



Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2021; 12:1-16. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.1>
Comunicación corta. Recibido:10/02/2021. Aceptado:13/12/2021. Publicado: 26/01/2022. Código: e2021-11.
<https://www.youtube.com/watch?v=5QEit7OKOWc>

Efecto antihelmíntico y antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Kalanchoe daigremontiana*

In vitro anthelmintic and antibacterial effect of *Kalanchoe daigremontiana* leaves and stems hydroalcoholic extract

Nallely Rivero-Pérez¹ , Judith Prieto-Méndez² , Alma Hernández-Fuentes³ ,
Adrián Zaragoza-Bastida*¹ , Alfredo Madariaga-Navarrete**² 

¹Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México. ²Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuaria, Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales. ³Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias. Área Académica de Agronegocios e Ingeniería en Alimentos. *Autor para correspondencia: Adrián Zaragoza-Bastida. **Autor responsable: Alfredo Madariaga-Navarrete. Rancho Universitario Av. Universidad km 1, A.P. 32 CP.43600. 01771717 2000 ext. 2440. Ex-Hda. de Aquetzalpa, Hidalgo, México. E-mail: nallely_rivero@uaeh.edu.mx, jprieto@uaeh.edu.mx, almah@uaeh.edu.mx, adrian_zaragoza@uaeh.edu.mx, alfredo_madariaga@uaeh.edu.mx

RESUMEN

Cinco concentraciones (200 a 12.5 mg mL⁻¹) del extracto hidroalcohólico de *Kalanchoe daigremontiana* fueron usadas para determinar su efecto antihelmíntico y antibacteriano *in vitro*. Para determinar el efecto antihelmíntico se realizaron las pruebas de inhibición de la eclosión, inhibición de la motilidad y mortalidad larvaria sobre *Haemonchus contortus* (HC). La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida, permitieron evaluar la actividad antibacteriana del extracto sobre *L. monocytogenes*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *B. subtilis*, *E. coli* and *S. aureus*. El extracto hidroalcohólico de *Kalanchoe daigremontiana* a 400 mg mL⁻¹ inhibió la eclosión de huevos de HC en un 99.5%, y redujo la motilidad del 85.2% de larvas L3 del mismo nematodo. Las concentraciones letales 50 y 90 para la inhibición de la eclosión fueron de 66.5 y 87.3 mg mL⁻¹ y de 1.5 y 240.9 mg mL⁻¹, para la inhibición de la motilidad. El extracto mostró actividad sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, determinándose una CMI de 100 mg mL⁻¹ sobre *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes* y 0.781 mg mL⁻¹ para *B. subtilis* and *S. aureus*. Estos resultados indican que el extracto hidroalcohólico de *Kalanchoe daigremontiana* presenta potencial efecto antihelmíntico y antibacteriano y que podría ser utilizado como una estrategia de control biológico.

Palabras clave: *Kalanchoe daigremontiana*, extracto hidroalcohólico, antihelmíntico, antibacteriano

ABSTRACT

Five concentrations (200 to 12.5 mg mL⁻¹) of *Kalanchoe daigremontiana* hydroalcoholic extract, were used to determine its anthelmintic and antibacterial effect *in vitro*. To determine the anthelmintic effect, eggs hatching inhibition, inhibition of motility and larval mortality tests were performed *Haemonchus contortus* (HC). The determination of the Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration allowed to evaluate the antibacterial activity of extract on *L. monocytogenes*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *B. subtilis*, *E. coli* and *S. aureus*. *Kalanchoe daigremontiana* hydroalcoholic extract inhibited the 99.5% of HC eggs hatching and reduced the motility of 85.2% of L3 larvae at 400 mg mL⁻¹. The lethal concentrations 50 and 90 for the inhibition of hatching were 66.5 and 87.3 mg mL⁻¹ and 1.5 and 240.9 mg mL⁻¹, for the inhibition of motility. The extract showed activity on Gram positive and Gram-negative bacteria, determining a MIC of 100 mg mL⁻¹ on *P. aeruginosa* and *L. monocytogenes* and 0.781 mg mL⁻¹ for *B.*



subtilis and *S. aureus*. These results indicate that the hydroalcoholic extract of *Kalanchoe daigremontiana* has a potential anthelmintic and antibacterial effect and that it could be used as a biological control strategy.

Keywords: *Kalanchoe daigremontiana*, hydroalcoholic extract, anthelmintic, antibacterial.

INTRODUCCIÓN

El centro de México es una zona muy conocida por cría de ovinos, principalmente para el mercado de la carne. El rendimiento y la calidad de la carne, y por tanto la viabilidad económica de la industria, dependen de la salud de los animales. La producción ovina requiere una vigilancia continua de la infección por nematodos parásitos, ya que su presencia repercute en la productividad de la carne [Alcala et al., \(2016\)](#). Los gusanos del abomaso, especialmente *Haemonchus contortus* [gusano palo de barbero; Nematoda: Strongylida] [\(Aguilar et al., 2016; Castillo et al., 2017\)](#) son los principales nematodos causantes de enfermedades gastrointestinales a los ovinos en México. Para enfrentar este problema se han utilizado varios productos antihelmínticos, muchos de los cuales han sido reportados como causantes de resistencia [\(González et al., 2017\)](#). Por otro lado, la medicina tradicional en veterinaria, especialmente el uso de extractos de plantas, se ha propuesto como una alternativa amigable con el medio ambiente contra esta infección parasitaria [\(Hernández et al., 2011; López et al., 2008; Abdelfatta et al., 2017\)](#).

El uso de plantas como agentes antihelmínticos está bien documentado. Entre las especies utilizadas con este fin se encuentran *Chenopodium album* [\(Bashir et al., 2017\)](#), *Digitaria insularis* [\(Santos et al., 2017\)](#), *Artemisa parviflora* [\(Irum-S et al., 2017\)](#), *Ziziphus jujube* [\(Preet et al., 2017\)](#), *Acacia cochliacantha* *Argemone mexicana*, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis* y *Tagetes filifolia* [\(Olmedo et al., 2017\)](#). *Kalanchoe daigremontiana* (también conocida como "madre de los miles") es una planta endémica de México [\(Kolodziejczyk et al., 2017\)](#) con varios usos reportados en la medicina herbal humana [\(Hamburger et al., 2017\)](#) y se han encontrado varios compuestos activos en los extractos de las hojas y tallos de esta planta en particular [\(Huang et al., 2013\)](#). Existen informes sobre el uso de *K. daigremontiana* como agente antimicrobiano. A continuación se presentan algunos de los compuestos aislados del género *Kalanchoe* y sus funciones (Tabla 1). Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo evaluar la capacidad antihelmíntica y antibacteriana de un extracto hidroalcohólico de *K. daigremontiana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de material vegetal e identificación de la especie: Los ejemplares de *K. daigremontiana* fueron recolectados en Ulapa de Melchor Ocampo, Tetepango, Hidalgo, en el centro de México (latitud 20.142500, longitud -99.167778). Los habitantes locales han utilizado tradicionalmente esta planta como medicamento tradicional. Se recolectaron plantas enteras (raíces, hojas y tallos) en estado fenológico de floración y se prepararon



para su transporte. La identificación de la especie se realizó en el laboratorio de botánica del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Un ejemplar representativo del material vegetal fue depositado en el herbario del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, y se le asignó el código de identificación 06.

Tabla 1. Compuestos aislados y funciones de algunas plantas del género *Kalanchoe*

Especies	Compuestos aislados	Función	Referencia
<i>Kalanchoe pinnata</i>	KPB-100 y KPB-200	Inhibidores de HHV-2 y VACV	Cryer et al., 2017
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Briofilina C	Insecticida	Supratman et al., 2000
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> x <i>tubi flora</i>	Daigremonato de metilo	Insecticida	Supratman et al., 2001
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> x <i>butiflora</i>	Briofilina A	Actividad antitumoral	Supratman et al., 2001
<i>Kalanchoe prolifera</i>	Kaempferol, quercetina, quercetina-3-O-β-D-glucopiranosido, kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosido, kaempferol-3-O-α-L-ramnósido, quercetina-3-O-soforósido, quercetina-3-O-rutinósido	Actividad citotóxica contra las células de leucemia	Aisyah et al., 2017
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Flavonoides en el extracto de metanol	Actividad antidiabética <i>in vitro</i>	George et al., 2018
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	11α,19-dihidroxitelocinobufagina, bersaldegenina-1-acetato, bersaldegenina-1, 3,5-ortoacetato, 19-acetiloxi-11α-hidroxi-12-oxo-telocinobufagina, 19-acetiloxi-1β-hidroxitelocinobufagina	Antioxidante	Kolodziejczyk-Czepas et al., 2016



<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Bufadienólidos como dihidroksitelocinobufagina, bersaldegenina-1-acetato, daigredorigenina-3-acetato,	11 α ,19-	Inhibición de la actividad amidolítica de la trombina	Kolodziejczyk-Czepas <i>et al.</i> , 2017
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Bersaldegenina-1,3,5-ortoacetato		Aumentar la apoptosis en las células deterioradas y promover la muerte celular	Stefanowicz-Hajduk <i>et al.</i> , 2020
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Quercitrina		Actividad antileishmanial	Muzitano <i>et al.</i> , 2006
<i>Kalanchoe thrysiflora</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i>	3-oxo-olean-12-ene, β -sitosterol		Actividad citotóxica selectiva en células MCF7	Singab <i>et al.</i> , 2012
<i>Kalanchoe tubiflora</i>	dimalato de kalanchosina		Actividad citotóxica	Huang <i>et al.</i> , 2013
<i>Bryophyllum pinnatum</i>	Bersaldegenina-1,3,5-ortoacetato		Actividad de inhibición de enzimas <i>in vitro</i> , para productos farmacéuticos modernos	Prasad Pandey <i>et al.</i> , 2020

Preparación del extracto: Cien gramos de hojas y vapores secos (4-6 mm) se maceraron con 3000 mL de disolvente de extracción (30 % metanol, 70 % agua); tras 72 h, se separó el extracto del residuo sólido utilizando un filtro (Whatman™ qualitative filter paper, grade 1), y se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida en un evaporador rotativo BÜCHI™ R-210 (Flawil, Alemania), siguiendo la metodología descrita por Rivero-Pérez et al, (2016). Las concentraciones evaluadas para la inhibición de la eclosión de los huevos y de la motilidad de las larvas, así como la mortalidad de las mismas, fueron 200, 100, 50, 25 y 12,5 mg mL⁻¹. Los extractos secos (35 g) se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.



Actividad antihelmíntica

Para evaluar la actividad antihelmíntica se utilizaron huevos de *H. contortus* (HC) y larvas en estadio L3. Los parásitos de la cepa INIFAP se obtuvieron del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Pecuarias y Agronómicas (INIFAP).

Prueba de eclosión de huevos

Los huevos de HC se obtuvieron siguiendo un protocolo aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Brevemente, un cordero Hampshire (3 meses y 37 kg PV), clínicamente sano y libre de nematodos gastrointestinales, fue infestado con larvas de HC en estadio L3 (350 larvas kg⁻¹ PV). Pasados 21 días después de la infestación, se recogieron muestras fecales y se determinó el número de huevos por gramo de heces mediante el método McMaster (Cordero-Miguel *et al.*, 2000).

Para recuperar los huevos de HC se siguió la metodología descrita por Olmedo *et al.*, (2017). Se lavaron 30 gramos de heces con agua destilada en tamices de 200, 100, 75 y 37 µm y se concentraron en el tamiz de 37 µm. El material retenido en el último tamiz se lavó con 6 mL de solución salina saturada y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min. El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó tres veces con agua destilada para obtener huevos libres.

Se utilizó una placa ELISA de 96 pocillos para el ensayo. En cada pocillo se añadieron entre 150 y 200 huevos en 50 µl de agua destilada y 50 µl de extracto (200, 100, 50, 25 o 12,5 mg mL⁻¹). Cada concentración de extracto se ensayó con cuatro réplicas, utilizando Ivermectina (5 mg mL⁻¹) y agua destilada como controles positivo y negativo, respectivamente. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h en una cámara de humedad constante. Tras la incubación, se observaron diez alícuotas de 10-µL al microscopio para contar el número de huevos no eclosionados y de larvas (vivas o muertas) por pocillo. Por último, se calculó el porcentaje de inhibición de la eclosión de los huevos mediante la ecuación 1.

$$\frac{\text{Número de huevos en el pocillo}}{\text{Número de larvas L1+ Número de huevos en el pocillo}} \times 100 \quad (1)$$

Prueba de mortalidad de larvas

Las heces de los corderos infestados se mezclaron con agua destilada y espuma de poliuretano (1,5 × 1,5 × 0,5 cm) y se incubaron durante 10 días a temperatura ambiente (15-20 °C). Tras la incubación, se recuperaron las larvas del estadio L3 de HC siguiendo la técnica de Baermann. Las larvas en estadio L3 se desenfundaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3 % durante un minuto y se lavaron tres veces con agua destilada para eliminar el NaClO residual.



El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 150-200 larvas suspendidas en 50 µl de agua y 50 µl de extracto de *K. daigremontiana* (200, 100, 50, 25 o 12,5 mg mL⁻¹). Cada concentración de extracto se ensayó con cuatro réplicas, utilizando Ivermectina (5 mg mL⁻¹) y agua destilada como controles positivo y negativo, respectivamente. Las placas se incubaron en una cámara de humedad constante a 30° C durante 72 h. Tras la incubación, se observaron al microscopio diez alícuotas de 10 µl para determinar el número de larvas vivas o muertas por pocillo. La tasa de mortalidad para cada concentración de extracto se determinó mediante la ecuación 2:

$$\frac{\text{Número de larvas muertas en el pocillo}}{\text{Total de larvas en el pocillo}} \times 100 \quad (2)$$

Ensayo de motilidad de las larvas

Para este ensayo, se colocaron larvas de HC en fase L3 sin envainar en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 150-200 larvas suspendidas en 50 µl de agua y 50 µl de extracto (200, 100, 50, 25 o 12,5 mg mL⁻¹). Cada concentración de extracto se ensayó con cuatro réplicas, utilizando Ivermectina (5 mg mL⁻¹) y agua destilada como controles positivo y negativo, respectivamente. Las placas se incubaron en una cámara de humedad constante a 30° C durante 72 h. Tras la incubación, se observaron alícuotas de 10 µl al microscopio para determinar el número de larvas vivas/muertas, móviles/inmóviles por pocillo. La tasa de inhibición de la motilidad para cada concentración de extracto se determinó mediante la ecuación 3:

$$\frac{\text{Número de larvas vivas en cada pocillo} - \text{Larvas con movimiento en cada pocillo}}{(\text{Número total de larvas en cada pocillo (vivas y muertas)})} \times 100 \quad (3)$$

Actividad antibacteriana

Los microorganismos utilizados para determinar la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *K. daigremontiana* fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19113) y *Escherichia coli* (ATCC 35218).

Se utilizó el método de microdilución en caldo descrito por [Kaewpiboo et al., \(2012\)](#) con algunas modificaciones para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto hidroalcohólico de *K. daigremontiana*. Se prepararon diluciones seriadas dobles del extracto hidroalcohólico de *K. daigremontiana* (de 400 a 0,781 mg mL⁻¹) por duplicado (100 µL por pocillo). Se ajustó una suspensión de células bacterianas a 0,5 unidades McFarland (aproximadamente 1,5 × 10⁶ unidades formadoras de colonias [UFC] mL⁻¹). Se añadió una alícuota de 10-µL a cada pocillo. Se utilizó kanamicina (AppliChem 4K10421™) como control positivo (64-0,5 µg mL⁻¹) y caldo nutritivo como control negativo. Las placas se incubaron a 37 °C bajo agitación (70 rpm) durante 24 h.



Tras la incubación, se añadieron 20 μL de solución de p-iodonitrotetrazolio al 0,04% (p/v) a cada pocillo y se incubaron durante 30 min. Un cambio de color de amarillo a rosa indicó la reducción del colorante debido al crecimiento bacteriano. La CIM se determinó para cada concentración de extracto como la concentración más baja en la que no se observó crecimiento microbiano, según la ausencia de cambio de color (Figura 1).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía y la prueba post hoc de Tukey-Kramer ($\alpha = 0,05$). Las concentraciones que inhibieron el 50% (CL_{50}) y el 90% (CL_{90}) de la eclosión y la motilidad de los huevos de HC, así como las que mataron el 50 y el 90% de las larvas, se calcularon mediante un análisis PROBIT utilizando el paquete estadístico SAS 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antihelmíntica

La eficacia media del extracto hidroalcohólico de *K. daigremontiana* contra la HC se muestra en la Tabla 2. Se encontró una tasa de inhibición de la eclosión de los huevos (IEH %) significativamente diferente con respecto a los controles positivos y negativos ($P < 0,0001$) en el rango 100-200 mg mL^{-1} (99,5%). Por otro lado, la mortalidad (MOR%) también fue significativamente diferente con respecto a los controles ($P < 0,0001$), observándose los valores más altos de MOR% a 50 y 25 mg mL^{-1} (16,4 y 14,5%, respectivamente). Finalmente, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a la inhibición de la motilidad (IMOT%). El valor más alto de IMOT% se observó a 200 y 100 mg mL^{-1} (85,2 y 73,1%, respectivamente).

Como se muestra en las figuras 1 y 2, los valores de CL_{50} y CL_{90} para la eclosión de los huevos fueron de 66,5 y 87,3, y de 1,5 y 240,9 para la inhibición de la motilidad en las larvas de la fase L3 de HC.

Tabla 2. Eficacia media (porcentaje \pm desviación estándar) del extracto hidroalcohólico de *Kalanchoe daigremontiana* sobre *H. contortus*

Tratamiento (mg mL^{-1})	IEH% \pm DE	IMOT% \pm DE	MOR% \pm DE
Agua	3.7 \pm 0.4 ^c	0 ^e	2.8 \pm 1.3 ^{cd}
KD (200)	99.5 \pm 0.94 ^a	85.2 \pm 4.2 ^b	6.9 \pm 3.1 ^c
KD (100)	99.5 \pm 0.95 ^a	73.1 \pm 5.3 ^c	13.5 \pm 2.6 ^b
KD (50)	10.1 \pm 0.88 ^b	64.8 \pm 5.7 ^{cd}	16.4 \pm 1.8 ^b
KD (25)	4.7 \pm 0.29 ^c	63.0 \pm 3.5 ^d	14.5 \pm 2.2 ^b
KD (12.5)	3.6 \pm 0.30 ^c	59.5 \pm 2.1 ^d	13.5 \pm 1.1 ^b
Ivermectina 5	100 ^a	100 ^a	100 ^a



EEM	0.019	0.147	0.061
P-value	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

KD: extracto hidroalcohólico de *Kalanchoe daigremontiana*. IEH: inhibición de la eclosión de los huevos. IMOT: inhibición de la motilidad. MOR: mortalidad. EEM: error estándar de la media. En cada columna, las letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$, prueba de Tukey)

Actividad antibacteriana

Como se muestra en la Tabla 3, el extracto hidroalcohólico de *K. daigremontiana* mostró actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa*) y Gram positivas (*L. monocytogenes*, *B. subtilis* y *S. aureus*). La CIM fue de 100 mg mL⁻¹ para *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes* y de 0,781 mg mL⁻¹ contra *B. subtilis* y *S. aureus*.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Kalanchoe daigremontiana* sobre las bacterias Gram (+) y Gram (-)

Bacterias	Concentración inhibitoria mínima (CIM)		
	KD mg mL ⁻¹	Kanamicina µg mL ⁻¹	Agua
<i>E. coli</i>	SA	4	SA
<i>S. typhimurium</i>	SA	4	SA
<i>S. choleraesuis</i>	SA	1	SA
<i>P. aeruginosa</i>	100 ^b	64	SA
<i>L. monocytogenes</i>	100 ^b	2	SA
<i>B. subtilis</i>	0.781 ^a	8	SA
<i>S. aureus</i>	0.781 ^a	64	SA

KD: Extracto hidroalcohólico de *Kalanchoe daigremontiana*. SA: Sin actividad. Diferentes literales ^{a,b} en la columna indican diferencias estadísticas significativas (P≤0.05)

Nuestros resultados sugieren que el extracto hidroalcohólico de *K. daigremontiana* tiene una actividad significativa contra la eclosión de huevos de *H. contortus in vitro* (Figura 1). La actividad del extracto fue buena como la del control positivo (Ivermectina 5 mg mL⁻¹), lo que indica la viabilidad de utilizar esta especie vegetal como agente antihelmíntico. Dado que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de 100 y 200 mg mL⁻¹, se podría utilizar la dosis más baja para reducir el riesgo de resistencia de los nematodos al fármaco. Curiosamente, la muerte no fue el principal efecto del extracto, sino la inhibición de la motilidad.

El extracto hidroalcohólico de *K. daigremontiana* es capaz de inhibir la eclosión de los huevos y la motilidad de las larvas (Figura 2). También se ha informado de que otras moléculas derivadas de la planta, como los flavonoides, las flavonas, las saponinas, los alcaloides, las xantonas (Rivero *et al.*, 2016), los polifenoles (Akkari *et al.*, 2016), los



taninos (Desrués *et al.*, 2016) y los derivados de pirazol-5-carboxamida (Jiao *et al.*, 2017), reducen la motilidad de las larvas. Se ha informado de la presencia en *K. daigremontiana* de flavonoides y polifenoles (Karwatzki *et al.*, 1993), y es factible que estos compuestos desempeñen un papel en la inhibición de la motilidad de las larvas.

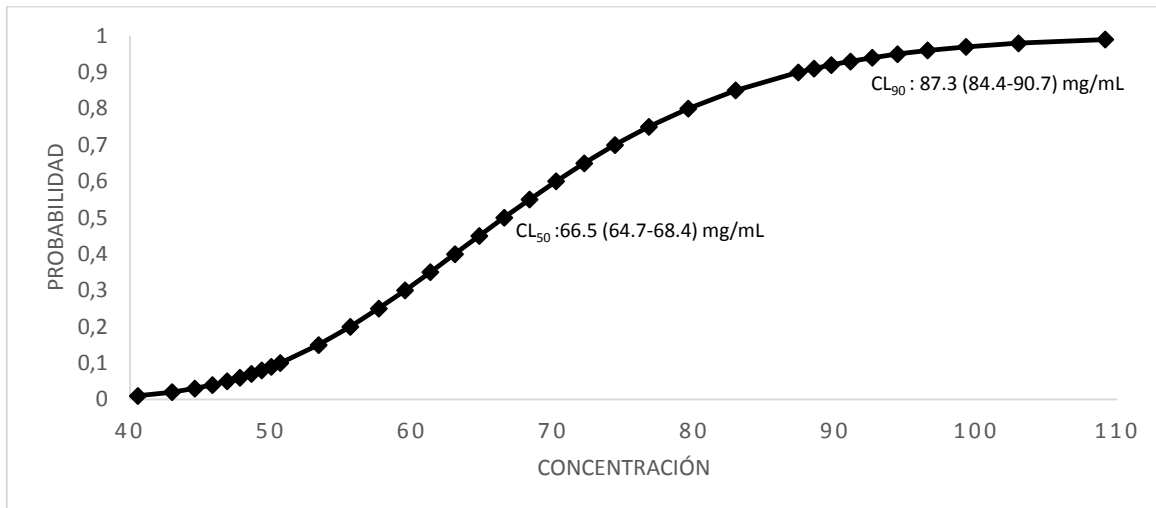


Figura 1. Concentración letal (CL₅₀ y CL₉₀) del extracto hidroalcohólico de *Kalanchoe daigremontiana* para inhibir la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus*

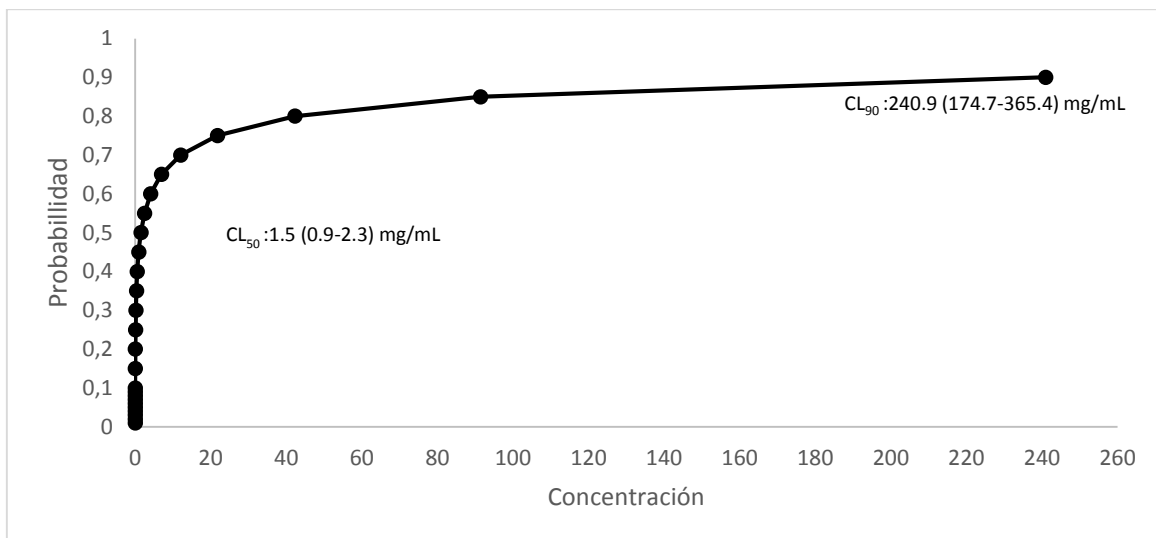


Figura 2. Concentración letal (CL₅₀ y CL₉₀) del extracto hidroalcohólico de *Kalanchoe daigremontiana* para inhibir la motilidad en larvas de *Haemonchus contortus* en estadio L3

Nuestros resultados muestran que el extracto hidroalcohólico de *K. daigremontiana* inhibe la motilidad de las larvas en estadio L3 de HC, pero no son eficaces para matarlas. Esto podría ser relevante para el uso propuesto de los extractos de *K. daigremontiana* como antihelmíntico, ya que (Moradpour *et al.*, 2013) han descrito los cambios morfológicos en



los tejidos del abomaso debido a la migración del parásito a diferentes partes del abomaso de las ovejas. Los resultados de la actividad antihelmíntica aquí reportados son similares a los observados por [Phatak \(2013\)](#), quien no encontró ninguna actividad en los extractos metanólicos y de éter de petróleo de *Kalanchoe pinnata* sobre la supervivencia de las larvas; sin embargo, los extractos redujeron la motilidad de las larvas. 5% de los huevos no eclosionaron cuando se expusieron a 100 y 200 mg mL⁻¹ del extracto, con una CL₅₀ de 66,5 mg mL⁻¹ y una CL₉₀ de 87,3 mg mL⁻¹. Según [Lunkad et al., \(2016\)](#), los extractos de especies del subgénero *Bryophyllum*, como *B. pinnatum*, mostraron actividad antihelmíntica en varias concentraciones (30 y 50 mg/ml) contra las lombrices de tierra indias *Pheretima posthuman*, contando como actividad antihelmíntica la parálisis y muerte de más del 50% de los organismos.

Un posible mecanismo de acción de los metabolitos secundarios de las plantas sobre los huevos y larvas de nematodos como *H. contortus* implica la inhibición o retraso del crecimiento y maduración del parásito por la afinidad de las glicoproteínas de la cutícula del parásito a los compuestos fenólicos (mediada por los residuos de prolina); los polifenoles pueden unirse a estas proteínas, inhibiendo la motilidad, alimentación y reproducción del parásito, causando finalmente su muerte; además, las saponinas tienen acciones membranolíticas ([Hernández et al., 2018](#); [Irshad et al., 2010](#)).

Con respecto a la actividad antibacteriana, el extracto hidroalcohólico de *K. daigremontiana* mostró una mayor actividad sobre bacterias grampositivas que sobre bacterias gramnegativas; esto podría explicarse considerando que las bacterias gramnegativas tienen una membrana externa fosfolipídica y porinas; la membrana fosfolipídica que recubre los componentes estructurales de los lipopolisacáridos hace que la pared celular sea impermeable a los solutos lipofílicos.

[Mothana et al., \(2009\)](#) evaluaron 25 plantas con actividad antibacteriana, entre ellas *Kalanchoe farinacea*. El extracto metanólico de esta planta tuvo actividad inhibitoria sobre *S. aureus*, *B. subtilis*, y *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus* multirresistentes a una concentración de 4 mg mL⁻¹, produciendo zonas de inhibición de 15 y 16 mm en cultivos de *S. aureus* y *S. epidermidis* y *S. aureus* multirresistentes, respectivamente, y zonas de inhibición de 10 mm en cultivos de *B. subtilis*, pero no tuvo efecto contra las bacterias gramnegativas.

Los extractos de diclorometano de las hojas de *K. pinnata* produjeron zonas de inhibición de 18 mm cuando se ensayaron contra *E. coli*, pero no tuvieron efecto sobre *S. aureus* ni *P. aeruginosa*. Estos resultados coinciden en parte con los que se han comunicado aquí. El extracto hidroalcohólico de *K. daigremontiana* no tuvo efecto sobre *E. coli*, pero fue eficaz contra *P. aeruginosa*, con una CIM de 100 mg mL⁻¹. El mismo estudio informó de que el extracto metanólico contenía saponinas, glucósidos cardíacos y esteroides como metabolitos secundarios con posible actividad antibacteriana.

[Richwagen et al., \(2019\)](#) informaron de la actividad antibacteriana de los extractos de dos especies de *Kalanchoe*, *K. mortgagei* y *K. fedtschenkoi*, contra los patógenos ESKAPE



(*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*). En general, se observó una inhibición del crecimiento superior al 50% (CL₅₀) a concentraciones de 256 µg mL⁻¹ y 128 µg mL⁻¹.

De Souza Barboza *et al.*, (2016), corroboraron la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de hojas y flavonoides presentes en *Kalanchoe pinnata* (Lam.), concentraciones de 100 µg mL⁻¹, mostraron una reducción del crecimiento superior al 50% para *Pseudomonas aeruginosa* y *Citrobacter freundii*.

Akinnibosun *et al.*, (1994) informaron de que un extracto etanólico de las hojas de *K. pinnata* era más eficaz contra *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* que los extractos acuosos y metanólicos de la misma planta, mostrando zonas de inhibición de 17,3 ± 1,2, 12,7 ± 0,9 y 8,3 ± 0,9 mm para *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente. En un análisis químico cualitativo del extracto etanólico se detectaron flavonoides, esteroides, alcaloides, taninos, glucósidos cardíacos y azúcares reductores, junto con metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana declarada, principalmente saponinas y compuestos fenólicos como los taninos.

CONCLUSIÓN

El presente estudio muestra el potencial efecto antihelmíntico y antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Kalanchoe daigremontiana*, contra *Haemonchus contortus*, bacterias Gramnegativas y Grampositivas, mostrando el mejor efecto sobre la inhibición de la eclosión de huevos y la motilidad larvaria de *Haemonchus contortus* y sobre el crecimiento de *B. subtilis* y *S. aureus*. Estos resultados indican que el extracto hidroalcohólico de *Kalanchoe daigremontiana* 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*.

LITERATURA CITADA

ABDELFATTA S, Elghandour M, Kholif A, López S, Pliego A, Cipriano-Salazar M, Alonso M. 2017. Tree leaves of *Salix babylonica* extract as a natural anthelmintic for small-ruminant farms in a semiarid region in Mexico. *Agroforestry Systems*. 91(1):111-122. ISSN: 1572-9680. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-9909-z>

AGUILAR-Marcelino L, Mendoza-De-Give P, Torres-Hernández G, López-Arellano M, Becerril-Pérez C, Orihuela-Trujillo A, Olmedo-Juárez A. 2016. Consumption of nutritional pellets with *Duddingtonia flagrans* fungal chlamydospores reduces infective nematode larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of Saint Croix lambs. *Journal Helminthology*. 91(6): 665-671. ISSN: 1475-2697. <https://doi.org/10.1017/S0022149X1600081X>



AKINNIBOSUN FI, Eedionwe O. 1994. Evaluation of the phytochemical and antimicrobial potential of the leaves extracts of *Bryophyllum pinnatum* L. and *Citrus aurantifolia* Sw and their synergy. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 4:611-619. ISSN: 2659-1502. <http://dx.doi.org/10.4314/jasem.v19i4.7>

ALCALA-Canto Y, Camberos L, López H, Olvera L, Pérez G. 2016 Anthelmintic resistance status of gastrointestinal nematodes of sheep to the single or combined administration of benzimidazoles and closantel in three localities in Mexico. *Veterinaria México*. 3(4). ISSN: 2448-6760. <https://doi.org/10.21753/vmoa.3.4.374>

AISYAH LS, Yun YF, Herlina T, Julaeha E, Zainuddin A, Nurfarida I, Shiono Y. 2017. Flavonoid compounds from the leaves of *Kalanchoe prolifera* and their cytotoxic activity against P-388 murine leukimia cells. *Natural Product Sciences*. 23(2):139-145. ISSN: 2288-9027. <https://doi.org/10.20307/nps.2017.23.2.139>

AKKARI H, Hajaji S, B'Chir F, Rekik M, Gharbi M. 2016. Correlation of polyphenolic content with radical-scavenging capacity and anthelmintic effects of *Rubus ulmifolius* (Rosaceae) against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 221:46-53. ISSN: 0304-4017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.007>

BASHIR L, Chishti M, Bhat F, Tak H, Bandh S, Khan A. 2017. Evaluation of anthelmintic antimicrobial and antioxidant activity of *Chenopodium album*. *Tropical Animal Health and Production*. 49(8):1597-1605. ISSN: 1573-7438. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1364-y>

CASTILLO-MITRE G, Olmedo-Juárez A, Rojo-Rubio R, González-Cortázar M, Mendoza-de Givesh P, Hernández-Beteta E, Zamilpa A. 2017. Caffeoyle and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 204: 125-131. ISSN: 0378-8741. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.010>

CORDERO CM, Rojo A, Hernández R, Calvalho V. Parasitología Veterinaria. Barcelona, España. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2000. ISBN: 84-486-0236-6 <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=489596>

CRYR M, Lane K, Greer M, Cates R, Burt S, Andrus M, Johnson FB. 2017. Isolation and identification of compounds from *Kalanchoe pinnata* having human alpha herpesvirus and vaccinia virus antiviral activity. *Pharmaceutical biology*. 55(1):1586-1591. PMID: 28395583. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1310907>



DE SOUZA BARBOZA TJE, Ferreira AEF, Ignacio ACDPR, Albarello N. 2016. Cytotoxic, antibacterial and antibiofilm activities of aqueous extracts of leaves and flavonoids occurring in *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. *Journal of Medicinal Plants Research*. 10(41):763-770. <https://doi.org/10.5897/JMPR2016.6260>

GEORGE LO, Radha HR, Somasekariah BV. 2018. In vitro anti-diabetic activity and GC-MS analysis of bioactive compounds present in the methanol extract of *Kalanchoe pinnata*. *Indian Journal of Chemistry*. 57: 1213-1221. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:91497628>

HERNÁNDEZ-ALVARADO J, Zaragoza-Bastida A, López-Rodríguez G, Peláez-Acero A, Olmedo-Juárez A, Rivero-Pérez N. 2018. Antibacterial and antihelmintic activity of plant secondary metabolites: approach in Veterinary Medicine. *Abanico Veterinario*. 8:14-27. ISSN: 2448-6132. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.81.1>

HERNÁNDEZ-Villegas M, Borges-Argaez R, Rodríguez-Vivas R, Torres-Acosta J, Méndez-González M, Cáceres-Farfán M. 2011. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 179 (1-3):100-106. ISSN: 0304-4017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.02.019>

HUANG HC, Lin MK, Yang HL, Hseu YC, Liaw CC, Tseng YH, Kuo YH. 2013. Cardenolides and bufadienolide glycosides from *Kalanchoe tubiflora* and evaluation of cytotoxicity. *Planta Medica*. 79(14):1362-1369. ISSN: 0032-0943. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1350646>

IRSHAD M, Man S, Rizvi MA. 2010. Assessment of anthelmintic activity of *Cassia fistula* L. *Middle East Journal of Scientific Research*. 5(5):346-349. ISSN:1999-8147. [http://www.idosi.org/mejsr/mejsr5\(5\)/5.pdf](http://www.idosi.org/mejsr/mejsr5(5)/5.pdf)

JIAO YQ, Preston S, Song HJ, Jabbar A, Liu YX, Baell J, Gasser RB. 2017. Assessing the anthelmintic activity of pyrazole-5-carboxamide derivatives against *Haemonchus contortus*. *Parasit Vectors*. 10:214-234. ISSN: 1756-3305. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2191-8>

KARWATZKI B, Herget A, Beerhues L, Wiermann R. 1993. *In-situ* localization of chalcone synthase in tannin-containing plants. *Phytochemistry*. 32(3):585. ISSN: 0031-9422. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95141-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95141-0)



KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS J, Stochmal A. 2017. Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use. *Phytochemistry Reviews*. 16(6):1155-1171. ISSN: 1572-980X.

<https://dx.doi.org/10.1007%2Fs11101-017-9525-1>

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS J, Nowak P, Wachowicz B, Piechocka J, Głowacki R, Moniuszko-Szajwaj B, Stochmal A. 2016. Antioxidant efficacy of *Kalanchoe daigremontiana* bufadienolide-rich fraction in blood plasma *in vitro*. *Pharmaceutical biology*. 54(12): 3182-3188. PMID: 27488985.

<https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1214740>

LÓPEZ-AROCHE U, Salinas-Sánchez D, de Gives P, López-Arellano M, Liebano-Hernández E, Valladares-Cisneros G, Hernandez-Velázquez V. 2008. *In vitro* nematicidal effects of medicinal plants from the Sierra de Huautla, Biosphere Reserve, Morelos, México against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Journal of Helminthology*. 82(1):25-31. ISSN:1475-2697 <https://doi.org/10.1017/S0022149X07873627>

LUNKAD AS, Agrawal MR, Kothawade SN. 2016. Anthelmintic activity of *Bryophyllum pinnatum*. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 8(1):21-24.

<https://doi.org/10.5958/0975-4385.2016.00005.4>

MOTHANA R, Lindequist U, Gruenert R, Bednarski JP. 2009. Studies of the *in vitro* anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 9:7. ISSN: 2662-7671. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-7>

MORADPOUR N, Borji H, Razmi G, Maleki M, Kazemi H. 2013. Pathophysiology of *Marshallagia marshalli* in experimentally infected lambs. *Parasitology*. ISSN: 1469-8161 140(14):1762-1767. <https://doi.org/10.1017/s0031182013001042>

MUZITANO MF, Tinoco LW, Guette C, Kaiser CR, Rossi-Bergmann B, Costa SS. 2006. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*. 67(18): 2071-2077. PMID: 16930642.

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.027>

OLMEDO-Juárez A, Rojo-Rubio R, Zamilpa A, de Gives PM, Arece-García J, López-Arellano ME, von Son-de Fernex E. 2017. *In vitro* larvicidal effect of a hydroalcoholic extract from *Acacia cochliacantha* leaf against ruminant parasitic nematodes. *Veterinary Research Communications*. 41 (3):227-232. ISSN :1573-7446.

<https://doi.org/10.1007/s11259-017-9687-8>



PHATAK RS. 2016. Lack of anthelmintic activity of *Kalanchoe pinnata* fresh leaves. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*. 7(1):21. ISSN: 2229-7723. <https://www.pnrjournal.com/fulltext/219-1599738067.pdf?1623436039>

PRASAD PB, Prakash S, Adhikari K. 2020. LC-ESI-QTOF-MS for the Profiling of the Metabolites and in Vitro Enzymes Inhibition Activity of *Bryophyllum pinnatum* and *Oxalis corniculata* Collected from Ramechhap District of Nepal. *Chemistry & biodiversity*. 17(6): e2000155. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000155>

PREET S, Tomar R. 2017. Anthelmintic effect of biofabricated silver nanoparticles using *Ziziphus jujuba* leaf extract on nutritional status of *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*. 154:45-51. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.07.002>

RICHWAGEN N, LYLES JT, Dale BL, Quave CL. 2019. Antibacterial activity of *Kalanchoe mortagei* and *K. fedtschenkoi* against ESKAPE pathogens. *Frontiers in pharmacology*, 10, 67. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00067>

RIVERO-PÉREZ N, Ayala-Martinez M, Zepeda-Bastida A, Meneses-Mayo M, Ojeda-Ramirez D. 2016. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of spent *Pleurotus ostreatus* substrates in mouse ears treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *The Indian Journal of Pharmacology*. 48:141-144. ISSN: 0253-7613. <https://ijp-online.com/article.asp?issn=0253-7613;year=2016;volume=48;issue=2;spage=141;epage=144;aulast=Rivero-Perez;type=0>

SANTOS FO, de Lima HG, Santos N, Serra T, Uzeda RS, Reis IMA. 2017. Batatinha, MJM. *In vitro* anthelmintic and cytotoxicity activities the *Digitaria insularis* (Poaceae). *Veterinary Parasitology*. 245:48-54. ISSN:0304-4017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.08.007>.

SANOS S, Zurfluh L, Mennet M, Potterat O, Von Mandach U, Hamburger M, Simões-Wüst, AP. 2021. *Bryophyllum pinnatum* Compounds Inhibit Oxytocin-Induced Signaling Pathways in Human Myometrial Cells. *Frontiers in Pharmacology*.12:142. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.632986>



SINGAB AB, El-Ahamdy SH, Labib RM, Fekry SS. *Kalanchoe thrysiflora* Harv. And *Kalanchoe marmorata* Baker; DNA Profiling, biological guided fractionation of different extracts; isolation and identification of cytotoxic compounds. 2012. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 02 (08): 215-220. ISSN: 2231-3354.

http://japsonline.com/admin/php/uploads/652_pdf.pdf

SUPRATMAN U, Fujita T, Akiyama K, Hayashi H. 2000. New insecticidal bufadienolide, bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 64(6): 1310-1312. PMID: 10923811. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1310>

SUPRATMAN, U, Fujita T, Akiyama K, Hayashi H. 2001. Insecticidal compounds from *Kalanchoe daigremontianax tubiflora*. *Phytochemistry*. 58(2): 311-314. PMID: 11551556 [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00199-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00199-6)

SUPRATMAN U, Fujita T, Akiyama K, Hayashi H, Murakami A, Sakai H, Ohigashi H. 2001. Anti-tumor Promoting Activity of Bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontianax butiflora*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 65(4): 947-949. PMID: 11388478. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.947>

STEFANOWICZ-HAJDUK J, Asztemborska M, Krauze-Baranowska M, Godlewska S, Gucwa M, Moniuszko-Szajwaj B, Ochocka JR. 2020. Identification of flavonoids and bufadienolides and cytotoxic effects of *Kalanchoe daigremontiana* extracts on human cancer cell lines. *Planta medica*. 86(04): 239-246. PMID: 31994149.

<https://doi.org/10.1055/a-1099-9786>

STEFANOWICZ-HAJDUK J, Hering A, Gucwa M, Hałasa R, Soluch A, Kowalczyk M, Ochocka R. 2020. Biological activities of leaf extracts from selected *Kalanchoe* species and their relationship with bufadienolides content. *Pharmaceutical Biology*. 58(1):732-740. PMID: 32715869. <https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1795208>

XING LZ, Ni HJ, Wang L. 2017. Quercitrin attenuates osteoporosis in ovariectomized rats by regulating mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 89: 1136-1141. PMID: 28314242.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.073>

Errata Erratum

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>