



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA

**Trabajo de titulación previo a obtener el grado académico
de Bióloga**

**Evaluación antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales de
Vernonanthura patens y *Kalanchoe pinnata* en condiciones de laboratorio**

AUTOR: Molina Tirado Sara Susana

TUTOR: Blgo. Flores Cedeño José Alcides

GUAYAQUIL, ABRIL, 2022

ANEXO XI. – FICHA DE REGISTRO DE TRABAJO DE TITULACIÓN

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA		
FICHA DE REGISTRO DE TRABAJO DE TITULACIÓN		
TÍTULO Y SUBTÍTULO:	Evaluación antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales de <i>Vernonanthura patens</i> y <i>Kalanchoe pinnata</i> en condiciones de laboratorio	
AUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Molina Tirado Sara Susana	
REVISOR(ES)/TUTOR(ES) (apellidos/nombres):	José Alcides Flores Cedeño	
INSTITUCIÓN:	Universidad de Guayaquil	
UNIDAD/FACULTAD:	Facultad de Ciencias Naturales	
MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:	Biología	
GRADO OBTENIDO:	Bióloga	
FECHA DE PUBLICACIÓN:	Abril 2022	No. DE PÁGINAS: 65
ÁREAS TEMÁTICAS:	Aprovechamiento sostenible de los recursos naturales	
PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:	<i>Vernonanthura patens</i> , <i>Kalanchoe pinnata</i> , Extractos vegetales, fenoles, flavonoides, tamizaje fitoquímico	
<p>RESUMEN (150-250 palabras):</p> <p>Durante muchos años las plantas han sido utilizadas por sus propiedades fúngicas y bacterianas, incluso con ellas se han desarrollado tratamientos alternativos a los medicamentos de síntesis química. Actualmente tienen múltiples usos como medicinal, alimenticio, antiparasitario, antiinflamatorio, entre otros. En este trabajo se evaluaron las propiedades antibacterianas y antifúngicas de <i>Vernonanthura patens</i> y <i>Kalanchoe pinnata</i>, llevándose a cabo varios ensayos que nos permitieron conocer los metabolitos secundarios presentes en ellas, cuyas características les permiten controlar algunos tipos de bacterias y hongos. La evaluación fitoquímica se realizó por el método de Domínguez. Las pruebas de fenoles y flavonoides totales se realizaron por los métodos de Folin-Ciocalteu, y de cloruro de aluminio respectivamente. Para las actividades biológicas se evaluaron dos bacterias: <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>E.coli</i>, y para la prueba antifúngica, <i>Fusarium</i> sp.. Se realizaron tres tratamientos con los extractos de las dos especies de plantas, las concentraciones fueron de (500 ppm, 600 ppm, 700 ppm). El extracto más efectivo fue el de <i>V. patens</i>, ya que su concentración de fenoles totales fue de $109,68 \pm 0,32$ mg GAE/g de extracto, y su concentración de flavonoides totales fue de $681,2 \pm 5,66$ mg CE/g de extracto; en la prueba antifúngica hubo inhibición a partir de 500 ppm y la prueba antibacteriana su concentración a 700 ppm se desempeñó mejor que el control positivo frente</p>		

a *Pseudomonas* sp, Por lo que se sugiere realizar pruebas de campo, especialmente para plantas con problemas de enfermedades bacterianas y fúngicas.

ABSTRACT

For many years, plants have been used for their fungal and bacterial properties, and alternative treatments to chemically synthesized drugs have even been developed with them. Currently they have multiple uses such as medicinal, food, antiparasitic, anti-inflammatory, among others. In this work, the antibacterial and antifungal properties of *Vernonanthura patens* and *Kalanchoe pinnata* were evaluated, carrying out several tests that allowed us to know the secondary metabolites present in them, whose characteristics allow them to control some types of bacteria and fungi. The phytochemical evaluation was carried out by the Domínguez method. Total phenols and flavonoids tests were performed by the Folin-Ciocalteu and aluminum chloride methods, respectively. Two bacteria were evaluated for biological activities: *Pseudomonas* sp. and *E.coli*, and for the antifungal test, *Fusarium* sp.. Three treatments were carried out with the extracts of the two plant species, the concentrations were (500 ppm, 600 ppm, 700 ppm). The most effective extract was that of *V. patens*, since its concentration of total phenols was 109.68 ± 0.32 mg GAE/g of extract, and its concentration of total flavonoids was 681.2 ± 5.66 mg. EC/g of extract; in the antifungal test there was inhibition from 500 ppm and the antibacterial test its concentration at 700 ppm performed better than the positive control against *Pseudomonas* sp. Therefore, field tests are suggested, especially for plants with bacterial disease problems and fungal.

ADJUNTO PDF:	SI	X	NO
CONTACTO CON AUTOR/ES:	Teléfono: 0996666560		E-mail: sara.molinat@ug.edu.ec
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:	Nombre: Universidad de Guayaquil		
	Teléfono: (04) 3080777 – 3080758		
	E-mail: info@fccnngye.com		

**ANEXO XII. – DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y DE AUTORIZACIÓN DE LICENCIA GRATUITA
INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA EL USO NO COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES NO
ACADÉMICOS**

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

CARRERA DE BIOLOGÍA

LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES NO
ACADÉMICOS

Yo, Sara Susana Molina Tirado con C.I. No. 0950122515 certifico que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es Evaluación antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales de *Vernonia anthura patens* y *Kalanchoe pinnata* en condiciones de laboratorio son de mi **absoluta** propiedad y responsabilidad, en conformidad al Artículo. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN*, autorizo la utilización de una licencia gratuita intransferible para el uso no comercial de la presente obra a favor de la Universidad de Guayaquil.



A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Sara Susana Molina Tirado', is written over the bottom part of the watermark logo.

Sara Susana Molina Tirado

C.I.: 0950122515

ANEXO VII. – CERTIFICADO PORCENTAJE DE SIMILITUD

Habiendo sido nombrado José Alcides Flores Cedeño, tutor del trabajo de titulación certifico que el presente trabajo de titulación ha sido elaborado por Sara Susana Molina Tirado, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de Bióloga.

Se informa que el trabajo de titulación: “Evaluación antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales de *Vernonanthura patens* y *Kalanchoe pinnata* en condiciones de laboratorio”, ha sido orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa antiplagio URKUND quedando el 3% de coincidencia.



Document Information

Analyzed document	Sara Molina Tesis Evaluación Vernonanthura patens y Kalanchoe pinnata final.docx (D130931579)
Submitted	2022-03-20T19:01:00.0000000
Submitted by	Mónica Armas Soto
Submitter email	monica.armass@ug.edu.ec
Similarity	3%
Analysis address	monica.armass.ug@analysis.urkund.com

Sources included in the report

SA	UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL / AVANCE 6 TESIS AJS 5.docx Document AVANCE 6 TESIS AJS 5.docx (D129880393) Submitted by: doloresjimenezs@ug.edu.ec Receiver: doloresjimenezs.ug@analysis.urkund.com	5
SA	TESIS NARCISA PALCHIZACA.docx Document TESIS NARCISA PALCHIZACA.docx (D47212044)	4

- <https://secure.urkund.com/view/125067178-906881-308959#/details/sources>



Firmado electrónicamente por:
**JOSE ALCIDES
FLORES CEDENO**

Blgo. José Alcides Flores Cedeño.,MSc
C.I.: 0913748323
FECHA: 21 de marzo de 2022

ANEXO VI. – CERTIFICADO DEL DOCENTE-TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

CARRERA DE BIOLOGÍA

Guayaquil, 21 de marzo de 2022

Sra. Beatriz Pernía, PhD.
DIRECTORA(e) DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad. -

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de Titulación “Evaluación antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales de *Vernonanthura patens* y *Kalanchoepinnata* en condiciones de laboratorio” de la estudiante Sara Susana Molina Tirado, indicando que ha cumplido con todos los parámetros establecidos en la normativa vigente:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado del porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación.

Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, **CERTIFICO**, para los fines pertinentes, que la estudiante Sara Susana Molina Tirado está apta para continuar el proceso de revisión final.

Atentamente,



Firmado electrónicamente por:
JOSE ALCIDES
FLORES CEDENO

Blgo. José Alcides Flores Cedeño., MSc
TUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN C.I. 0913748323
FECHA: 21 de marzo de 2022

ANEXO VIII. – INFORME DEL DOCENTE REVISOR

Guayaquil, 4 de abril de 2022

Sra. Beatriz Pernía, PhD.
DIRECTORA(e) DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

Ciudad. -

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la REVISIÓN FINAL del Trabajo de Titulación Evaluación antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales de *Vernonanthura patens* y *Kalanchoe pinnata* en condiciones de laboratorio de la estudiante Molina Tirado Sara Susana. Las gestiones realizadas me permiten indicar que el trabajo fue revisado considerando todos los parámetros establecidos en las normativas vigentes, en el cumplimiento de los siguientes aspectos:

Cumplimiento de requisitos de forma:

El título tiene un máximo de 17 palabras.

La memoria escrita se ajusta a la estructura establecida.

El documento se ajusta a las normas de escritura científica seleccionadas por la Facultad.

La investigación es pertinente con la línea y sublíneas de investigación de la carrera.

Los soportes teóricos son de máximo 10

años. La propuesta presentada es pertinente.

Cumplimiento con el Reglamento de Régimen Académico:

El trabajo es el resultado de una investigación.

El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.

El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.

El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se indica que fue revisado, el certificado de porcentaje de similitud, la valoración del tutor, así como de las páginas preliminares solicitadas, lo cual indica el que el trabajo de investigación cumple con los requisitos exigidos.

Una vez concluida esta revisión, considero que la estudiante está apta para continuar el proceso de titulación. Particular que comunicamos a usted para los fines pertinentes.

Atentamente,



Firmado electrónicamente por:
TELMO ARIEL
ESCOBAR TROYA

Escobar Troya Telmo Ariel
DOCENTE TUTOR REVISOR
C.I. 0201316650
FECHA: 4 de abril de 2022

Evaluación antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales de *Vernonanthura patens* y *Kalanchoe pinnata* en condiciones de laboratorio

Autor: Sara Susana Molina Tirado

Tutor: José Alcides Flores Cedeño

Resumen

Durante muchos años las plantas han sido utilizadas por sus propiedades fúngicas y bacterianas, incluso con ellas se han desarrollado tratamiento alternativo a los medicamentos de síntesis química. Actualmente tienen múltiples usos como medicinal, alimenticio, antiparasitario, antiinflamatorio, entre otros. En este trabajo se evaluaron las propiedades antibacterianas y antifúngicas de *Vernonanthura patens* y *Kalanchoe pinnata*, llevándose a cabo varios ensayos que nos permitieron conocer los metabolitos secundarios presentes en ellas, cuyas características les permiten controlar algunos tipos de bacterias y hongos. La evaluación fitoquímica se realizó por el método de Domínguez. Las pruebas de fenoles y flavonoides totales se realizaron por los métodos de Folin-Ciocalteu, y de cloruro de aluminio respectivamente. Para las actividades biológicas se evaluaron dos bacterias: *Pseudomonas* sp. y *E.coli*, y para la prueba antifúngica, *Fusarium* sp.. Se realizaron tres tratamientos con los extractos de las dos especies de plantas, las concentraciones fueron de (500 ppm, 600 ppm, 700 ppm). El extracto más efectivo fue el de *V. patens*, ya que su concentración de fenoles totales fue de $109,68 \pm 0,32$ mg GAE/g de extracto, y su concentración de flavonoides totales fue de $681,2 \pm 5,66$ mg CE/g de extracto; en la prueba antifúngica hubo inhibición a partir de 500 ppm y la prueba antibacteriana su concentración a 700 ppm se desempeñó mejor que el control positivo frente a *Pseudomonas* sp, Por lo que se sugiere realizar pruebas de campo, especialmente para plantas con problemas de enfermedades bacterianas y fúngicas.

Palabras claves: *Vernonanthura patens*, *Kalanchoe pinnata*, *Pseudomonas*, *E. coli*, Tamizaje fitoquímico.

**Antibacterial and antifungal evaluation of plant extracts from
Vernonanthura patens and *Kalanchoe pinnata* under laboratory
conditions**

Author: Sara Susana Molina Tirado

Advisor: José Alcides Flores Cedeño

Abstract

For many years, plants have been used for their fungal and bacterial properties, and alternative treatments to chemically synthesized drugs have even been developed with them. Currently they have multiple uses such as medicinal, food, antiparasitic, anti-inflammatory, among others. In this work, the antibacterial and antifungal properties of *Vernonanthura patens* and *Kalanchoe pinnata* were evaluated, carrying out several tests that allowed us to know the secondary metabolites present in them, whose characteristics allow them to control some types of bacteria and fungi. The phytochemical evaluation was carried out by the Domínguez method. Total phenols and flavonoids tests were performed by the Folin-Ciocalteu and aluminum chloride methods, respectively. Two bacteria were evaluated for biological activities: *Pseudomonas* sp. and *E.coli*, and for the antifungal test, *Fusarium* sp.. Three treatments were carried out with the extracts of the two plant species, the concentrations were (500 ppm, 600 ppm, 700 ppm). The most effective extract was that of *V. patens*, since its concentration of total phenols was 109.68 ± 0.32 mg GAE/g of extract, and its concentration of total flavonoids was 681.2 ± 5.66 mg. EC/g of extract; in the antifungal test there was inhibition from 500 ppm and the antibacterial test its concentration at 700 ppm performed better than the positive control against *Pseudomonas* sp. Therefore, field tests are suggested, especially for plants with bacterial disease problems and fungal.

Keywords: *Vernonanthura patens*, *Kalanchoe pinnata*, *Pseudomonas*, *E. coli*,
Phytochemical screening

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo primero a Dios, a mi pilar fundamental que son mis padres Luis Molina y Sara Tirado quienes han estado siempre apoyándome, dándome su mano en los momentos más difíciles, a los que me impulsan a seguir adelante, a ellos que me brindan todo su esfuerzo y apoyo incondicional motivándome a nunca rendirme a pesar de lo difícil que puede llegar a ser el camino.

A mis abuelitos Napoleón Molina, Targelia López, Rodrigo Tirado y Susana Álvarez por darme ejemplo de tenacidad, trabajo esfuerzo por su apoyo moral por motivarme constantemente a seguir adelante alentándome en cada una de mis ideas por estar siempre para darme un consejo y subir mi ánimo.

A Gonzalo Zambrano por ser una persona muy especial por ser mi inspiración por la paciencia, por alentarme cuando quiero rendirme por decirme siempre puedes hacerlo y si surgen problemas siempre está presente.

Hay personas que llegan a tu vida y sin pensarlo te dan la fortaleza para seguir adelante y una de esas personas es el Sr. Jacinto Peñafiel quien me apoyo que me ha brindado su confianza en este proceso.

A mis mejores amigas Jeniffer Chele y Johely Alvarado quienes han estado en cada paso durante este proceso que me han dado ánimos e impulso para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Naturales y todos sus docentes por su entrega en inculcar nuevos conocimientos para facilitar la realización de este trabajo.

A toda mi familia por estar pendientes de mi por ayudarme y motivarme a continuar cada día con el trabajo

A la Blga. Mónica Armas MsC. por todo su apoyo incondicional durante todo este proceso por ser mi guía y aconsejarme para el mejor desarrollo de esta investigación.

A mi tutor el Blgo. José Flores Cedeño por su paciencia y su guía en la ejecución de toda esta investigación.

A la Blga. Shirley Moncayo por haber compartido sus conocimientos y enseñarme como realizar las varias pruebas de esta investigación.

A mis amigos Mauricio Macias, Andrés Espinoza, Jeniffer Chele, Antonio Alencastro, Eliana Lemos, Kerlyn Lema, Ricardo Tamayo, Katty Pérez, por su ayuda en la recolección de muestras y durante el trabajo de investigación por guiarme y su apoyo incondicional.

A mis amigas Carolina y Betzabeth quienes me han apoyado en labores y tareas lo que me ha permitido tener constancia en esta investigación.

A Leonel Murillo el que me ayudo en las labores de edición y mejoramiento de la parte digital de este trabajo

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
2	OBJETIVOS.....	4
2.1	OBJETIVO GENERAL	4
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS	4
3	ANTECEDENTES.....	5
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
4.1	Área de estudio	7
4.2	Muestras vegetales	7
4.3	Extractos vegetales	7
4.4	Obtención de microorganismos	8
4.5	Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos	8
4.5.1	Determinación de Taninos	8
4.5.2	Determinación de esteroides	9
4.5.3	Determinación de antraquinonas	9
4.5.4	Determinación de Saponinas	9
4.5.5	Determinación de Terpenoides	10
4.5.6	Determinación de flavonoides.....	10
4.5.7	Determinación de alcaloides	10
4.6	Determinación de Flavonoides totales	11
4.7	Determinación fenoles totales	11
4.8	Prueba de actividad antibacterial	12
4.9	Prueba de actividad antifúngica	13
4.10	Concentración mínima inhibitoria (CIM)	14
4.11	Estadística	14

5	RESULTADOS.....	15
5.1	Tamizaje Fitoquímico.....	15
5.1.1	<i>Vernonanthura patens</i>	15
5.1.2	<i>Kalanchoe pinnata</i>	15
5.2	Cuantificación de flavonoides totales.....	17
5.3	Cuantificación de Fenoles.....	17
5.4	Actividad antibacteriana.....	18
5.4.1	<i>Kalonchea pinnata</i>	18
5.4.2	<i>Vernonanthura patens</i>	20
5.5	Actividad Antifúngica.....	21
5.5.1	<i>Kalanchoe pinnata</i>	21
5.5.2	<i>Vernonanthura patens</i>	23
5.6	Estadística.....	25
5.6.1	<i>Vernonanthura patens</i>	25
5.6.2	<i>Kalanchoe pinnata</i>	28
6	DISCUSIÓN.....	31
7	CONCLUSIONES.....	33
8	RECOMENDACIONES.....	34
9	REFERENCIAS.....	35
10	ANEXOS.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tamiuimico <i>Vernonanthura patens</i>	15
Tabla 2	<i>Tamizaje Fitoquímico de Kalachoe pinnata</i>	16
Tabla 3	<i>Concentración de Flavonoides Totales</i>	17
Tabla 4	<i>Contenido de Fenoles Totales</i>	18
Tabla 5	<i>Porcentaje de inhibición de Fusarium sp al quinto día</i>	21
Tabla 6	<i>Porcentaje de inhibición de Fusarium sp. a los 10 días</i>	22
Tabla 7	<i>Porcentaje de inhibición de Fusarium sp. extracto de V. patens en el día 5</i>	23
Tabla 8	<i>Porcentaje de inhibición de Fusarium sp. extracto de V. patens en el día 10</i>	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Curva de calibración con quercetina como estándar.....	17
Figura 2: Curva de calibración con ácido gálico como estándar	18
Figura 3: Evaluación de extractos con <i>K. pinnata</i> y un control frente a <i>Pseudomonas</i> sp. T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Cefotaxime.....	19
Figura 4: Evaluación del extracto de <i>K. pinnata</i> frente a <i>E.coli</i> . T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Cefotaxime	19
Figura 5: Evaluación del extracto de <i>V. patens</i> frente a <i>Pseudomonas</i> sp. T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Cefotaxime	20
Figura 6: Evaluación del extracto de <i>V. patens</i> frente a <i>E.coli</i> . T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Cefotaxime	21
Figura 7: Medición de crecimiento <i>Fusarium</i> sp al día 5. T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Funguicida, C-: Medio PDA	22
Figura 8: Medición de crecimiento <i>Fusarium</i> sp al día 10. T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Funguicida, C-: Medio PDA	23
Figura 9: Medición de crecimiento <i>Fusarium</i> sp al día 5 T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Funguicida, C-: Medio PDA	24
Figura 10: Medición de crecimiento <i>Fusarium</i> sp al día 10 T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Funguicida, C-: Medio PDA	25
Figura 11: Test Tukey de <i>Pseudomas</i> sp comparación múltiple de tratamientos de <i>V. patens</i>	26
Figura 12: Test Tukey de <i>E.coli</i> comparación múltiple de tratamientos de <i>V. patens</i>	26
Figura 13: Test Tukey de <i>Fusarium</i> sp. a los 5 días comparación múltiple de tratamientos de <i>V. patens</i>	27
Figura 14: Test Tukey de <i>Fusarium</i> sp. a los 10 días comparación múltiple de tratamientos de <i>V. patens</i>	28

Figura 15: Test Tukey de <i>Pseudomonas</i> sp. comparación múltiple de tratamientos de <i>K.pinata</i>	28
Figura 16: Test Tukey de <i>E. coli</i> comparación múltiple de tratamientos de <i>K.pinata</i>	29
Figura 17: Test Tukey de <i>Fusarium</i> sp de 5 días comparación múltiple de tratamientos de <i>K.pinata</i>	29
Figura 18: Test Tukey de <i>Fusarium</i> sp de 10 días comparación múltiple de tratamientos de <i>K.pinata</i>	30

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Determinación de terpenoides: <i>V. patens</i> , Control (A), Prueba de Lieberma Bouchard (B).....	39
Anexo 2: Determinación de alcaloides: <i>V. patens</i> , Control (A), Prueba de Dragendorff (B), Mayer (C)	39
Anexo 3: Determinación de flavonoides: <i>V. patens</i> , Control (A), Prueba de Na OH 10% (B), Prueba de Shinoda.....	39
Anexo 4: Determinación de esteroides: <i>V. patens</i> , Control (A), Prueba Salkowski (B).....	39
Anexo 5: Prueba de Antraquinonas: <i>V. patens</i> , Control (A), Prueba Borträger (B), Prueba ácido sulfúrico (C).....	40
Anexo 6: Determinación de taninos: <i>V. patens</i> , Control (A), Prueba cloruro férrico (B).....	40
Anexo 7: Determinación de alcaloides: <i>K. pinnata</i> , Control (A), prueba de Dragendorff (B).....	40
Anexo 8: Determinación de Flavonoides: <i>K. pinnata</i> , Control (A), Prueba de Na OH al 10%, Prueba de Shinoda.....	40
Anexo 9: Determinación de Saponinas: <i>K. pinnata</i> , control (A), Prueba de espuma (B).	41
Anexo 10: Determinación de esteroides: <i>K. pinnata</i> , control (A), Prueba de Salkowski (B).....	41
Anexo 11: Determinación de antraquinonas: <i>K. pinnata</i> , control (A), Prueba de Brontager (B), Prueba de ácido sulfúrico (C).	41
Anexo 12: Determinación de triterpenos: <i>K. pinnata</i> , control (A), Prueba de Liebermar Bouchard (B).....	41
Anexo 13: Prueba antiacteriana <i>E. coli</i> : <i>V. patens</i> 500ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (B).....	42

Anexo 14: Prueba antibacteriana <i>Pseudomonas</i> sp.: <i>V. patens</i> 500 ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (C).	42
Anexo 15: Prueba antibacteriana <i>E. coli</i> : <i>K. pinnata</i> 500ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (C).	42
Anexo 16: Prueba antibacterial <i>Pseudomonas</i> sp.: <i>K. pinnata</i> 500 ppm (A), 600ppm (B).	43
Anexo 17: Control Positivo (A), Control Negativo (B)	43
Anexo 18: <i>Fusarium</i> sp. <i>V. patens</i> 5 días, 500ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (C)	43
Anexo 19: <i>Fusarium</i> sp. <i>Kalanchoe pinnata</i> 5 días, 500ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (C).	44
Anexo 20: <i>Fusarium</i> sp. Control positivo (A), control Negativo (B) 10 días	44
Anexo 21: <i>Fusarium</i> sp. <i>V. patens</i> 10 días, 500ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (C).	44
Anexo 22: <i>Fusarium</i> sp. <i>K. pinnata</i> 10 días, 500ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (C).	45

1 INTRODUCCIÓN

A partir de la revolución industrial las zonas urbanas se incrementaron considerablemente, por consiguiente, crearon una dependencia de las zonas rurales debido a los requerimientos de alimentos, generando un incremento en la producción, almacenaje y protección de los mismos, es por eso, que se intensificó la producción de sustancias químicas (plaguicidas) generando con ello un incremento de sustancias tóxicas en estos ambientes.(del Puerto et al., 2014)

A principios del siglo XX se descubrieron algunos componentes que poseían una acción plaguicida entre estos están el cobre, arsénico, azufre, fósforo, algo que se destacó fue el extracto de *Chrysanthemum cinerariifolium*, del cual se obtuvieron sustancias más conocidas como piretrinas, además en este periodo también empezó el uso de pesticidas derivados de petróleo. (del Puerto et al., 2014)

En este sentido se define como plaguicidas a la combinación de componentes químicos o biológicos, que requieren de un manejo meticuloso y son los encargados de controlar las plagas o a su vez regular el crecimiento de plantas, además existen plaguicidas considerados de alta peligrosidad, generalmente estos son los que tienen un efecto residual, agudo e irreversible en la salud y medio ambiente. (OMS & FAO, 2014)

En la actualidad muchos centros de investigaciones se concentran en la búsqueda de metabolitos para el control de plagas producido por hongos y bacterias. El excesivo uso de plaguicidas (bactericidas y fungicidas) de síntesis química está ocasionando graves problemas de contaminación de suelos, así como también en los cuerpos de agua ubicados a los alrededores de cultivos agrícolas. (Gutiérrez et al., 2018).

Existen varias técnicas disponibles para contrarrestar las plagas en los cultivos; la mayor parte de los agricultores utiliza plaguicidas de síntesis química, sin embargo, en la actualidad debido a que se ha incrementado estrategias de

control orgánico, se ha optado por utilizar plaguicidas naturales, esto con el fin de potenciar la producción de alimentos saludables. (ORDOÑEZ & CÁRDENAS, 2018)

En cuanto a los diferentes tipos de plaguicidas pueden ser: naturales, constituido comúnmente por hongos y bacterias que poseen un efecto antagonista sobre otros microorganismos y los plaguicidas botánicos constituidos básicamente por extractos de plantas que contienen metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas y antifúngicas, siendo uno de los componentes principales los aceites esenciales de los mismo que contienen mezcla de monoterpenos, fenoles y sesquiterpenos, cuya acción se ha comprobado en el control de enfermedades fúngicas y bacterianas.(Pérez, 2012; Valdés, 2014)

Por consiguiente, dentro de los plaguicidas botánicos uno de los más conocidos es el de Neem, éste se lo encuentra de dos formas: como aceite esencial y como extracto, contienen grandes cantidades de terpeno azadiractina y otros compuestos similares, una de las cualidades positivas es que estos compuestos no son tóxicos para mamíferos más bien su efecto va dirigido a la actividad fisiológica de los insectos y microorganismos (Pérez, 2012).

Según Manzano et al. (2015) menciona que *Vernonanthura patens* posee un gran potencial para contrarrestar enfermedades, ya que su efecto antioxidante, antimicrobiano, sobre todo antileishmaniales y antiparasitarias patologías de gran incidencia en el Ecuador. En la mayoría de los estudios se ha encontrado la presencia de triterpenos, flavonoides, saponinas, sesquiterpenos lactónicos y diterpenos, el conjunto de estos grupos químicos pueden ser los responsables de las actividades atribuidas a la especie (Manzano et al., 2012).

Otro ejemplo bastante interesante lo indica Calvopiña (2010) en el extracto de *Kalanchoe pinnata* se encuentran presentes compuestos químicos tales como quinonas y alcaloides, además de poseer otros metabolitos

secundarios responsables de la actividad antimicrobiana como son cumarinas, flavonoides, fenoles, saponinas, glucósidos carcinogénicos.

Cabe considerar, por otra parte, que en Ecuador una de las fuentes de ingreso más importantes son la exportación de flores, frutas, verduras etc., aunque la mayoría de éstos sufren de diferentes plagas ocasionadas por bacterias y hongos, uno de los más conocido es: infecciones de plantas de banano causado por *Fusarium* sp. (Carrión & Herrera, 2012). Por otra parte, los plaguicidas químicos y los plaguicidas botánicos o naturales representan una gran diferencia en cuanto a los costos, por consiguiente, las personas optan por el consumo de plaguicidas químicos a pesar del perjuicio que causan al medio ambiente.

La presente investigación se llevó a cabo con el fin de determinar en los extractos de las especies estudiadas, principios activos que permitan el control de hongos y bacterias, para su uso como biocontroladores de origen natural reduciendo así el consumo de plaguicidas químicos. En la actualidad las plagas en los cultivos agrícolas han ocasionado que los productores (pequeños y grandes) tengan ingentes pérdidas económicas por la problemática antes expuesta, por ende, se considera a los extractos como una opción viable para el control microbiológico, por tal razón evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de *Vernonanthura patens* y *Kalanchoe pinnata* podría constituir una alternativa amigable para el productor agrícola en el control de enfermedades.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacterial y antifúngica del extracto de *vernonanthura patens* y *Kalanchoe pinnata*

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Determinar las concentraciones óptimas de los extractos ensayados para medir el nivel de antagonismo en hongos y bacterias.
- Cuantificar fenoles y flavonoides presentes en *Vernonanthura patens* y *Kalanchoe pinnata*
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), de los extractos vegetales de *V. patens* y *K. pinnata*.

3 ANTECEDENTES

Los estudios de *Kalanchoe* han sido muy amplios sobre todo en su parte bioquímica, estos se han realizado por varios métodos incluido el HPLC, en los resultados obtenidos se encontró que en este género están presentes los siguientes flavonoides como quercetina, kaempferol, en cuanto a glucósidos están rutina, leuteonina y los ácidos orgánicos dominantes son ácido málico, isocítrico y cítrico, los aminoácidos que prevalecen son el ácido glutámico, el ácido aspártico y la glicina, este grupo ha demostrado ser rico en polisacáridos con un contenido del 35 a 40%, la presencia de taninos condensados, saponinas, derivados de colesterol, ésteres metílicos, en cuanto a vitaminas están el ácido ascórbico, tiamina, riboflavina y oligoelementos como el zinc, hierro, calcio, sodio, potasio entre otros motivo por el que se dice que existe una presencia significativa en compuestos fenólicos (Sazhina et al., 2014).

Para la especie *K. pinnata* según Sazhina et al., (2014), en el tamizaje fitoquímico se evidenció la presencia de taninos, flavonoides, triterpenoides, leucoantocianidinas, antocianinas, así como también la presencia de vitamina E aportando de forma positiva a su efecto antioxidante ya que la presencia de polifenoles contribuye en su poder antioxidante ya que se incrementa el efecto.

En estudios realizados por Cardozo & Gomez, (2018) se señala la importancia que tiene el género *Kalanchoe* como planta medicinal, esta es muy usada debido a la presencia de bufadienólidos más conocidos como polihidroxi esteroides C-24 así como también glucósidos de gran interés estos tienen actividad anticancerígena cardiotónica este grupo posee briofilina C y A, los metabolitos presentes en este género son alcaloides, flavonoides, cumarinas, debido a la presencia de estos compuestos se podría indicar que este género también tiene propiedades antibacterianas.

Con respecto a *Vernonanthura patens* es una planta muy conocida por sus efectos biológicos y propiedades medicinales, así como también propiedades antibacterianas y antifúngicas, existen informes como el de Gupta et al., (1996), en el cual se menciona que se inhibieron los tumores de disco de

papa producidos por *Agrobacterium tumefaciens*, así como también la ausencia de citotoxicidad en líneas celulares V79.

En el estudio del extracto metanólico de hojas de *V. patens*, Manzano et al., (2015) mencionan la obtención de 53 compuestos químicos entre estos destacan los terpénicos como sesquiterpenoides y triterpenoides oxigenados también están los hidrocarburos alifáticos, ácidos grasos libres, ésteres metílicos y etílicos, azúcares, vitamina E, de la misma manera en estudios realizados de extractos de flores y tallos obtuvieron 29 ácidos grasos y 8 terpenoides, los mencionados compuestos confieren una actividad antibacterial y antifúngica a la planta. Por otro lado, en el estudio fitoquímico realizado se evidenció la presencia de catequinas, lactonas, aminoácidos, flavonoides, triterpenos – esteroides, fenoles, alcaloides y saponinas esto varía dependiendo del órgano de la planta ya que en las flores y hojas serán los lugares en donde el porcentaje de los compuestos mencionados será mayor, en el caso de las hojas los compuestos reductores se encuentran ausentes

La descripción dada por Fournet et al., (1994) indica la actividad antimalárica que presentó el extracto acuoso de hojas de *V. patens* este obtuvo una actividad inhibitoria media de 38.7 ± 10.1 µg/mL para *Plasmodium falciparum*.

Badilla et al., (2006) mencionan que entre los efectos biológicos ocasionados por el veneno de *Bothrops asper* se encuentra la inhibición de hemorragia el porcentaje de neutralización se encuentra alrededor de 18,64 - 22,07, siendo este uno de los valores más altos en comparación con las demás plantas evaluadas.

En cuanto a las propiedades medicinales y su uso en la medicina ancestral posee muchos beneficios, entre los más importantes se encuentran: aliviar dolores estomacales y de parto, combate las diarreas, erupciones en la piel y una de las principales es que es un antihelmíntico, antitusivo, también es muy usada para el tratamiento de cierto tipo de cáncer. (Manzano et al., 2013).

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

Esta investigación se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil.

4.2 Muestras vegetales

La obtención del material vegetal se realizó en dos provincias del Ecuador la primera especie *Vernonanthura patens* se recolectó en la provincia de Tungurahua, cantón Ambato y la especie *Kalanchoe pinnata* fue recolectada en la provincia del Guayas, cantón Guayaquil.

Después de la recolección de las muestras, estas fueron preparadas en el laboratorio de microbiología tomando como criterio que aquellas hojas que poseían enfermedades, plagas o daños fueron descartadas. Las seleccionadas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1%, enjuagando vigorosamente el remanente de cloro de las muestras con agua destilada estéril.

Posteriormente se pusieron las hojas en una estufa con recirculación de aire a 45°C por 48h, luego de este tiempo se llevó las hojas a un molino para triturarlas (Manzano et al., 2012), y luego se almacenaron en botellas color ámbar hasta el momento de ser utilizados

4.3 Extractos vegetales

La metodología utilizada fue la de Domínguez, (1973), para lo cual del material vegetal preparado con anterioridad se pesó 100 g de cada una de las especies seleccionadas y se las puso en maceración con etanol al 98% durante 48 horas a temperatura ambiente luego se filtraron en papel Whatman grado 1 de 11 µm se almacenó en matraces y se mantuvieron en un lugar oscuro, posteriormente se las llevó a un evaporador rotatorio para la obtención de

extractos se almacenaron en envases ámbar de 20 ml de cristal y se los llevó a refrigeración con el fin de mantener los extractos viales

4.4 Obtención de microorganismos

Pseudomonas sp, *Escherichia coli* y *Fusarium* sp. se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Naturales.

Estos se resembraron en medios de cultivo, para el caso de *E. coli* y *Pseudomonas* sp., se utilizó caldo Luria Bertani (LB) este es un caldo nutritivo para bacterias, para lo cual se pesó 1,5 g de medio y se hidrató en 75ml de agua destilada, posterior a esto se ajustó el pH para *E. coli* y *Pseudomas* sp. en 6.5 y 7 respectivamente, se autoclavó a 120°C, 1.5 ATM durante 15 minutos.

La cepa de *Fusarium* sp., se resembro en medio Agar papa dextrosa (PDA), para este caso se pesó 2.93 g y se lo hidrato en 75 mL de agua destilada luego se ajustó el pH a 6.6, para la esterilización del medio se realizó como se mencionó en el párrafo anterior.

4.5 Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos

En este ensayo la metodología empleada fue la de Harborne, (1973), el tamizaje fitoquímico se realizó con el propósito de determinar la presencia de terpenoides, flavonoides, fenoles, alcaloides, saponinas, esteroides, antraquinonas y taninos. La formación precipitados o los cambios de color dieron el indicativo de positivo a estas pruebas.

4.5.1 Determinación de Taninos

En la identificación cualitativa se utilizó la prueba de cloruro férrico donde se disolvió 10 mg de cada extracto en 2 mL de etanol, se añadieron 500 µL de solución acuosa de cloruro férrico al 10%. Los taninos si se forman colores azul o verde fueron por la presencia de fenoles.

4.5.2 Determinación de esteroides

Se usó la prueba de Salkowski se tomó 3 mL de cada extracto previamente diluido en alcohol etílico, se adicionaron 2 mL de cloroformo y 1 mL de ácido sulfúrico concentrado ambos reactivos deben ser adicionados lentamente para la formación de una doble fase, al observar un color marrón rojizo en la interfase indica la presencia del anillo esteroideo.

4.5.3 Determinación de antraquinonas

En este caso se realizaron dos ensayos.

El primero es la prueba de Bornträger en esta se pesaron 10mg de cada extracto para diluirlos en 3 mL de solución de hidróxido de potasio al 5%, debido a la polaridad de algunos extractos se los llevó a baño María hasta el momento de ebullición durante 3 minutos luego se dejó enfriar y se añadió 3mL de cloroformo se separó la capa clorofórmica y se añadió 2 mL de solución de hidróxido de potasio al 5%. La presencia de antraquinonas se observa por un color rojo.

En la segunda se realizó la prueba de ácido sulfúrico para cada extracto se disolvió 10mg de extracto en alcohol etílico posteriormente de manera lenta y por las paredes del tubo de ensayo se adicionó 500 μ L de ácido sulfúrico concentrado. La presencia de un color rojo dará un resultado positivo para antraquinonas.

4.5.4 Determinación de Saponinas

Para la identificación respectiva se realizó la prueba de la espuma se pesaron 20 mg de cada extracto y se adiciono 5 mL de agua destilada se agito vigorosamente, luego de 10 minutos al haber permanencia de espuma se tomó como resultado positivo, esta debe ser reportada de acuerdo con el tamaño de la espuma de 3 – 6 mm se considera baja concentración de 6 – 8 mm son de moderada concentración y los superiores a 8mm son alta concentración.

4.5.5 Determinación de Terpenoides

En 2 mL de extracto disuelto en etanol agregar 1 mL de ácido acético anhidro posteriormente se añadió 375 μ L de ácido sulfúrico concentrado este proceso debe ser muy lento y por las paredes del tubo de ensayo. Después de 5 minutos si se observó un color rosa, rojo, magenta o violeta indica positiva la prueba.

4.5.6 Determinación de flavonoides

Para esto se realizaron dos pruebas la de Shinoda (Mg/HCl) y la de Hidróxido de sodio 10%.

En la prueba de Shinoda a 2 mL de extracto diluido se le añadió trozos pequeños de cinta de magnesio y 375 μ L de ácido clorhídrico concentrado, la presencia de color naranja, rojo o magenta reveló la presencia de flavonas y flavonoles respectivamente.

En cuanto a la prueba de hidróxido de sodio (NaOH) al 10%, al extracto previamente diluido en etanol se le añadieron 625 μ L de la solución de NaOH al 10% la presencia de coloraciones café – naranja indicaron la presencia de flavonoles, púrpura – azul antocianinas y las amarillo rojizas indicaron xantonas o flavonas.

4.5.7 Determinación de alcaloides

En 20 mL de cada extracto disuelto en etanol, se añadió 1 mL de solución de ácido clorhídrico al 5%, se distribuyó en tubos de ensayo, posteriormente se añadió 375 μ L de reactivo de Wagner, Dragendorff y Mayer. Los resultados se compararon frente a un blanco, el precipitado rojo marrón indicó positivo para el reactivo de Wagner, el precipitado color naranja es positivo para Dragendorff y un precipitado blanco amarillento, positivo para Mayer.

4.6 Determinación de Flavonoides totales

Para la determinación de los flavonoides totales se tomó como referencia el protocolo de Atanassova et al., (2005), y se usó quercetina como patrón.

Para realizar la curva de calibración se preparó soluciones etanólicas de quercetina con las siguientes concentraciones 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL.

En el caso de los extractos vegetales se realizó una solución etanólica de 1 mg/mL. Se tomaron alícuotas de 250 µL de cada uno de los estándares y se los colocó en tubos de ensayo y se adicionó 1000 µL de agua destilada y 75 µL de NaNO₂ al 5%, se dejó reposar durante 6 minutos, pasado este tiempo se adicionó 75 µL de AlCl₃ al 10% y se esperó 5 minutos, luego se añadieron 500 µL de solución de NaOH al 1 M y por último se completó con agua destilada cada uno de los tubos de ensayo con un volumen de 2,5 mL. En el espectrofotómetro Multiskan GO THERMOCIENTIFIC se midió la absorbancia ajustando el protocolo a 510 nm.

Al obtener los valores de absorbancias de las réplicas de cada extracto se comparó con la curva de calibración de Quercetina para encontrar la concentración se usó la formula $Y = mX + b$ despejando $X = \frac{Y - b}{m}$ siendo la concentración y luego se obtuvo el contenido de flavonoides de cada extracto y los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de Quercetina por gramos de extracto seco (mg EQ/g extracto).

4.7 Determinación fenoles totales

La determinación de fenoles totales se llevó a cabo por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteus (Singleton et al., 1999). Se realizó una curva de calibración con una solución estándar de ácido gálico con concentraciones de 30, 50, 80, 100, 120, 150, 180, 210 µg/ mL, como blanco se utilizó etanol absoluto.

Se prepararon soluciones etanólicas del extracto de *Kalanchoe pinnata* y se tomó 2,5 mg/mL, mientras que del extracto de *Vernonanthura patens* se tomó 1 mg/mL, y se los mezcló con 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se lo llevo

al vortex y posteriormente a oscuridad absoluta durante 10 min, transcurrido este tiempo se añadió 1250 µL de solución de carbonato de sodio al 0.075%, se mezcló y se lo llevo a oscuridad absoluta durante 30 min a continuación se procedió a preparar la placa con 200 µL de cada concentración y luego de configurar el protocolo a una amplitud de 760nm se midió la absorbancia en el espectrofotómetro Multiskan GO THERMOCIENTIFIC.

Luego de obtener las absorbancias de las réplicas se comparó con la curva de calibración de ácido gálico para sacar la concentración esta se obtuvo mediante la formula $Y = mX + b$ al despejar $X = \frac{Y - b}{m}$ siendo ese el valor de la concentración y luego se obtuvo el contenido de fenoles de cada extracto y se los expresó como miligramos equivalentes de ácido Gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/g).

4.8 Prueba de actividad antibacterial

Se utilizó la metodología de Rondón et al., (2018) con modificación. El ensayo de difusión de disco contra bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas* sp), se mantuvo en agar a temperatura ambiente para posteriormente la preparación de un inóculo bacteriano. Se preparó un medio de cultivo Muller-Hinton agar ajustado a pH 7.2 se lo llevo a autoclavar a 120°C, una ATM durante 15 min, transcurrido este tiempo se colocó el medio en placas de Petri agregando 25 mL en cada una, luego de aproximadamente 20 minutos estando listas para la siembra.

Para la preparación del inóculo bacteriano se tomó una cepa sembrada con 24 horas de anterioridad, se tomaron aproximadamente 5 colonias y se las disolvió en solución de cloruro de sodio, se llevó la dilución al espectrofotómetro el cual se lo calibro a 625 nm y se realizó la medida de absorbancia que estuvo en *E. coli* a 0.083 y en *Pseudomonas* sp. a 0.082 luego de preparado este inoculo se realizó la siembra en las placas de agar por el método de dispersión se tomaron 200µL del inoculo y se colocó en las placas.

Luego de la siembra transcurrieron 20 min, y se adicionó los discos de sensibilidad, se colocó tres discos en cada placa, el primero es el control positivo (CP) que lleva 30 µg de cefotaxime, como control negativo (CN) se utilizó etanol absoluto 20 µL y en el último se adicionó 20 µL del extracto a diferentes concentraciones 500, 600, 700 ppm cada una de estas se realizó por triplicado, a continuación, se selló y rotulo las placas, se las llevó a la incubadora a 37°C durante 18 horas.

Transcurrido este tiempo se tomó las medidas de los aros de inhibición de cada uno de los discos de cada repetición el mismo proceso se usó para ambas bacterias.

4.9 Prueba de actividad antifúngica

El microorganismo que se evaluó es *Fusarium* sp. aplicando la técnica de discos. Se preparó el medio Potato dextrosa agar (PDA) se ajustó el pH respectivo y se lo llevó a autoclave a 120°C a 1 ATM por 15 minutos, se realizó las diluciones en etanol de cada extracto llegando a concentraciones de 500, 600, 700 ppm, como control negativo se usó etanol y como control positivo un fungicida agrícola (Patron), para cada concentración se realizarán tres réplicas, en estas se colocaron discos de sensibilidad en blanco a los que se les añadió 20 µL de extracto.

Para la siembra de las placas de Petri se utilizó un sacabocados y de una placa principal preparada con 7 días de anticipación, se tomó una parte y se colocó en las cajas preparadas (inóculo inicial), transcurridos 5 días se tomó la primera medida y a los 10 días la segunda medida el crecimiento de *Fusarium* sp., este se lo comparó con un control positivo y un control negativo. Se procedió a medir el crecimiento radial de la placa con un calibrador digital de marca Kex para la posterior determinación de la concentración mínima inhibitoria.

4.10 Concentración mínima inhibitoria (CIM)

Se determinó únicamente con microorganismos que presenten zonas inhibitorias. Las CIM fueron determinadas mediante el método estándar (Weinstein & Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020) en el caso de bacterias del extracto etanólico a diferentes concentraciones, 500, 600 y 700 ppm. La CMI fue definida como la concentración más baja que inhibía el crecimiento y se comparará con discos de sensibilidad cefalotaxime 30 µg como blanco.

En el caso de los hongos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición\ micelial\ o\ radial = \frac{(Control - Tratado)}{Control} \times 100$$

Para el cálculo del porcentaje de CIM los ensayos serán realizados al menos tres veces.

4.11 Estadística

Se realizó una correlación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos esto fue en función a las variables, se aplicó: un análisis de varianza ANOVA de una vía, prueba de Tukey y su nivel de significancia aplicado fue del 95%, se utilizó el programa GraphPad Prism 9

5 RESULTADOS

5.1 Tamizaje Fitoquímico

5.1.1 *Vernonanthura patens*

En la Tabla 1 se muestran los metabolitos secundarios presentes en *Vernonanthura patens*. Los alcaloides y saponinas se encuentran ausentes, los flavonoides, taninos y antraquinonas se presentaron de forma abundante mientras que los esteroides y triterpenos se presentaron de forma moderada.

Tabla 1
Tamizaje Fitoquímico Vernonanthura patens

Metabolitos	Ensayo	<i>V. patens</i>
Alcaloides	Reactivo de Wagner	-
	Reactivo de Dragendorff	-
	Reactivo de Mayer	-
Flavonoides	Reactivo de Shinoda	+++
	NaOH al 10%	+++
Taninos	FeCl ₃	+++
Esteroides	Salkowski	++
Antraquinonas	Bornträger	+++
	H ₂ SO ₄	+++
Triterpenos	Reactivo de Lieberman Burchard	++
Saponinas	Espuma	-

Nota. La intensidad de color en flavonoides, taninos, esteroides, triterpenos, antraquinonas, nivel de precipitación en alcaloides: Abundante (+++), Moderado (++) , Bajo (+) y Ausente (-). Saponinas: Espuma: Abundante (>8mm), Moderado (>6mm), Pobre (< 3mm), Ausente (-).

5.1.2 *Kalanchoe pinnata*

En la tabla 2 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *Kalanchoe pinnata*. Los Flavonoides se presentaron abundantes con la presencia de Xantonas y Flavonas, los Esteroides y Taninos

del mismo modo en cuanto a Terpenoides de forma moderada y las antraquinonas y saponinas se las encuentra en bajas concentraciones.

Tabla 2

Tamizaje Fitoquímico de Kalachoe pinnata

Metabolitos	Ensayo	<i>K. pinnata</i>
Alcaloides	Reactivo de Wagner	-
	Reactivo de Dragendorff	-
	Reactivo de Mayer	-
Flavonoides	Reactivo de Shinoda	+++
	NaOH al 10%	+++
Taninos	FeCl ₃	+++
Esteroles	Salkowski	+++
Antraquinonas	Bornträger	+
	H ₂ SO ₄	+
Triterpenos	Reactivo de Lieberman Burchard	++
Saponinas	Espuma	4.50mm

Nota. La intensidad de color en flavonoides, taninos, esteroles, triterpenos, antraquinonas, nivel de precipitación en alcaloides: Abundante (+++), Moderado (++) , Bajo (+) y Ausente (-). Saponinas: Espuma: Abundante (>8mm), Moderado (>6mm), Pobre (< 3mm), Ausente (-).

5.2 Cuantificación de flavonoides totales

La curva de calibración con quercetina como medio estándar obtenida para la cuantificación de flavonoides totales se muestra en la figura 1

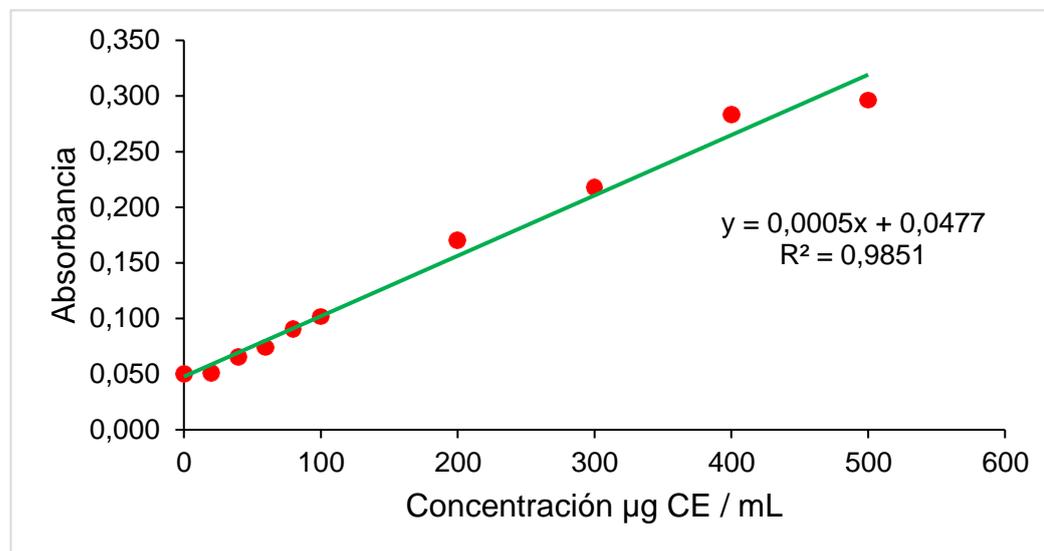


Figura 1: Curva de calibración con quercetina como estándar

En la Tabla 3 se evidenció los resultados del contenido total de flavonoides de las dos plantas evaluadas:

Vernonanthura patens, presentó un contenido de flavonoides totales de $681,2 \pm 5,66$ mg CE/ g extracto.

Kalanchoe pinnata presentó un contenido de flavonoides totales de $195,9 \pm 2,83$ mg CE/g extracto

Tabla 3

Concentración de Flavonoides Totales

Especie	Flavonoides totales (mgCE/g extracto)
<i>Vernonanthura patens</i>	$681,2 \pm 5,66$
<i>Kalanchoe pinnata</i>	$195,9 \pm 2,83$

5.3 Cuantificación de Fenoles

En la figura 2 se muestra la curva obtenida para la cuantificación de fenoles totales con el uso de ácido gálico como estándar.

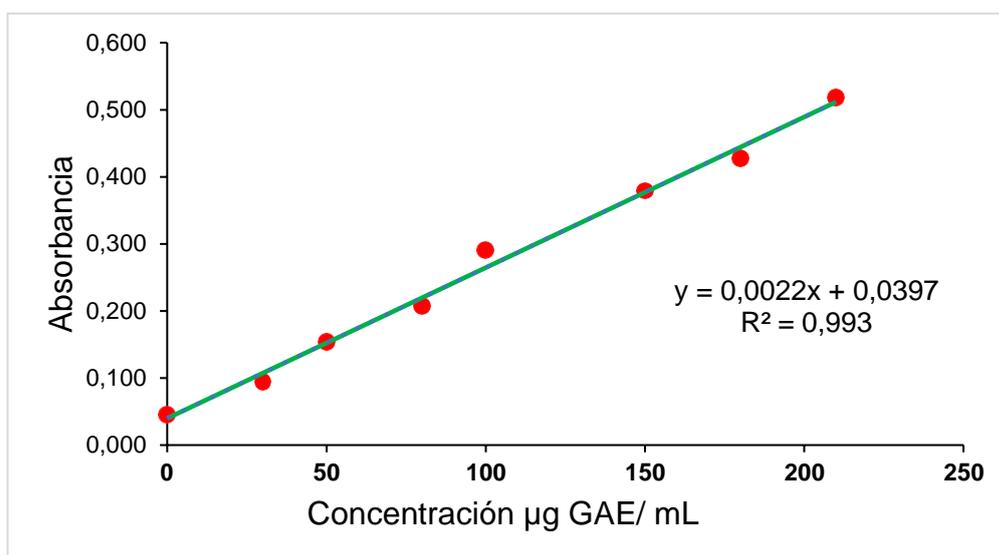


Figura 2: Curva de calibración con ácido gálico como estándar

En la Tabla 4 se evidenció los resultados del contenido de fenoles totales de las plantas evaluadas.

Vernonanthura patens el contenido total de fenoles que obtuvo es de $109,68 \pm 0,32$ mg GAE/g extracto.

Kalanchoe pinnata en su contenido total de fenoles obtuvo $75,75 \pm 0,13$ mg GAE/g extracto.

Tabla 4

Contenido de Fenoles Totales

Especie	Fenoles totales (mg GAE/g extracto)
<i>Vernonanthura patens</i>	$109,68 \pm 0,32$
<i>Kalanchoe pinnata</i>	$75,75 \pm 0,13$

5.4 Actividad antibacteriana

5.4.1 *Kalonchea pinnata*

La concentración mínima inhibitoria (ICM) de *Kalanchoe pinnata* se presenta en la figura 3, en este indicó la relación que se obtuvo de los tratamientos a diferentes concentraciones, el antibiótico cefotaxime fue tomado como control positivo, para la evaluación de *Pseudomonas* sp. Se observó que el tratamiento 2 y 3 tuvieron actividad antimicrobiana al igual que el control positivo, sin embargo, el tratamiento 1 al compararse con el control positivo tuvo una notoria diferencia.

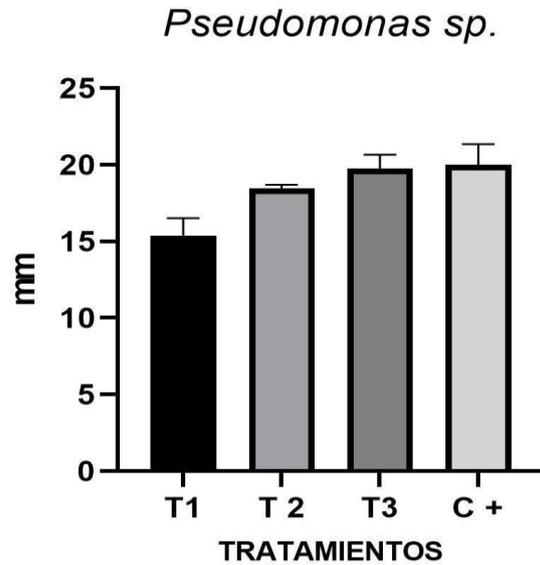


Figura 3: Evaluación de extractos con *K. pinnata* y un control frente a *Pseudomonas sp.* T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Cefotaxime.

En la Figura 4 se evidenció los resultados obtenidos de la ICM de *K. pinnata* a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli*, el antibiótico cefotaxíme fue usado como control positivo para la comparación. Todos los tratamientos tuvieron diferencia significativa frente al control lo que demuestra que los tratamientos aplicados no son eficientes.

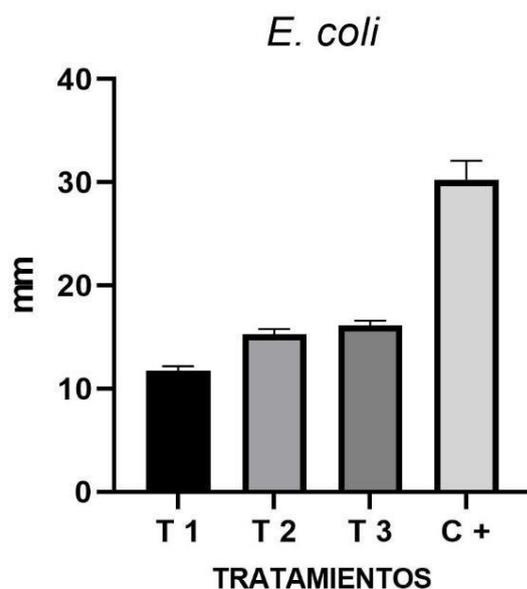


Figura 4: Evaluación del extracto de *K. pinnata* frente a *E. coli*. T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Cefotaxime.

5.4.2 *Vernonanthura patens*

En la figura 5 se presenta los resultados de la ICM del extracto alcohólico de *Vernonanthura patens* a diferentes concentraciones, se lo comparó con un antibiótico cefotaxime (control positivo), se demostró que todos los tratamientos aplicados fueron eficaces para la inhibición de *Pseudomonas sp.*, otra característica importante es que el tratamiento 3 supero al control positivo.

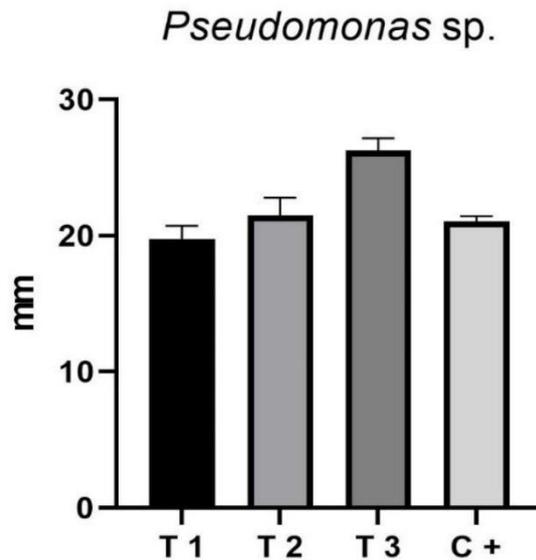


Figura 5: Evaluación del extracto de *V. patens* frente a *Pseudomonas sp.* T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Cefotaxime

Los resultados que se obtuvieron en la ICM presentada por el extracto etanolico de *V. patens* a diferentes concentraciones se observa en la Figura 6, se comparó tres tratamientos a diferentes concentraciones frente a un control positivo (antibiótico), frente a *E. coli*, sin embargo, se observó, que ninguno de los tratamientos es efectivo a pesar de presentar un halo de inhibición.

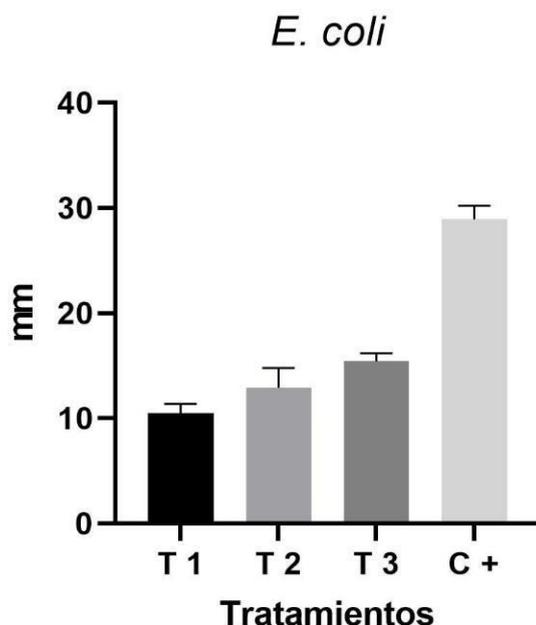


Figura 6: Evaluación del extracto de *V. patens* frente a *E.coli*. T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Cefotaxime

5.5 Actividad Antifúngica

5.5.1 *Kalanchoe pinnata*

Los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición con el extracto de *Kalanchoe pinnata* a diferentes concentraciones pasados los 5 días de incubación se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5

Porcentaje de inhibición de *Fusarium sp* al quinto día.

TRATAMIENTOS	% DE INHIBICIÓN
Tratamiento 1 (500ppm)	4,44
Tratamiento 2 (600ppm)	29,01
Tratamiento 3 (700ppm)	37,15

Los resultados presentados en la figura 7 indicó las mediciones realizadas al diámetro de crecimiento de *Fusarium sp*. luego de 5 días de haber inoculado el microorganismo se evaluó los tratamientos frente a dos controles, un positivo y un negativo como se observa el Tratamiento 2 y 3 tienen más similitud con el control positivo, sin embargo, el tratamiento 1 se asemeja más al control

negativo, al 5to día por lo tanto este tratamiento no es eficiente en este periodo de tiempo.

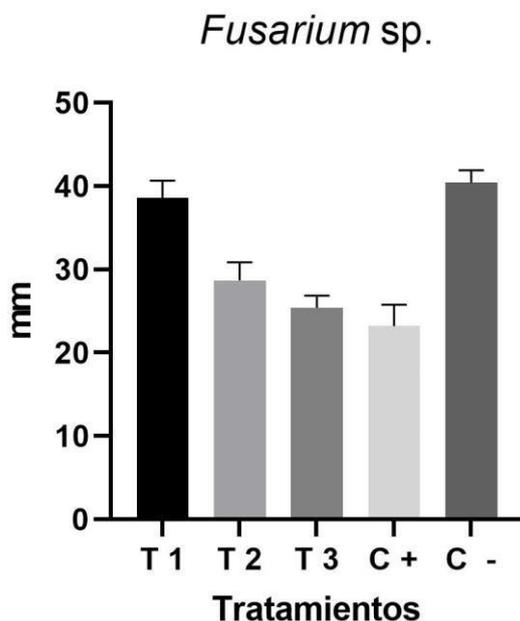


Figura 7: Medición de crecimiento *Fusarium sp* al día 5. T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Funguicida, C-: Medio PDA

En la Tabla 6 se presentaron los resultados del porcentaje de inhibición obtenido con el extracto alcohólico de *Kalanchoe pinnata* a diferentes concentraciones, luego de 10 días de inoculación de *Fusarium sp.*

Tabla 6

Porcentaje de inhibición de Fusarium sp. a los 10 días

TRATAMIENTOS	% DE INHIBICIÓN
Tratamiento 1 (500ppm)	23,73
Tratamiento 2 (600ppm)	34,87
Tratamiento 3 (700ppm)	44,18

En la Figura 8 se indicó los resultados obtenidos de la medida tomada a *Fusarium sp.* luego de 10 días de incubación, se evaluó el extracto etanólico de

Kalanchoe pinnata a diferentes concentraciones y dos controles positivo que tuvo un fungicida y negativo medio PDA

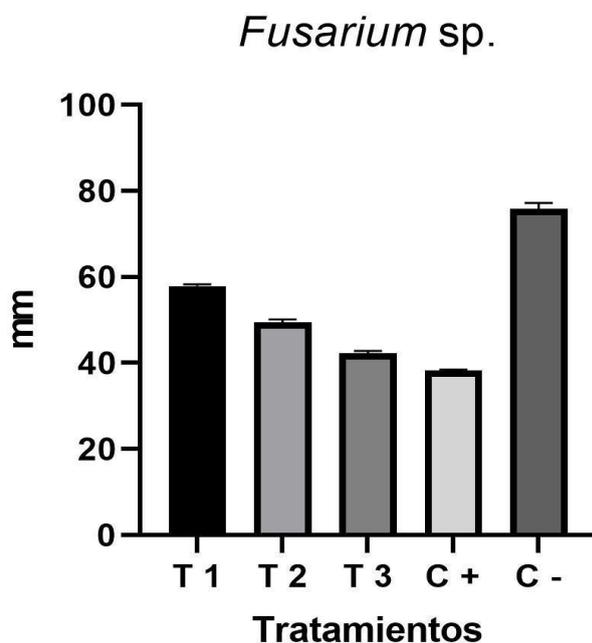


Figura 8: Medición de crecimiento *Fusarium sp* al día 10. T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Fungicida, C- : Medio PDA

5.5.2 *Vernonanthura patens*

En la Tabla 7 se mostraron los resultados del porcentaje de inhibición que produjo el extracto etanolico de *Vernonanthura patens* a diferentes concentraciones luego de 5 días de incubado *Fusarium sp.*

Tabla 7

Porcentaje de inhibición de Fusarium sp. extracto de V. patens en el día 5

TRATAMIENTOS	% DE INHIBICIÓN
Tratamiento 1 (500ppm)	23,39
Tratamiento 2 (600ppm)	28,72
Tratamiento 3 (700ppm)	48,26

Los resultados presentados en la Figura 9 indicaron el crecimiento de *Fusarium sp.* en extracto etanólico de *V. patens* a diferentes concentraciones estos tratamientos fueron comparados frente a dos controles: un positivo y un negativo, 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.

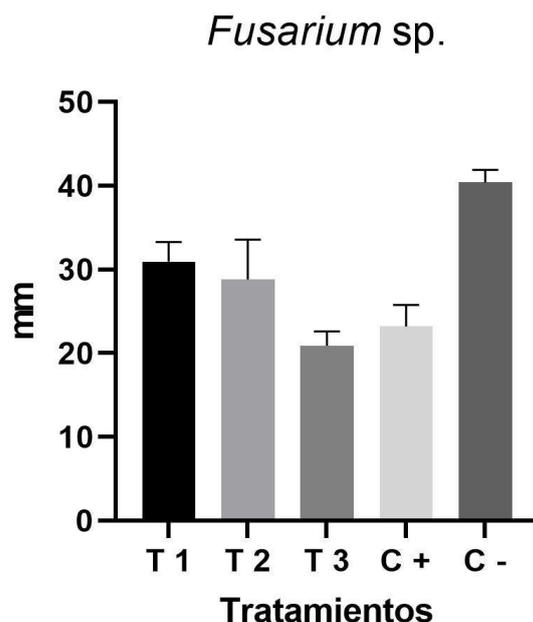


Figura 9: Medición de crecimiento *Fusarium sp.* al día 5 T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Funguicida, C-: Medio PDA

La Tabla 8 indica el porcentaje de inhibición que presentó *Fusarium sp.* frente al extracto etanolico de *V. patens* a diferentes concentraciones pasados los 10 días de incubación de la cepa.

Tabla 8

Porcentaje de inhibición de Fusarium sp. extracto de V. patens en el día 10

TRATAMIENTOS	% DE INHIICIÓN
Tratamiento 1 (500ppm)	38,70
Tratamiento 2 (600ppm)	38,30
Tratamiento 3 (700ppm)	47,90

En la Figura 10 se presenta los resultados del crecimiento que se obtuvo después de 10 días de incubación de *Fusarium sp.* se puede observar cómo los tres tratamientos tienen similitud comparado con el control positivo por lo tanto los tres tratamientos son efectivos, sin embargo, el tratamiento 3 y el control positivo no tienen diferencias es decir su crecimiento es el más parecido.

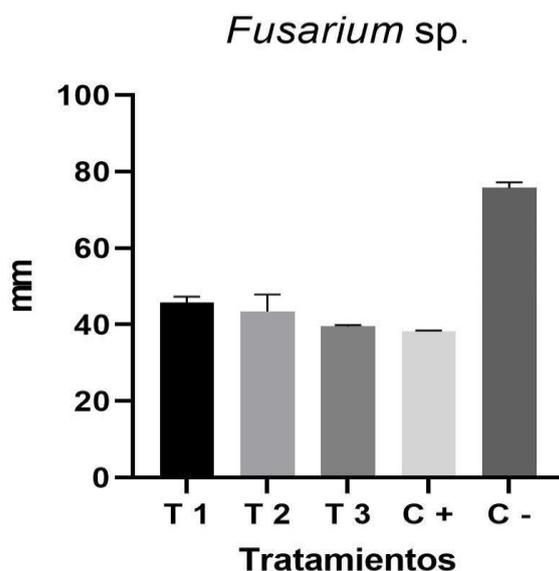


Figura 10: Medición de crecimiento *Fusarium sp* al día 10 T1: 500ppm, T2: 600ppm, T3: 700ppm, C+: Funguicida, C-: Medio PDA

5.6 Estadística

En la aplicación del test de ANOVA de una vía el valor p fue <0.05, lo cual indica una diferencia significativa entre las medias de los tratamientos realizados con *Vernonanthura patens* y *Kalanchoe pinnata* frente a *Pseudomonas sp.*, *E.coli* y *Fusarium sp.* esto se corroboró realizando un test de Tukey con un intervalo de confianza de 95%.

5.6.1 *Vernonanthura patens*

En la Figura 11, se refleja cómo *V. patens* frente a *Pseudomonas sp.*, correspondiente a los Tratamientos 1 y 2 frente al control positivo son similares, sin embargo, en el Tratamiento 3 se observó una diferencia más acentuada, es decir su inhibición fue mayor que en todos los tratamientos, incluido el Control positivo.

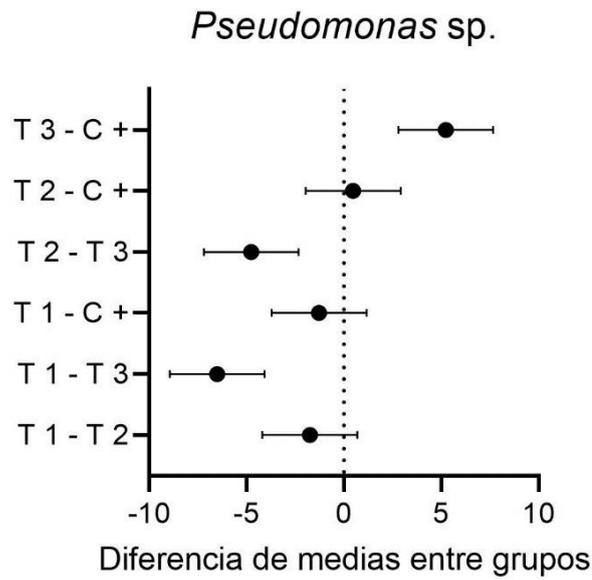


Figura 11: Test Tukey de *Pseudomonas sp* comparación múltiple de tratamientos de *V. patens*

Al evaluar *V. patens* frente a *E. coli* (Figura 12), el comportamiento de los Tratamientos 1, 2, 3 comparados con el control positivo tuvieron una diferencia acentuada, ya que su halo de inhibición reflejó un crecimiento inferior al control.

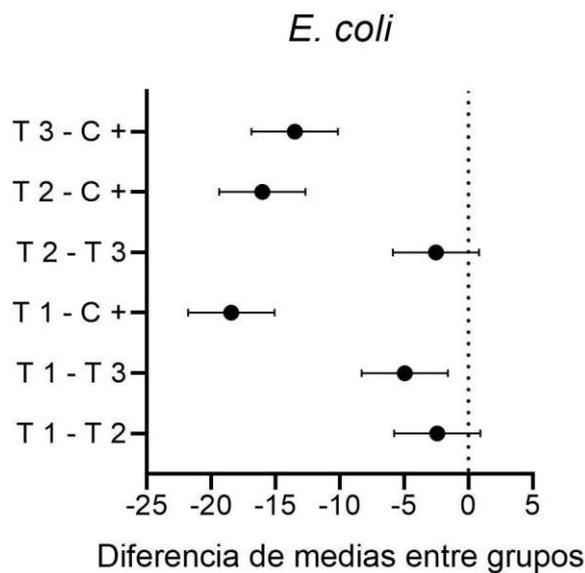


Figura 12: Test Tukey de *E.coli* comparación múltiple de tratamientos de *V. patens*

De la prueba de antagonismo entre *Fusarium* sp. y *V. patens* (Figura 13) los resultados después del quinto día de inoculación se observaron que el Tratamiento 1 tubo diferencia significativa con los Tratamientos 2, 3 y el control positivo, esto quiere decir que el crecimiento radial difiere entre los tres tratamientos mencionados. Es de manifestar que los Tratamientos 2 y 3 se comportaron de igual forma que el control positivo.

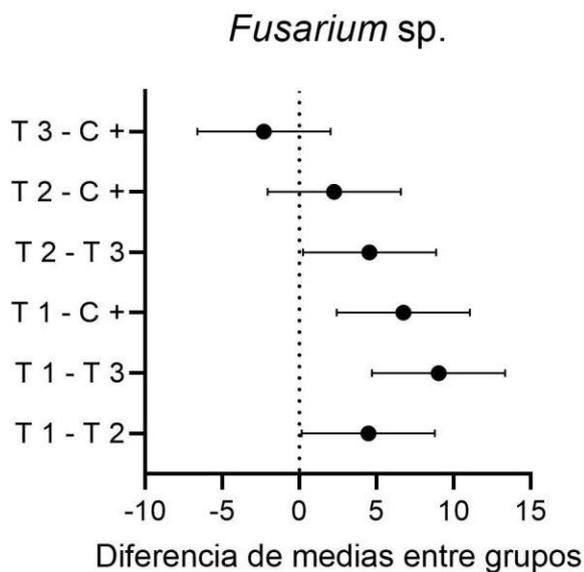


Figura 13: Test Tukey de *Fusarium* sp. a los 5 días comparación múltiple de tratamientos de *V. patens*.

Al comparar los niveles de antagonismo a los 10 días de inoculación entre *Fusarium* sp. y *V. patens* (Figura 14) se observó que hubo diferencia significativa entre los Tratamientos 1 y 2 frente al control positivo, sin embargo, el Tratamiento 3 y el control positivo no reflejaron diferencia significativa.

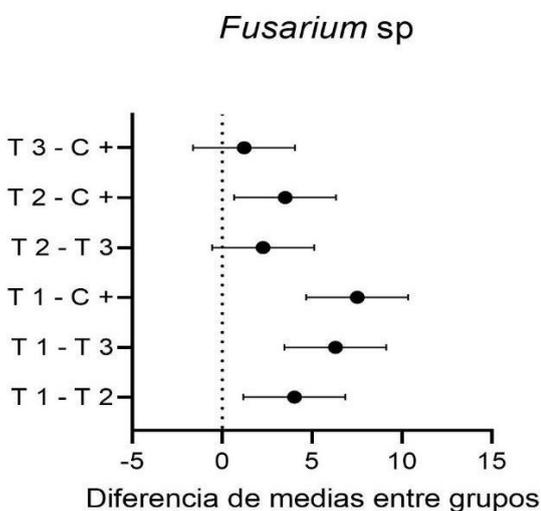


Figura 14: Test Tukey de *Fusarium* sp. a los 10 días comparación múltiple de tratamientos de *V. patens*

5.6.2 *Kalanchoe pinnata*

En lo que respecta a las pruebas de antagonismo entre *K. pinnata* con *Fusarium* sp. (Figura 15) los resultados arrojaron que el Tratamiento 1 tuvo diferencias significativas con los tratamientos 2, 3 y con el control positivo. Por otro lado, al comparar los Tratamientos 2 y 3 con el control positivo no se observó diferencia significativa en los tratamientos mencionados.

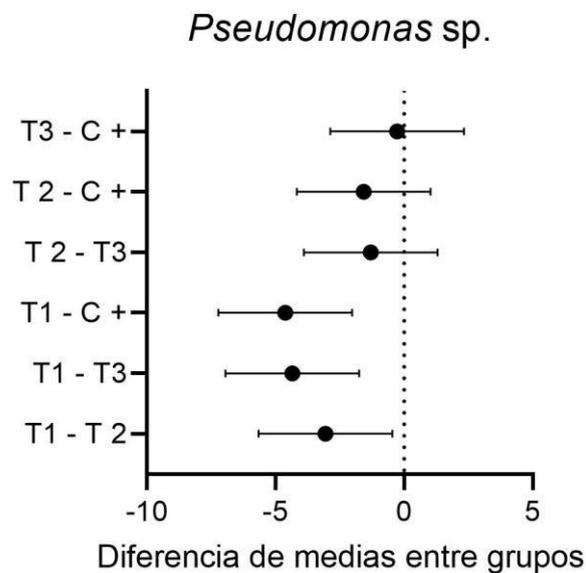


Figura 15: Test Tukey de *Pseudomonas* sp. comparación múltiple de tratamientos de *K. pinata*.

En la Figura 16 se presentan los resultados de los Tratamientos que se obtuvieron en la prueba de tukey para *K. pinnata* frente a *E.coli*. Los Tratamientos 1, 2 y 3 tuvieron un resultado diferente frente al control positivo, sin embargo, al comparar los Tratamientos 2 y 3 estos presentaron un comportamiento similar.

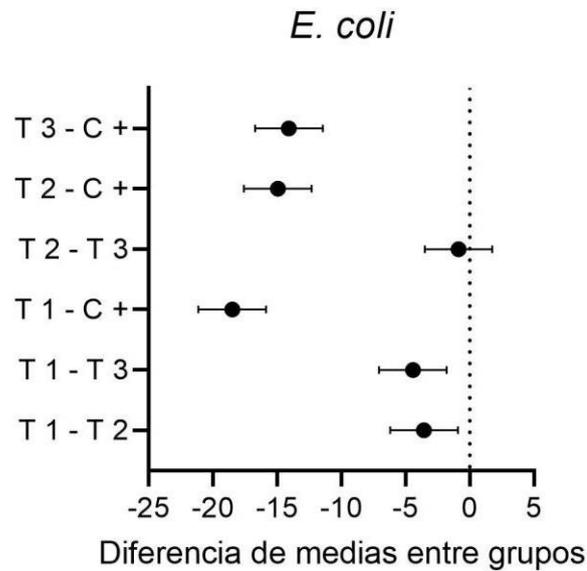


Figura 16: Test Tukey de *E. coli* comparación múltiple de tratamientos de *K.pinata*.

Los resultados obtenidos que se evidencian en la Figura 17 son los de el antagonismo entre *Fusarium sp.* y *K. pinata* al quinto día de inoculación. Al comparar el Tratamiento 1 frente a los Tratamientos 2, 3 y el control positivo se determinó que si hubo diferencias significativas. Por otro lado, los Tratamientos 2, 3 y el control positivo tuvieron resultados parecidos, por lo tanto, los tratamientos no manifestaron diferencia significativa.

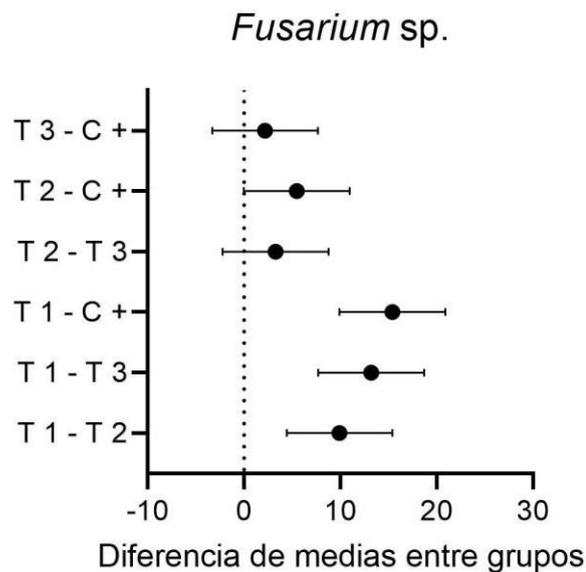


Figura 17: Test Tukey de *Fusarium sp* de 5 días comparación múltiple de tratamientos de *K.pinata*.

La Figura 18 manifiesta la evaluación del antagonismo entre *K. pinnata* y *Fusarium* sp. a los 10 días de inoculación. Al comparar el Tratamiento 1 con los Tratamientos 2, 3 y el control positivo se determinó diferencia significativa, mientras que los Tratamientos 2 y 3 no tienen diferencia significativa con respecto al control positivo.

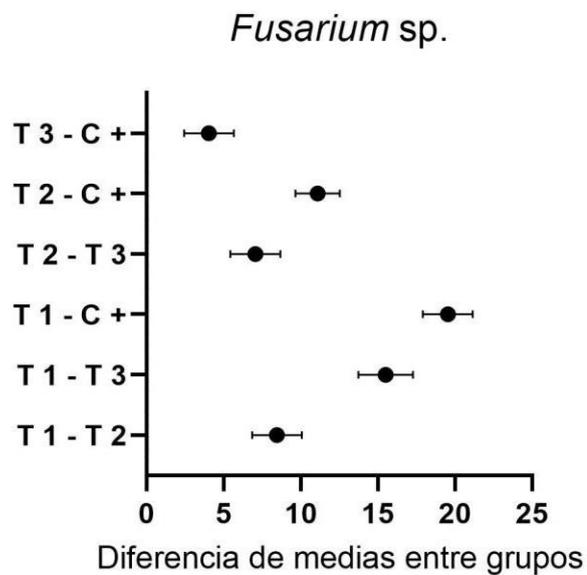


Figura 18: Test Tukey de *Fusarium* sp de 10 días comparación múltiple de tratamientos de *K.pinnata*

6 DISCUSIÓN

Vernonanthura patens

En el estudio fitoquímico se encontró que el contenido de flavonoides, taninos y antraquinonas fue abundante; mientras que los alcaloides y saponinas estuvieron ausentes, estos resultados coinciden con lo reportado por (P. Manzano et al., 2015; Palchicaza, 2019), es decir, que la presencia de estos metabolitos otorgaría a *V. patens* su propiedad antibacteriana y antifúngica.

El contenido total de flavonoides presentes en las hojas es de 681,2 mg CE/ g extracto y de fenoles con un total de 109.68 mg GAE/g extracto. Estos valores difieren con los presentados por Martínez (2017), que son 309,6 mg CE/ g extracto, sin embargo, en fenoles sus valores cercanos fueron de 232.74 mg GAE/g, en el presente trabajo se utilizó extracto etanólico a diferencia del estudio mencionado la evaluación fue realizada en extractos acuosos.

La presencia de flavonoides y taninos participan en la actividad antibacteriana, en este estudio se comprobó esto con *Pseudomonas* sp. (500 ppm) y *E.coli* (700ppm); esta información coincide con la presentada por (Palchicaza, 2019), sin embargo, la ausencia de saponinas difiere con los estudios realizados por (P. Manzano et al., 2012).

E. coli presentó una resistencia frente al extracto y a pesar de que hubo inhibición en la comparación con el antibiótico (cefotaxime) este superó por mucho al extracto se puede inferir que la resistencia de la cepa sea debido a la procedencia de la misma.

El porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp. fue de 47.90%, infiere por la presencia de fenoles, flavonoides, taninos y quinonas, esto se corrobora con estudios previos realizados por (P. Manzano, Miranda, Abreu-Payrol, et al., 2013; P. Manzano, Miranda, Orellana, et al., 2013) en estos también se presenta un porcentaje de inhibición el cual no coincide con los expuestos, sin embargo, esto se debe al solvente utilizado al momento de la

extracción, debido a que en los mencionados estudios se utilizó metanol y hexanol y en el presente estudio se realizó con el uso de etanol.

Kalanchoe pinnata

En el tamizaje fitoquímico de *Kalanchoe pinnata* se presentó cantidades abundantes de flavonoides, taninos, esteroides, las cantidades de saponinas y terpenoides son bajas, coincidiendo con los estudios realizados por (Ehwarieme et al., 2021; Kendeson et al., 2021; Tajudin & Asyikin, 2022), a pesar de que en la presencia de alcaloides difiere con el presente estudio, esto puede inferir debido a el lugar y tiempo de recolección.

El contenido alto de flavonoides, taninos, esteroides son comunes en el género *Kalanchoe*, el cual presentó actividad antibacteriana frente a *Pseudomonas* sp. (500mg /L), sin embargo, para *E. coli* (700 mg/L) a pesar de existir inhibición esta no es comparable frente al antibiótico (cefotaxime), debido a la gran diferencia que existe entre los tratamientos aplicados, estos resultados son similares a los presentados por (Singh et al., 2021), además se indica que su eficacia es mucho mejor en bacterias relacionadas con problemas cutáneos.

Las concentraciones de fenoles y flavonoides fueron de $75,75 \pm 0,13$ mg GAE /g de extracto y $195,9 \pm 2,83$ mg CE/ g de extracto totales difieren con los resultados expuestos por (Kendeson et al., 2021) esto podría ser causado por la época en la que se realizó la colecta de material vegetal, así como también de la concentración usada en el estudio.

La eficacia de *Kalanchoe pinnata* frente a *Fusarium* sp se ha realizado escasos estudios previos y se coincide con la eficacia del tratamiento, sin embargo, existen estudios en los que se han evaluado diferentes tipos de hongos tanto levaduriformes como *Candida albicans* y filamentosos como *Aspergillus niger*, de estos los resultados han sido positivos es decir el crecimiento del microorganismo se mantuvo controlado esto lo indican (Alifa & Pattewar, 2012; Kendeson et al., 2021; Zakharchenko et al., 2017).

7 CONCLUSIONES

La presencia de metabolitos secundarios de interés como flavonoides, fenoles, taninos, antraquinonas y esteroides, se los encontró en grandes cantidades el extracto que mejor efecto obtuvo fue el de *Vernonanthura patens*, la incidencia de compuestos activos, sin embargo, las saponinas no estuvieron presentes en este extracto, pero en el de *Kalanchoe pinnata* se presentó en concentraciones bajas.

El extracto con mayor cantidad de fenoles y flavonoides totales fue *V. patens* se infiere que esta es una de las razones por las que este extracto presenta actividad antibacteriana y el tratamiento más efectivo fue el de 700ppm, incluso más efectivo que el antibiótico (cefotaxime), frente a *Pseudomonas* sp.

En cuanto a las propiedades antifúngicas los extractos de *K. pinnata* y *V. patens*, fueron efectivos, se observó cómo el crecimiento de *Fusarium* sp. se mantuvo controlado, *V. patens* fue la que desde 500ppm de concentración mantuvo controlado el crecimiento, si la concentración aumenta la eficacia igual.

8 RECOMENDACIONES

Al mostrar *Vernonanthura patens* y *Kalanchoe pinnata* resultados efectivos se recomienda evaluarlas en el campo agrícolas ya que se puede utilizar como un sustituto de tratamientos antifúngicos y antibacterianos de síntesis química.

A pesar de que *Kalanchoe pinnata* presento propiedades antibacterianas y antifúngicas, se debería realizar más pruebas con concentraciones superiores a las estudiadas para estandarizar su eficacia.

Se sugiere realizar el aislamiento de metabolitos secundarios presentes en *V. patens* y *K. pinnata* con el fin de conocer sus funciones en el control de bacterias y hongos para las enfermedades de importancia agrícola.

9 REFERENCIAS

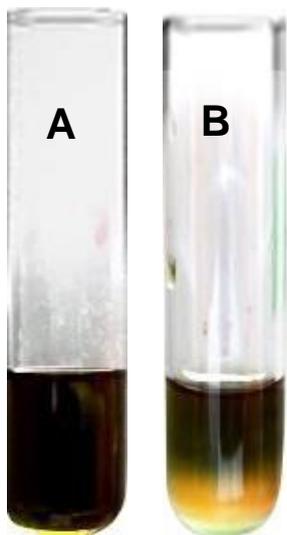
- Alifa, R. P., & Pattewar, S. v. (2012). *KALANCHOE PINNATA: PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL PROFILE*. 3(4), 993–1000. www.ijpsr.com
- Atanassova, M., Ribarova, F., & Marinova, D. (2005). Total phenolics and flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3).
<https://www.researchgate.net/publication/258769164>
- Badilla, B., Chavez, F., Poveda, L., Jiménez, S., & Rodríguez, G. (2006). *Efecto de plantas usadas etnomédicamente sobre la actividad hemorrágica y proteolítica inducida por Bothrops asper*.
- Calvopiña, G. (2010). *Determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de Kalanchoe pinnata (siempre viva)*.
- Cardozo, J., & Gomez, Miltón. (2018). Contribution to the phytochemical study of the ethanolic extract of the leaves of Kalanchoe daigremontiana Raym . - Hamet & H . Perrier. *Revista de La Asociacion Colombiana de Ciencias Biologicas*, 30, 74–83.
- Carrión, D., & Herrera, S. (2012). Ecuador rural del siglo XXI. In *Instituto de Estudios Ecuatorianos*.
- del Puerto, A. M., Suárez, S., & Palacio, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiologia*, 52(3), 372–387.
- Ehwarieme, D., Offuah, B., & Ilondu, E. (2021). EVALUATION OF THE PHYTOCHEMICAL AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF Kalanchoe pinnata AGAINST PLANT PATHOGENS ISOLATED FROM DISEASED PLANT PATHOGENS. *FUDMA JOURNAL OF SCIENCES*, 5(3), 310–314.
<https://doi.org/10.33003/fjs-2021-0503-755>
- Fournet, A., Barriosb, A. A., & Muiozb, V. (1994). Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 41).

- Gupta, M. P., Monge, A., Karikas, G. A., Lopez De Cerain, A., Solis, P. N., de Leon, E., Trujillo, M., Suarez, O., Wilson, F., Montenegro, G., Noriega, Y., Santana, A. I., Correa, M., & Sanchez, C. (1996). SCREENING OF PANAMANIAN MEDICINAL PLANTS FOR BRINE SHRIMP TOXICITY, CROWN GALL TUMOR INHIBITION, CYTOTOXICITY AND DNA INTERCALATION. In *International Journal of Pharmacognosy* (Vol. 34, Issue 1).
- Gutiérrez, Alberto., Quinchiguano, A. Belén., Cazco Logroño, C. Abdón., Ruíz Ibadango, F. Daniel., Conlago Farinango, H. Bayardo., Dobronski A., Jorge., Jaramillo J., Karla., Valle V., Luciano., Lanchimba S., Luis., Calvache U., Marcelo., Añazco Romero, Mario., & Tafúr R., J. Valdano. (2018). *Agricultura sostenible en ecuador* (Issue June).
- Kendeson, C. A., Kagoro, M. L., & Adelakun, E. A. (2021). PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF NIGERIAN KALANCHOE PINNATA (LAM.) STEM-BARK. In *J. Chem. Soc. Nigeria* (Vol. 46, Issue 4).
- Manzano, P. . I., Miranda, M., Paz, C., Abreu, J., Silva, M., & Hernández, V. (2012). Aislamiento y caracterización de la fracción hexánica de las hojas de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. con actividad antifúngica. *Revista Cubana de Farmacia*, 46(3), 352–358.
- Manzano, P. I., Miranda, M., Quijano, M. F., & Monzote, L. (2015). Advances in Studies of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. Growing in Ecuador. *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. <https://doi.org/10.5772/59866>
- Manzano, P., Miranda, M., Abreu-Payrol, J., Silva, M., Sterner, O., & Peralta, E. (2013). Pentacyclic triterpenoids with antimicrobial activity from the leaves of *Vernonanthura patens* (Asteraceae). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(7), 539–543. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i7.15989>
- Manzano, P., Miranda, M., Orellana, T., Silva, M., & Peralta, E. (2013). *Estudio Químico-Biológico de Vernonanthura patens, una planta silvestre ecuatoriana*.
- Manzano, P., Miranda, M., Quijano, M., & Monzote, L. (2015). Advances in Studies of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. Growing in Ecuador. In

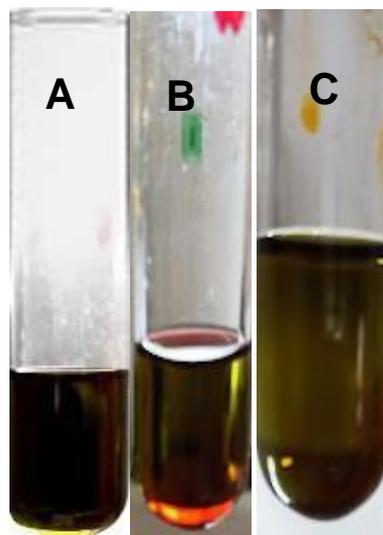
- Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*.
Intech. <https://doi.org/10.5772/59866>
- Manzano, P., Orellana, T., Miranda, M., Abreu, J., Ruíz, O., & Peralta, E. (2013). *Algunos parámetros farmacognósticos de Vernonthura patens (Kunth) H. Rob. (Asteraceae) endémica de Ecuador Some pharmacognostic parameters of native Vernonthura*. 18(1), 131–139.
- Manzano, P., Silva, M., Sterner, O., & Peralta, E. (2012). *Phytochemical Studies of Fractions and Compounds Present in Vernonthura Patens with Antifungal Bioactivity and Potential as Antineoplastic*.
www.intechopen.com
- Martinez, E. (2017). *DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE Vernonthura patens (Kunth) h. Rob (Asteraceae)*.
- OMS, & FAO. (2014). *Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas*. <https://doi.org/13604S/1/12.14>
- ORDOÑEZ, I. M. E., & CÁRDENAS, J. D. (2018). *Agricultura Orgánica. Trinidad de Bubuey*, 14–16. <https://doi.org/10.2307/j.ctv8j5kr.6>
- Palchicaza, M. (2019). *EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE Ilex guayusa (Loes), Vernonthura patens (Kunth) Y Theobroma cacao (Linneo) EN EL MODELO ANIMAL RATA (Rattus norvegicus) DE LABORATORIO*.
- Pérez, E. (2012). *Resumen Plaguicidas Botánicos : Una Alternativa a Tener. Fitosanidad*, 16, 51–59.
- Sazhina, N., Lapshin, P., Zagorskina, N., Korotkova, E., & Misin, V. (2014). *A comparative analysis of the antioxidant activity of Kalanchoe juices. Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 40(7), 771–776.
<https://doi.org/10.1134/S1068162014070152>
- Singh, H., Singh, A. P., & Singh, A. P. (2021). *A review on kalanchoe pinnata (Crassulaceae). Indian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 8(3), 182–188. <https://doi.org/10.18231/j.ijpp.2021.031>

- Tajudin, N., & Asyikin, I. (2022). Antimicrobial Activity of Kalanchoe Pinnata: A Review. *Malaysian Journal of Science Health & Technology*, 8(1), 31–37. <https://doi.org/10.33102/2022245>
- Valdés, E. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de Trichoderma como control biológico. *Proceedings of the 8th Biennial Conference of the International Academy of Commercial and Consumer Law*, 1(hal 140), 43.
- Weinstein, M. P., & Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (Vol. 30).
- Zakharchenko, N. S., Belous, A. S., Biryukova, Y. K., Medvedeva, O. A., Belyakova, A. v., Masgutova, G. A., Trubnikova, E. v., Buryanov, Y. I., & Lebedeva, A. A. (2017). Immunomodulating and Revascularizing Activity of Kalanchoe pinnata Synergize with Fungicide Activity of Biogenic Peptide Cecropin P1. *Journal of Immunology Research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3940743>

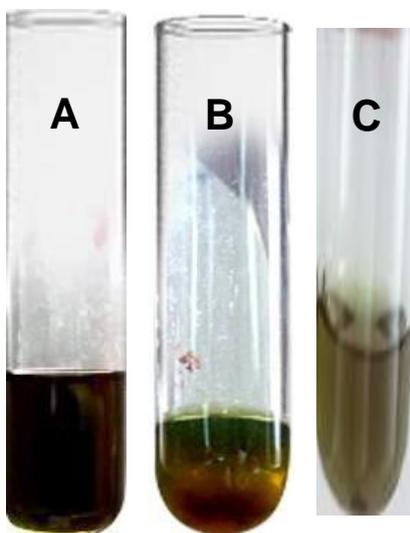
10 ANEXOS



Anexo 1:
Determinación de terpenoides: V. patens, Control (A), Prueba de Lieberma Bouchard (B)



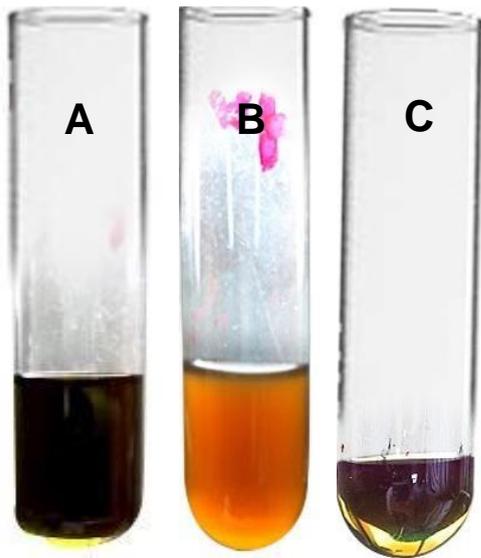
Anexo 2: *Determinación de alcaloides: V. patens, Control (A), Prueba de Dragendorff (B), Mayer (C).*



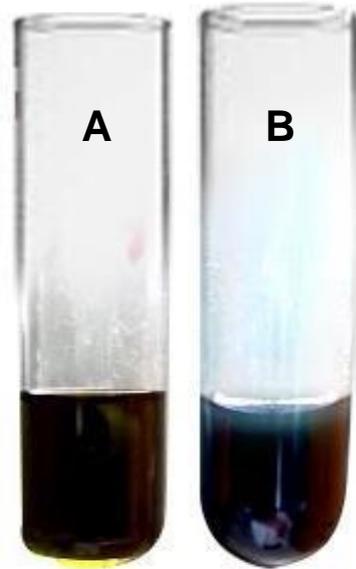
Anexo 3: *Determinación de flavonoides: V. patens, Control (A), Prueba de Na OH 10% (B), Prueba de Shinoda.*



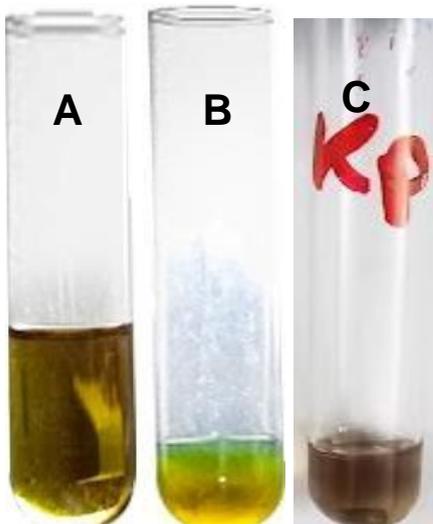
Anexo 4: *Determinación de esteroides: V. patens, Control (A), Prueba Salkowski (B)*



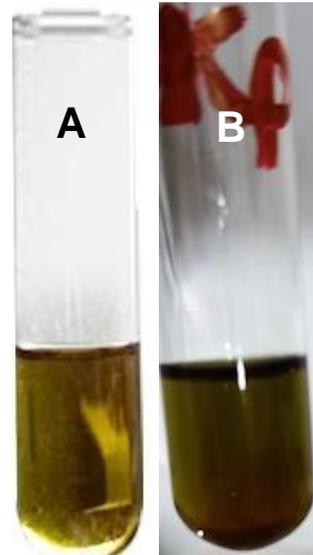
Anexo 5: Prueba de Antraquinonas: *V. patens*, Control (A), Prueba Bornträger (B), Prueba ácido sulfúrico (C)



Anexo 6: Determinación de taninos: *V. patens*, Control (A), Prueba cloruro férrico (B).



Anexo 8: Determinación de Flavonoides: *K. pinnata*, Control (A), Prueba de Na OH al 10%, Prueba de Shinoda



Anexo 7: Determinación de alcaloides: *K. pinnata*, Control (A), prueba de Dragendorff (B).



Anexo 9:
Determinación de taninos: K. pinnata, control (A), Prueba cloruro férrico (B).



Anexo 10:
Determinación de esteroides: K. pinnata, control (A), Prueba de Salkowski (B).



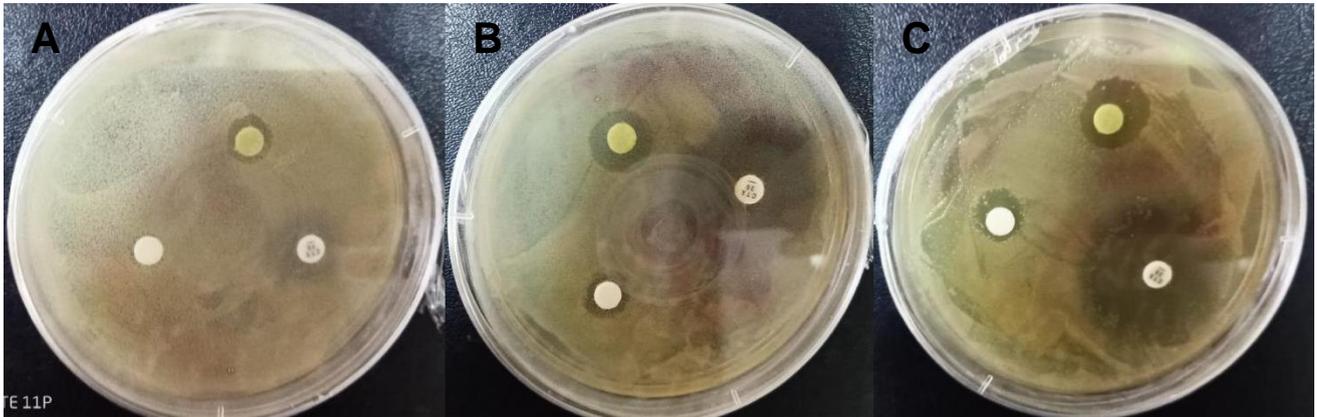
Anexo 9:
Determinación de Saponinas: K. pinnata, control (A), Prueba de espuma (B).



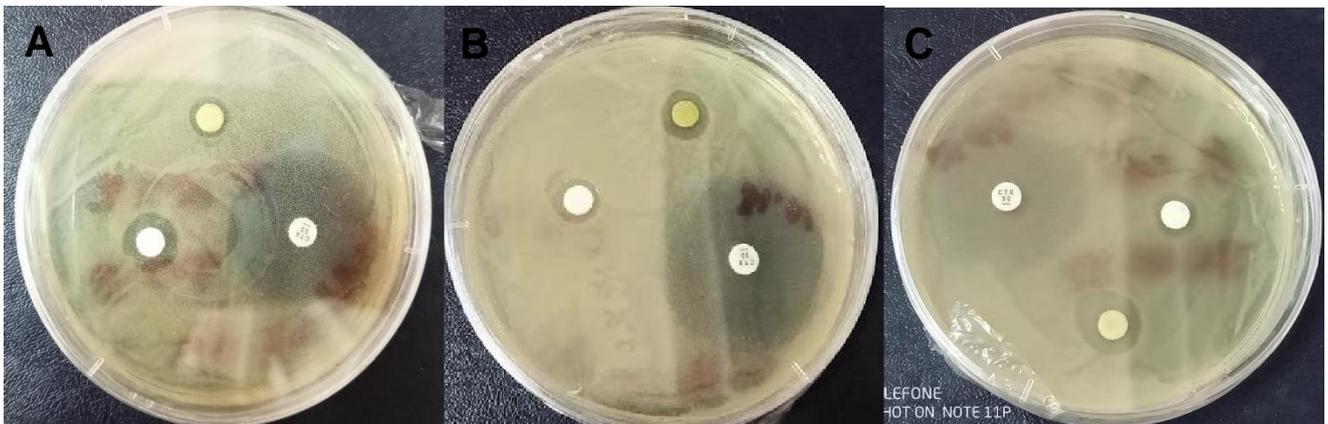
Anexo 12:
Determinación de triterpenos: K. pinnata, control (A), Prueba de Libieberman Bouchard (B).



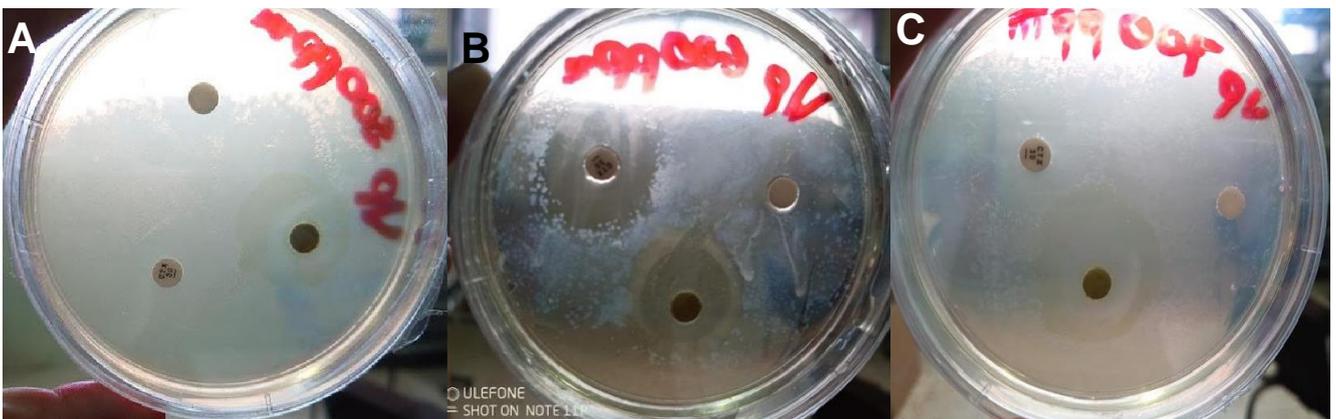
Anexo 11:
Determinación de antraquinonas: K. pinnata, control (A), Prueba de Brontager (B), Prueba de ácido sulfúrico (C).



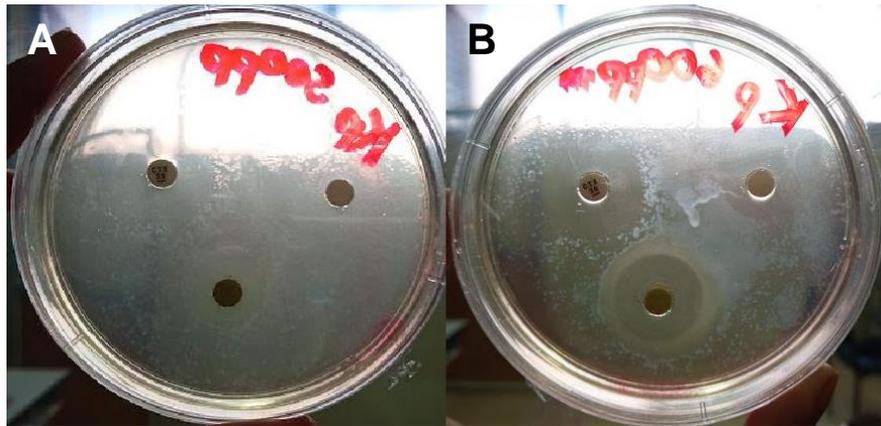
Anexo 13: Prueba antiactiniana *E. coli* :*V. patens* 500ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (B).



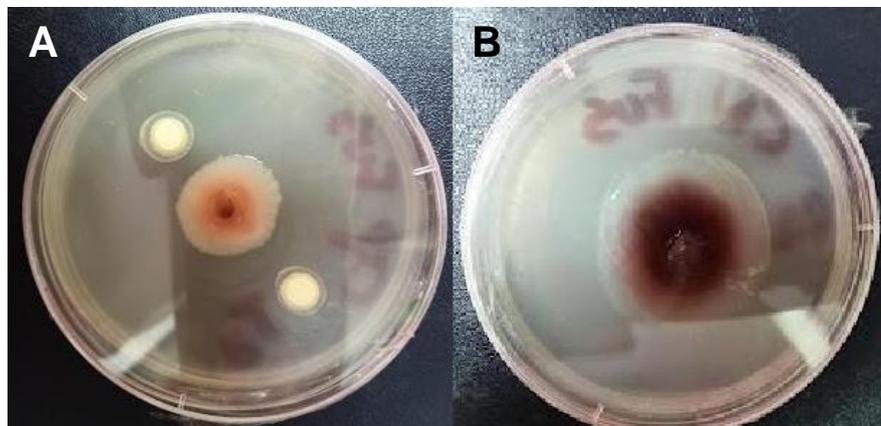
Anexo 15: Prueba antibacteriana *E. coli*: *K. pinnata* 500ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (C).



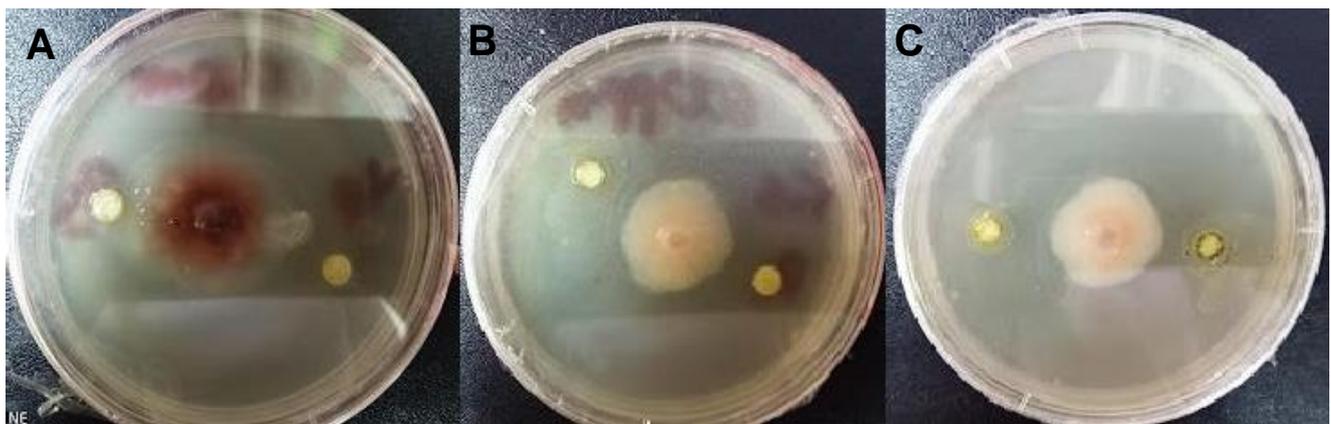
Anexo 14: Prueba antibacteriana *Pseudomonas* sp.: *V. patens* 500 ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (C).



Anexo 16: Prueba antibacterial *Pseudomonas* sp.: *K. pinnata* 500 ppm (A), 600ppm (B).



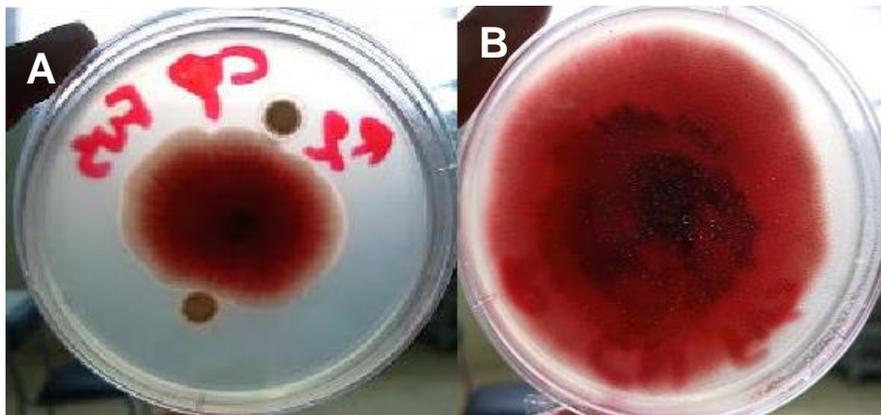
Anexo 17: Control Positivo (A), Control Negativo (B)



Anexo 18: *Fusarium* sp. *V. patens* 5 días, 500ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (C)



Anexo 19: *Fusarium* sp. *Kalanchoe pinnata* 5 días, 500ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (C)



Anexo 20: *Fusarium* sp. Control positivo (A), control Negativo (B)
10 días



Anexo 21: *Fusarium* sp. *V. patens* 10 días, 500ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (C).



Anexo 22: *Fusarium sp. K. pinnata* 10 días, 500ppm (A), 600ppm (B), 700ppm (C).