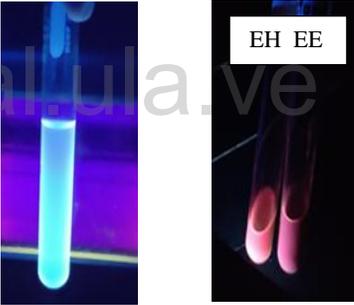
Tabla 10. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnieri*.

Prueba	Reporte
<p style="text-align: center;">Metabolito: Alcaloides</p>  <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-left: 100px;"> <p>Reactivo: Dragendorff</p> <p>Reporte: negativo para ambos extractos</p> </div>	<p style="text-align: center;">Metabolito: Quinonas</p>  <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-left: 100px;"> <p>Reactivo: Ácido sulfúrico concentrado.</p> <p>Reporte: negativo para ambos extractos</p> </div>
 <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-left: 100px;"> <p>Reactivo: Wagner</p> <p>Reporte: negativo para ambos extractos</p> </div>	<p style="text-align: center;">Metabolito: Flavonoides</p>  <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-left: 100px;"> <p>Reactivo: Shinoda</p> <p>Reporte: negativo para ambos extractos</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-left: 100px; margin-top: 10px;"> <p>Reactivo: Hidróxido de sodio 10%</p> <p>Reporte: EE positivo (naranja → café).</p> </div>
 <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-left: 100px;"> <p>Reactivo: Mayer</p> <p>Reporte: negativo para ambos extractos</p> </div>	<p style="text-align: center;">Metabolito: Taninos</p>  <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-left: 100px;"> <p>Reactivo: Gelatina 1 %</p> <p>Reporte: EE negativo</p> <p>EH no determinado.</p> </div>

Legenda: **(EE)**: extracto etanólico, **(EH)**: extracto de hexano.

Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

Tabla 10. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonniieri* (continuación).

<p>Metabolito: Triterpenos y Esteroles</p>  <p>Reactivo: Lieberman-Burchard</p> <p>Reporte: EE: viraje de color verde para esteroles, no hay presencia de triterpenos.</p> <p>EH: viraje de color verde para esteroles y rojo para triterpenos.</p>	<p>Metabolito: Fenoles</p>  <p>Reactivo: Tricloruro férrico.</p> <p>Reporte: EE viraje de verde a negro</p> <p>EH no determinado.</p>
<p>Metabolito: Saponinas</p>  <p>Prueba: Espuma</p> <p>EE: negativo</p>	<p>Metabolito: Cumarinas</p>  <p>Reactivo: Hidróxido de amonio concentrado.</p> <p>Reporte: negativo para ambos</p>

Leyenda: **(EE)**: extracto etanólico, **(EH)**: extracto de hexano.

Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Se determinó a través del método de difusión en disco en agar (Kirby-Bauer), en el extracto etanólico de las hojas, a una concentración de 10 mg/mL, frente a las diferentes cepas bacterianas ATCC: dos especies Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), y tres especies Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Los resultados de esta actividad antibacteriana se muestran en la (Tabla 11 y 12).

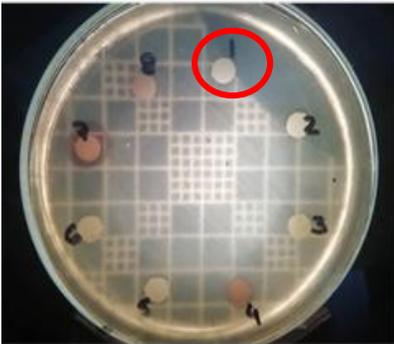
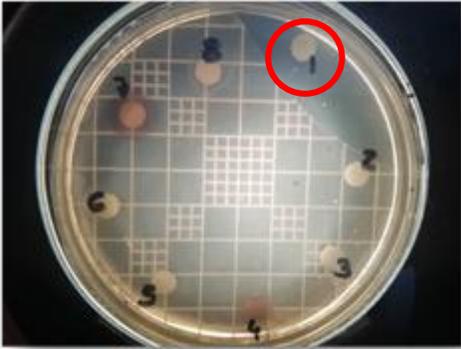
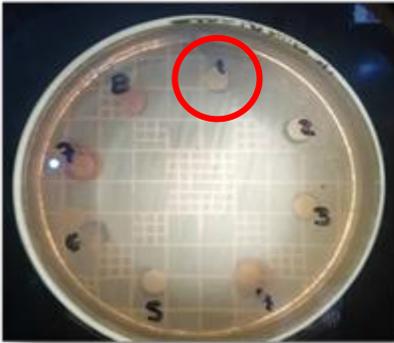
Tabla 11. Resultados obtenidos para la determinación de la actividad antibacteriana de extractos de *Kalanchoe gastonis-bonniери*.

Halos de inhibición en milímetros (mm) de bacterias ATCC					
Muestras ensayadas []	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357
10 mg/mL					
EHE	8 mm	0	ND	7 mm	7 mm
DMSO (C -)	0	0	ND	0	0

Leyenda: **(EHE)**: Extracto de hojas de etanol, **(mm)**: milímetros, **(DMSO)**: dimetil sulfóxido, **(C-)**: Control negativo, **(ND)**: no determinado

Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

Tabla 12. Reporte de los resultados ilustrados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonni*.

Prueba: difusión en disco en agar (Kirby-Bauer)	
 <p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 Disco N° 1</p>	 <p><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 Disco N° 1</p>
 <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Disco N° 1</p>	 <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853. Disco N° 1</p>

Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

Tabla 12. Reporte de los resultados ilustrados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonniei* (continuación).



Fuente: Belandria, Jimenez y Obregón, 2023.

Discusiones

En el presente trabajo se obtuvieron los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei*, luego se realizaron las pruebas químicas cualitativas que demostraron la presencia de metabolitos secundarios como esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto de etanol, mientras que en el extracto de hexano solo se observó la presencia de triterpenos y esteroides.

Posteriormente se llevó a cabo la actividad antibacteriana por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) con el extracto de etanol, a una concentración de 10 mg/mL mostrando sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus* (8 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm) y *Klebsiella pneumoniae* (7 mm), respectivamente.

Se hizo una comparación de los resultados obtenidos con los estudios anteriores en cuanto a la determinación fitoquímica y la actividad antibacteriana del género *Kalanchoe* como se menciona a continuación:

Navarro, Agosto y Hipólito (2023), en su trabajo realizado en India, sobre la Composición fitoquímica y propiedades antioxidantes de la planta (mala madre) *Kalanchoe pinnata*, utilizaron dos métodos de extracción para la obtención de los fitoconstituyentes: Extracción Rápida con Agua Caliente Presurizada (ERACP) y Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU), los constituyentes encontrados en el extracto acuoso de las hojas fueron taninos, terpenoides, esteroides y glucósidos. Tiene relación con la presente investigación ya que en el análisis fitoquímico realizado de los extractos de hexano y etanol, se determinó la presencia de triterpenos, esteroides y compuestos fenólicos.

Rivero, Prieto, Hernández, Zaragoza y Madariaga (2022), México, en su trabajo de investigación titulado Efecto antihelmíntico y antibacteriano *in vitro* del extracto

hidroalcohólico de hojas y tallos de *Kalanchoe daigremontiana*, utilizaron los siguientes microorganismos para determinar la actividad antibacteriana, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, mediante el método de micro dilución en caldo con algunas modificaciones para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), permitiendo evaluar la actividad antibacteriana del extracto de *K. daigremontiana*, dando como resultado 100 mg/mL sobre *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes*, y 0,781 mg/mL para *B. subtilis* y *S. aureus*. Esta investigación, aunque difiere en el método para la determinación de la actividad antibacteriana se relaciona con nuestro trabajo ya que presentó actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa* (7 mm) y *S. aureus* (8 mm) a la concentración de 10 mg/mL.

Molina (2022), realizó un trabajo en Ecuador, sobre la Evaluación antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales de *Vernonanthura patens* y *Kalanchoe pinnata* en condiciones de laboratorio, la obtención de los extractos de etanol fue por maceración, obteniendo metabolitos secundarios como flavonoides, fenoles, taninos, antraquinonas y esteroides en el extracto de *V. patens* y en el de *K. pinnata* además de los compuestos químicos mencionados se determinaron saponinas. La actividad antibacteriana de este último se realizó mediante Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a *Pseudomonas sp.*, a una concentración 0,5 mg/mL y *Escherichia coli* fue a 0,7 mg/mL. Tiene relación con la investigación ya que el extracto etanólico dio como resultado la presencia de esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides; aunque difiere en la técnica para la determinación de la actividad antibacteriana, ya que la utilizada fue el método de difusión en disco, presentó actividad frente a la cepa de *Pseudomonas sp.*, a una concentración de 10 mg/mL.

Saleem y cols (2022), en India, realizaron un trabajo titulado Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Kalanchoe gastonis-bonniieri* y

Kalanchoe delagoensis. La obtención de los extractos fue mediante la técnica de Soxhlet usando etanol como solvente. En el análisis fitoquímico realizado con la mezcla de los extractos de ambas especies, observaron la presencia de alcaloides, esteroides, fenoles, glucósidos y flavonoides. La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *K. gastonis-bonneri*, *K. delagoensis* y la mezcla del extracto de ambas especies se realizó por el método de difusión en pozos de agar frente a seis bacterias: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la mezcla de las dos especies mostró actividad contra *E. coli* ($38,6 \pm 1,5$ mm), *K. pneumoniae* ($35 \pm 1,5$ mm), *S. aureus* ($33,67 \pm 0,53$ mm), *B. subtilis* ($31 \pm 1,0$ mm), *S. typhi* ($28,5 \pm 1,07$ mm) y *P. aeruginosa* ($28 \pm 1,07$ mm); en el extracto de *K. delagoensis* la actividad fue para *S. aureus* ($36,2 \pm 0,53$ mm), *K. pneumoniae* ($35 \pm 1,23$ mm), *E. coli* ($35 \pm 1,2$ mm), *S. typhi* ($31 \pm 1,7$ mm), *B. subtilis* ($30 \pm 1,05$ mm) y *P. aeruginosa* ($28 \pm 1,7$ mm). Por último, el extracto *K. gastonis-bonneri* presentó actividad contra *K. pneumoniae* ($37,06 \pm 0,3$ mm), *E. coli* ($35 \pm 1,02$ mm), *S. aureus* ($33,72 \pm 0,32$ mm), *B. subtilis* ($32 \pm 1,5$ mm) y *S. typhi* ($30 \pm 1,68$ mm) y *P. aeruginosa* ($26 \pm 1,34$ mm). Se relaciona con la investigación porque en el tamizaje fitoquímico se determinaron esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto de etanol; además presentó actividad contra *S. aureus* (8 mm), *P. aeruginosa* (7 mm) y *K. pneumoniae* (7 mm).

Valenzuela (2020), en Ecuador, realizó el Estudio Farmacognóstico de las especies *Kalanchoe gastonis-bonneri* y *Kalanchoe daigremontiana*. Utilizó el extracto total de las hojas de cada una de las especies con una mezcla de solventes diclorometano-metanol (1:1) mediante maceración estática, respectivamente. En el extracto obtenido identificó los principales grupos de productos naturales, mediante el tamizaje fitoquímico, determinando la presencia de flavonoides, esteroides, terpenos, taninos y

glucósidos cardiotónicos, en ambas especies. Tiene similitud con esta investigación en los metabolitos determinados flavonoides, triterpenos, esteroides, pero difiere en el disolvente y método de extracción aplicado.

Los estudios fitoquímicos preliminares de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* realizados en la India por Dasgupta, Parmar y Patel en 2013, mostraron que los extractos hidroalcohólico y etanólico de las hojas de *K. gastonis-bonnierei*, fueron obtenidos a través de la técnica de Soxhlet, ambos extractos presentaron los siguientes fitoconstituyentes: alcaloides, glucósidos, terpenoides, flavonoides y saponinas, los cuales se identificaron mediante Cromatografía de Capa Fina de Alta Resolución, estos desempeñan un papel importante en la medicina tradicional, justificando así los usos terapéuticos de las hojas de la planta. Este trabajo se relaciona con la investigación en el resultado de los metabolitos obtenidos los cuales fueron terpenoides y flavonoides presentes en el extracto etanólico, aunque difiere en la técnica desarrollada para la obtención del mismo, ya que esta fue extracción por reflujo.

Calvopiña (2010), Ecuador, en su trabajo Determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Kalanchoe pinnata* (Siempreviva) realizó extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente como éter, etanol y agua para lograr el máximo agotamiento de la droga, luego obtuvo la tintura al 20 % mediante maceración, y a partir de esta el extracto seco, la determinación de los diferentes metabolitos secundarios fue mediante pruebas químicas obteniendo como resultado la presencia de alcaloides, cumarinas, quinonas, flavonoides, fenoles, saponinas, antocianidinas, carbohidratos reductores y ácidos grasos en el extracto etanólico. Posteriormente para la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto seco de las hojas de *K. pinnata*, se empleó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco (Kirby-Bauer), las cepas estudiadas fueron *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, finalmente se demostró mediante

ensayos biológicos que el extracto seco y la tintura al 20 % tienen acción antibacteriana contra *S. aureus*, con halos de inhibición de 7 mm y 9 mm de diámetro respectivamente; a una concentración de 0,4 mg/mL. Este trabajo se relaciona con la investigación ya que de igual forma se realizó tamizaje fitoquímico obteniendo resultados positivos para triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto etanólico; además este presentó actividad antibacteriana contra las cepas de *Staphylococcus aureus* (8 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm) y *Klebsiella pneumoniae* (7 mm), con una concentración de 10 mg/mL presentando mayor sensibilidad para *S. aureus*.

Finalizadas las discusiones con los trabajos realizados por otros autores, con respecto al estudio fitoquímico se concluye que existe la posibilidad de que estos resultados no hayan sido más significativos debido a los solventes utilizados, el método de extracción, y la ubicación geográfica de la planta, ya que esta debe adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes (Alcama, Floerke y Maerker, 2007).

Además, se le puede atribuir la actividad antibacteriana a los compuestos fenólicos debido a sus propiedades oxidativas, causando la fisura citoplasmática de la bacteria (Maddox, Laur y Tian, 2010). Para la obtención de mayor sensibilidad frente a las cepas bacterianas estudiadas, se pudo haber utilizado mayor concentración del extracto, además de aplicar los métodos de dilución para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales (Ramírez y Marín, 2009).

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

En los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei*, se identificaron mediante el análisis fitoquímico la presencia de metabolitos secundarios; determinándose en el extracto de hexano triterpernos y esteroides, mientras que en el de etanol fueron esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides, por otro lado; hubo ausencia en ambos extractos de alcaloides, saponinas, taninos, cumarinas, antraquinonas, quinonas, lactonas y glucósidos cardiotónicos.

El extracto de etanol obtenido de las hojas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* presentó actividad antibacteriana contra las cepas de *Staphylococcus aureus* (8 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm) y *Klebsiella pneumoniae* (7 mm), con una concentración de 10 mg/mL, presentando mayor sensibilidad frente a la bacteria Gram positiva *S. aureus*.

Cabe resaltar que este es el primer trabajo de investigación sobre la especie *Kalanchoe gastonis-bonnierei* realizado en la ciudad de Mérida, Venezuela. Además, es el primero en determinar la actividad antibacteriana y la composición fitoquímica.

Recomendaciones

- Evaluar la composición química de otras partes de la planta como: flores y raíces.
- Realizar mediante técnicas de cromatografía la determinación e identificación de los metabolitos de las diferentes partes de la planta.
- Estudiar la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en pozo y los métodos de dilución en agar o en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), en los extractos de hexano y etanol.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria, antioxidante, antiparasitaria, antifúngica, anticancerígena, analgésica y fotoprotectora de los extractos de las diferentes especies del género *Kalanchoe*.
- Estudiar las diferentes especies que se encuentran en el estado Mérida pertenecientes al género *Kalanchoe*.

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Aguilar, W., y Bastidas, C. (2016) Procesamiento de la hoja de *Kalanchoe gasteronis-bonnieri* y *Aloe vera*, para obtener una bebida nutracéutica. (Trabajo de pregrado). Universidad de Guayaquil, Ecuador.
- Alcama, J., Floerke, M., y Maerker, M. (2007). Future long-term changes in global water resources driven by socio-economic and climate changes. *Hydrological Sciences*, 52(2), 247-275.
- Allewell, N. (2016) Introduction to biofilms thematic minireview series. *Journal of Biological Chemistry* 291:12527-8. Recuperado de <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.734103>
- Allorge, L., Wiart, C., y Teo, L. (1995) *Kopsia terengganensis* L. Allorge y C. Wiart (*Apocynaceae*). A new Malayan species, *Acta Botánica Gallica*, 142:5, 433-437, <https://doi.org/10.1080/12538078.1995.10515268>
- Almeida, A., Da Silva, A., Souza, M., Lima, L., Rossi B., Goncalves de Moraes, V. y Costa, S., (2000). Isolation and chemical analysis of a fatty acid fraction of *Kalanchoe pinnata* with a potent lymphocyte suppressive activity. *Planta Médica* 66(2), 134 -137.
- Anon, A. (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9, 1.
- Araujo, M., y Calderón, D. (2012). Determinación de la composición química y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de *Ocimum gratissimum* L (Tesis de Grado). Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Escuela de Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida.

- Ardila, D. (2014). Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos etanólicos de las plantas *Annona muricata*, *Annona cherimola* y *Physalis peruviana* en la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de seno. (Bachelor's thesis), Facultad de Ciencias.
- Arias, F. (2006). El Proyecto de Investigación. Introducción a la metodología científica. 5ta Editorial Episteme, C.A., Caracas-Venezuela.
- Aripaca, D. (2009). Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Asociación Escuela de Estudiantes de Ingeniería Química. (2001). Termodinámica Química. Ecuador: Universidad Central del Ecuador. Recuperado el 15 de septiembre de 2014.
- Ávalos, A., y Pérez, E. (2009) Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145, 2009. Recuperado de https://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf
- Bakht, N., Humaira, F., Madiha, A., y Haq, I. (2015). Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources. Austin Journal of Microbiology. 1(1), 1002.
- Barry, D. Amsterdam, M., Coyle, E., Gerlach, C., Thornsberry, H., (1979). "Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test." Journal of Clinical Microbiology. 910, 1979.
- Barquero, A. A. (2007). Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. Química Viva, 6(2),19-35. [fecha de Consulta 23 de mayo de 2023]. ISSN: Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86360203>

- Bauer, A., Kirby W., Sherris J., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45, 493-496.
- Bhalla, R., Narasimhan K., y Swarup S. (2005). Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant Cell Reports* 24:562-571.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales*. Segunda Edición. Acribia. Zaragoza.
- Bulugahapitiya, V. (2013). *Plants based natural products extraction, isolation and phytochemical screening methods* (1ra. ed.). Matara, Sri Lanka: Indika Graphics.
- Cabrera, I. (2005). *Las plantas y sus usos en las islas de Providencia y Santa Catalina*. Cali, Colombia. Programa Editorial, Universidad del Valle.
- Cabrera, D., Sánchez, Y., Guerra, D., Espinosa, A., y Almeida, M. (2011). Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de extractos de *Bryophyllum pinnata*. *Revista Química Viva*, (1), 51-58. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/863/86317320007.pdf>
- Calvopiña, G. (2010) Determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Kalanchoe pinnata* (Siempreviva) Universidad de Granma. Latacunga, Ecuador.
- Canales, D., Carazo, L., y Centeno, J. (2011). Determinación de los metabolitos secundarios de la hoja seca de la especie vegetal *Cordia inermis* mediante tamizaje fitoquímico. (Tesis de pregrado) Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Nicaragua.
- Canosa, M. (2008). Desarrollo de metodología analítica para determinación de Triclosán y Parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y

transformación en muestras ambientales (Tesis de doctorado) Universidad Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

Carrión, A., y García, C. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica (Bachelor's thesis). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2483>

Carvajal, L., Hata Y., Sierra, N., y Rueda D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). Colombia forestal, 12(1), 161-170.

Critchley, I., Blosser-Middleton, R., Jones, M., Thornsberry, C., Sahn, D., y Karlowsky, J. (2003). "Baseline study to determine *in vitro* activities of daptomycin against gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000-2001." Antimicrobial Agents Chemotherapy 47(5), 1689-1693.

Christenhusz, M., y Byng, J. (2016). «The number of known plants species in the world and its annual increase». Phytotaxa (Magnolia Press) 261 (3): 201-217. doi:10.11646/phytotaxa.261.3.1.

Costa, S., Correa, M., y Casanova, L. (2015). A new triglycosyl flavonoid isolated from leaf juice of *Kalanchoe gastonis-bonnieri* (Crassulaceae). Natural Product Communications, 433-436.

Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews, 12(4), 564-82. [http://doi.org/0893-8512/99/\\$04.00 • 0](http://doi.org/0893-8512/99/$04.00 • 0)

Coy, C., Parra, J., y Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (Rutaceae). Revista Elementos, 4, 31-39.

Dartois, V., Sánchez-Quesada, J., Cabezas, E., Chi, E., Dubbelde, C., Dunn, C., Granja, J., Gritzen, C., Weinberger, D., Ghadir, MR., y Parr, TR Jr. (2005).

Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 49(8), 3302-10.

Dasgupta, Parmar y Patel. (2013). Preliminary phytochemical studies of *Kalanchoe gastonis-bonnieri*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(4), 550 – 557.

Daza, R. (1998) Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, Vol. 22N 3-1998. Recuperado de <https://www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>

De Moreno A. (1988). *Bacteriología y Virología Básica*. Editorial Venezolana C.A.

Delporte, C. (2010). *Farmacognosia, trabajos prácticos*. Departamento de Farmacología y Toxicología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Diccionario Enciclopédico Vox 1. © 2009 Larousse Editorial, S.L.

Divo, A. (1990). *Microbiología Médica*. Cuarta Edición. México. Editorial Interamericana.

Domingo, D., y López, M. (2003). Plantas con actividad antimicrobiana. *Revista española de quimioterapia*, 16 (4), 385 – 393. Recuperado de <https://seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>

Fica, A. Aspectos básicos sobre antimicrobianos I. *Medwave* [Internet]. 1 de marzo de 2005; 5(02). Disponible en: <https://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/Reuniones/medicina/2005/2/2522>

Font Quer, P. (comp.) (1953) *Diccionario de Botánica*. Labor, Barcelona.

Forbes, B., Sahn, D., y Weissfeld, A., (2009). *Bailey y Scott; Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.

- Garcés, H., Champagne, C., Townsley, B., Park, S., Malho, R., Perdroso, M., y Sinha, N. (2007). Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*, *Plant Biology* 104 (1), 1-6.
- García, E., Roche, A., Blanco., y Rodríguez, L. (2009). La ozonoterapia en el tratamiento de la estomatitis subprótesis. *Revista Cubana de Estomatología*. 2009 [citado 27 Nov 2013]; 40(2). Disponible en: <https://revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/2383/721>
- García, R., Cruz, F., Alarcón, F., Nieto., A., y Gallegos, M. (2019). Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia testudinum* Banks ex köning et sims from the area of champoton, Campeche, México. *Polibotánica*. 48: 151-168
- Grupo Océano. (2001). *Cardiotónico*. Diccionario de Medicina Océano Mosby. Editorial Océano, Barcelona, España.
- Gómez, J., (2019). Compuestos con actividad antimicrobiana en plantas del género *Kalanchoe* como tratamiento promisorio para infecciones producidas por bacterias (Trabajo de Grado). Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Bogotá, Colombia.
- Gutiérrez, R., y Estévez, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. XXI. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103(2), 409-419. Recuperado de <https://rac.es/ficheros/doc/00899.pdf>
- Hacek, D., Dressel, D., y Peterson, L. (1999). "Highly Reproducible Bactericidal Activity Test Results by Using a Modified National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Technique", *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6) 1881.

- Handa, S., Khanuja, S., Longo, G., y Rakesh, D. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. Trieste: International Centre for Science and High Technology, ICS UNIDO. Trieste, Italia.
- Herrera, I., Chacón, N., Flores, S., Benzo, D., Martínez, J., García, B y Hernández, J. (2011). La planta exótica *Kalanchoe daigremontiana* incrementa el reservorio y flujo de carbono en el suelo, *Interciencia* 36 (12), 937-941.
- Hollis, A., y Ahmed, Z. (2013). Preserving Antibiotics, Rationally. *The New England Journal of Medicine*, 369(26):2474-6.
- Hurtado, J. (2010). El “acerca de” contenidos de la investigación en: El Proyecto de Investigación. *Comprensión Holística de la Metodología de la Investigación*. 6ta Ediciones Quirón. Bogotá.
- Karuppusamy, S (2009) A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:1222-1239
- Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., y Maestri, D (2008). *Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica* (1° ed.). Córdoba, Argentina: Editorial Encuentro. Recuperado el 12 de octubre de 2014
- Legramandi, V. (2011). *Kalanchoe gastonis-bonnieri* Raym. -Hamet & H. Perrier e *Kalanchoe pinnata* Pers. (*Crassulaceae*): atividade antifúngica e estudo farmacognóstico comparativo. (Tesis de Pregrado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Brasil. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11449/96246>
- Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos Naturales*. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Segunda Edición.

- Lucas, E. (2014, 28 de junio) Lámina 451. Bryophyllum *Gastonis-Bonnieri* Crassulaceae. Archivo recuperado 23 de abril 2023, de <https://doi.org/10.1111/1467-8748.00353>
- Lui, K., Yang, S., Roberts, M., y Phillipson, J. (1989). Eupafolin rhamnoside from *Kalanchoe gracilis*. *Journal of Natural Products* 52 (5), 970-974.
- Mabberley D.J. (1993). *The Plant-Book*. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge University Press.1993.
- Maddox, C., Laur, L., y Tian, L. (2010) Antibacterial Activity of Phenolic Compounds against the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology*, 60, 53-58. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9501-0>
- Maila, L. (2013). Respuesta del cultivo de dulcamara (*Kalanchoe gastonis-bonnieri*) a la aplicación edáfica complementaria con tres tipos de bioestimulantes. (Tesis De Grado) Universidad Central Del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Mantilla, J., y Sanabria A. (1995). Actividad antibacteriana de plantas superiores colombianas. Trabajo desarrollado dentro del proyecto de investigación “Contribución al estudio de la acción antimicrobiana de algunas plantas colombianas”, copatrocinado por COLCIENCIAS y la Universidad Nacional de Colombia.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela: Caracas.
- Martínez, J. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments.
- Maurice, M. (1993). Handbook of African Medicinal Plant. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo. 135-6

- Medinilla, B. (1993). Manual de Laboratorio de Fitoquímica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. pp 8-9.
- Mendell, G., Bennett J., y Dolin R. (2006). Enfermedades infecciosas principios y prácticas. 6ta Ed. Elsevier. España.
- Milad, R., El-Ahmady, S., y Singab, A. (2014). Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): A review of Its ethnomedicinal, botanical, Chemical and Pharmacological Properties, 4(1), 86-104.
- Miranda, M., y Cuellar, A. (2001). Farmacognosia y química de los productos naturales. Editorial Félix Varela. Ciudad de La Habana. Ministerio de Educación Superior.
- Miranda, M., Puebla, A., Guzmán, A., y Huacuja, L. (2003). Male Rat Infertility Induction/Spermatozoa and Epididymal Plasma Abnormalities After Oral Administration of *Kalanchoe gastonis-bonnierei* Natural Juice. Phytotherapy Research, 315-319.
- Molina, S., (2022). Evaluación antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales de *Vernonanthura patens* y *Kalanchoe pinnata* en condiciones de laboratorio. (Tesis de pregrado). Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias naturales, Guayaquil, Ecuador.
- Morales, N. (2018). Diferenciando Bacterias Gram Positivo (+) y Gram Negativo (-) Mediante Tinción de Gram. Unidades de Apoyo para el Aprendizaje. CUAED/FES Iztacala-UNAM.
- Murray, P., Rosenthal K., y Pfaller M. (2009). Microbiología Médica. Sexta Edición. Barcelona (España). Editorial Elsevier.

Murray, C., Ikuta, K., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S., Browne, A., Chipeta, M., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B., Kumaran, E., McManigal, B., Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Disk diffusion supplemental tables. Document M100-S10. 2000. NCCLS, Wayne, PA.

Navarro, L., Agosto, J., y Hipólito, C., (2023). Composición fitoquímica y propiedades antioxidantes de la planta mala madre (*Kalanchoe pinnata*). *South Florida Journal of Development*, Miami, 4 (1), 201-214, DOI: 10.46932/sfjdv4n1-014

Ochoa, L., y Sarmiento, A. (2018). Estudio fitoquímico de la especie vegetal *Bucquetia glutinosa* (L.f.) DC (*Melastomataceae*) y evaluación de su actividad biológica (Trabajo de pregrado). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Bogotá, Colombia.

Orantes, E. (2008). “Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca *Quararibea yunckeri* Standley Subsp. *izabalensis* W.S. Alverson ex Véliz (Bombacaceae). Universidad de san Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2007. Informe del taller interregional de la OMS sobre el uso de medicina tradicional en la atención primaria de salud. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud; Recuperado de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44146>

- Organización Mundial de la Salud. (2014). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Recuperado de https://www.who.int/topics/traditional_medicine/WHO-strategy/es/
- Parella, S., Martins, F. (2006). Metodología de la Investigación Cuantitativa. 2da edición. Caracas: FEDUPEL.
- Paraje, R., y Paraje, A. (1976). Microbiología Clínica. (Segunda edición). Buenos Aires-Argentina: Panamericana.
- Peña, R.A. (2002). Algunas consideraciones sobre el empleo de productos naturales en la medicina natural y tradicional. Monografía. Bayamo.
- Pereira, S., Vega, D., Almeida, M., y Morales, G. (2009). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la *Trichilia hirta* L. Revista Química Viva 3, 8. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/863/86320633005.pdf>
- Pérez-Calix, E. (2008). Crassulaceae. Flora del Bajío y Regiones Adyacentes, 156, 1-143.
- Pérez, A. (2009). Guía Metodológica para Anteproyectos de Investigación. Caracas, Venezuela: FEDUPEL.
- Pérez Porto, J., y Gardey, A. 2019. Motilidad - Qué es, definición y concepto. Última actualización el 7 de enero de 2020. Recuperado el 24 de abril de 2023 de <https://definicion.de/motilidad/>
- Pezzuto, J. (1995). Natural product cancer chemoprotective agents. En: Arnason JT, Mata R, Romeo JT (Eds). Recent advances in phytochemistry. Phytochemistry of medicinal plants, 29, pp. 19-45. New York
- Prats, G. (2007) Microbiología clínica. Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana.

- Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (1999). Microbiología. Madrid-España: Mc Graw Hill interamericana. (Cuarta edición).
- Programa Fomento de la Cultura Científica y Tecnológica (2008). Universidad Permanente, Universidad de Alicante. Alicante-España. <https://www.proyectosupua.es/fecyt/es/content/vegetacion-rup%C3%ADcola>
- Pujol, A., Tamargo, B., Salas, E., Calzadilla, C., y Acevedo, R. (2020). Tamizaje fitoquímico de extractos obtenidos de la planta *Sapindus saponaria L* que crece en Cuba. Revista Bionatura, 5(3),1209 - 1214. doi:10.21931/RB/2020.05.03.7
- Pumarola, A. (1995). Microbiología y parasitología médica. 2da Ed. Elsevier España.
- Quintero, J., (2018). Estudio de la química, morfología y actividad biológica de *Kalanchoe pinnata* y *Kalanchoe daigremontiana*. (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma de Chiriquí. 57-59.
- Raimi, I., Kopaopa, B., Mugivhisa, L., Lewu, F., Amoo, S., y Olowoyo, J. (1998–2018). An appraisal of documented medicinal plants used for the treatment of cancer in Africa over a twenty-year period. Journal of Herbal Medicine [Internet]. 100371. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100371>
- Ramírez A., García E., Longa A., Sánchez K., Nieves M., Velazco J., Araque M., y Mosqueda N. (2006). Manual Práctico de Bacteriología General. Mérida (Venezuela). Publicaciones Vicerrectorado Académico CODEPRE.
- Ramírez, L., y Marín, D. (2009). Metodología para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Methodologies for evaluating the *in vitro* antibacterial activity of natural compounds of plant origin. Scientia et Technica, XV, 42, 263-268.

- Ramírez-Ulloa, R. (2017). Estudio sistemático de Sedum sección Sedastrum (Crassulaceae) (Tesis de maestría). Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Zapopan, México.
- Ramos, J. J. (2012). Infectología Clínica Segunda edición. México: Editorial el Manual Moderno.
- Real Academia Española. (2014). Diccionario de la lengua española (23ª ed.).
- Remib (2008). Red Mundial de Información sobre Biodiversidad. http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib_esp.html
- Richwagen, N., Lyles, J., Dale, B., y Quave, C. (2019). Antibacterial Activity of *Kalanchoe mortagei* and *K. fedtschenkoi* Against ESKAPE Pathogens. *Frontiers in Pharmacology*, (10), 1-13.
- Ringuelet, J., y Viña, S. (2013). Productos Naturales Vegetales. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de la Plata.
- Rivero, N., Prieto, J., Hernández, A., Zaragoza, A., y Madariaga, A., (2022). Efecto antihelmíntico y antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Kalanchoe daigremontiana*. *Abanico veterinario* ISSN 2448-6132; 12:1-16
- Robineau, L. (1995) Hacia una Farmacopea Caribeña. Accedido el 23 de febrero de 2019.
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., y García, J. (2005). Bacteriología general: Principios y Prácticas de Laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica.
- Romero, R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana S.A.

- Saleem, S., Lakshmi, D., Baby, G., Nujahath, S., Nissi, V., Anusha, Y y Kumar, S. (2022). Evaluation of anti-microbial activity of ethanolic extract of *Kalanchoe gastonis bonnieri* and *Kalanchoe delagoensis*. International Journal of Pharmaceutical Research and Applications, (7) 2069-2076
- Sánchez, F. (2022). Fitoquímica. Comité Editorial de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Sánchez, E., Castillo, S., y García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., y Verde-Star, M.J. (Eds.). Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España: Omnia Science. 77-100.
- Sarker, S., Latif, Z., y Gray, A. (Ed.) (2006). Natural products isolation methods in biotechnology. New Jersey, United States of America.
- Seija, V. (2010). Género *Staphylococcus*. Sección III: Etiopatología Microbiológica. Consultado el 20 de abril de 2019.
- Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. Revista Habanera de Ciencias Médicas.
- Sharapin, N., (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia: Convenio Andrés Bello.
- Singab, A., El-Ahamdy, S., Labib, R., y Fekry, S. (2011). Phenolics from *Kalanchoe marmorata* Baker, family Crassulaceae. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University. 49(1), 1-5.
- Silva, N., y Fernandes J. (2010). Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 16(3), 402-13.

- Stefanowicz, M., Asztemborska, M., Krauze, S., Godlewska, M., Gucwa, B., Moniuszko, A., Stochmal, y Ochocka, J. (2020). Identification of flavonoids and bufadienolides and cytotoxic effects of *Kalanchoe daigremontiana* extracts on human cancer cell lines, *Planta Medica.*, 86, 239-246
- Suárez, C. (2007). Tratado de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. Buenos Aires; Madrid: Medica Panamericana.
- Tabakián, G. (2017 diciembre). Etnomedicina y Etnobotánica en el departamento de Tacuarembó, Uruguay. *Revista Uruguaya de Antropología y Etnografía.* 2, 2. Montevideo.
- Thiede, J. y Eggli, U. (2007). Crassulaceae. En K. Kubitzki (Ed.), *The families and genera of vascular plants* (pp 83–118) Berlín: Springer.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología.* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Valenzuela, J. (2020). Estudio Farmacognóstico de las Especies *Kalanchoe gastonis-bonnieri* y *Kalanchoe daigremontiana* (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Van Ham, R. C. H. J. (1995). Phylogenetic relationships in the Crassulaceae inferred from chloroplast DNA variation. *Evolution and systematics of the Crassulaceae* (pp. 16–29). Leiden, Países Bajos: Backhuys publishers.
- Velázquez, L. (2008). *Farmacología básica y clínica.* Buenos Aires; Madrid: Medica Panamericana.
- Villamizar, L., Mosquera, N., Mejia, A., Muñoz, P., y Pombo, O. (2014). Hierba de bruja *Kalanchoe pinnata*. *Fund. Universitaria Juan N. Corpas*, 3 – 29. Bogotá, Colombia.