

***Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H. y su potencial uso como fuente de antioxidantes y colorantes naturales**

***Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H. and its potential use as a source of natural antioxidants and colorants**

Dr. Miguel A. Puertas Mejía, Lic. Julián Tobón Gallego, Dr. Víctor Arango

Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

RESUMEN

Introducción: la especie *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H. es una planta que presenta muy poca información sobre estudios de capacidad antioxidante, a pesar de su amplio uso en la medicina tradicional, lo cual presupone una fuente potencial de sustancias bioactivas con propiedades antioxidantes.

Objetivo: evaluar el potencial antioxidante de los extractos de hojas y flores de *Kalanchoe daigremontiana*.

Métodos: los extractos de hojas y flores se obtuvieron en metanol acidulado (HCl 10 % v/v) y su capacidad antioxidante se determinó sobre la base de los métodos del radical DPPH, del catión-radical ABTS y contenido de antocianinas totales.

Resultados: los extractos, tanto de hojas como flores, mostraron un potencial antioxidante promisorio ($EC_{50} = 4,2-4,4$ g extracto/mmol DPPH; 1,71-2,05 mmol Trolox/kg extracto). Adicionalmente se determinó la presencia en las flores de las antocianinas delphinidina, cianidina y pelargonidina.

Conclusiones: la *Kalanchoe daigremontiana* presentó efecto antioxidante significativo tanto en las hojas como en las flores, comparable con el mostrado por el ácido ascórbico. Se identificó de modo tentativo la presencia de delphinidina 3-O-glucósido, cianidina 3-O-glucósido y pelargonidina 3-O-glucósido en el extracto flores; por tanto la especie bajo estudio puede ser aprovechada como fuente de sustancias bioactivas para su aplicación como aditivos en la industria de alimentos, cosmética o farmacéutica.

Palabras clave: antioxidantes naturales, antocianinas, *Briofillum daigremontiana*, *Kalanchoe daigremontiana*, *Kalanchoe madagascar*, contenido de antocianinas totales.

ABSTRACT

Introduction: little information is available on the antioxidant capacity of the species *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H. However, its widespread use in traditional medicine points to its potential as a source of bioactive substances with antioxidant properties.

Objective: evaluate the antioxidant potential of extracts from *Kalanchoe daigremontiana* leaves and flowers.

Methods: leaf and flower extracts were obtained in acidulated methanol (HCl 10 % v/v), and their antioxidant capacity was gauged by DPPH and ABTS radical cation assay and total anthocyanin content determination.

Results: both leaf and flower extracts displayed promising antioxidant potential (EC_{50} = 4.2-4.4 g extract/mmol DPPH; 1.71-2.05 mmol Trolox/kg extract). Determination was also made of the presence of anthocyanins delphinidin, cyanidin and pelargonidin in the flowers.

Conclusions: *Kalanchoe daigremontiana* leaves and flowers displayed significant antioxidant capacity, comparable to that of ascorbic acid. The presence of delphinidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-glucoside and pelargonidin-3-O-glucoside was tentatively identified in the flower extract. Therefore, the study species may be used as a source of bioactive substances for use as additives in the food, cosmetic or pharmaceutical industry.

Key words: natural antioxidants, anthocyanins, *Briofillum daigremontiana*, *Kalanchoe daigremontiana*, *Kalanchoe madagascar*, total anthocyanin content.

INTRODUCCIÓN

La especie *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H. es una planta originaria de Madagascar, perteneciente a la familia Crasuláceas; ha sido catalogada como una especie invasiva en zonas desérticas de países como España, Puerto Rico, EE. UU., Australia, Sudafrica y Venezuela. También tiene los sinónimos *Kalanchoe madagascar*, *Briofillum daigremontiana*, y nombres comunes como espinazo del diablo, mala madre, madre de miles, entre otros. Esta especie puede llegar a medir 1,5 m de altura, sus flores son tubulares de color rojo-anaranjado que se agrupan en una inflorescencia tipo umbela, con plántulas en los bordes de las hojas. Por sus características invasivas inhibe la repoblación de plantas nativas y modifica la biología del suelo en zonas semi-áridas.^{1,2} Desde el punto de vista medicinal, diferentes especies de *Kalanchoe* (*pinnata*, *daigremontiana*, *brasilienses*) han presentado diversas actividades como son antitumoral, antihistamínica, antiinflamatoria e inmunomoduladora.³ La especie *K. daigremontiana* ha sido utilizada en la medicina tradicional contra diversas infecciones, como antiinflamatorio y en el tratamiento de varios tipos de cáncer, principalmente entre poblaciones nativas africanas y brasileras; aunque actualmente lo hacen muchas otras poblaciones a nivel mundial. *Supratman* y otros⁴ aislaron esteroides cardiotónicos bufadienólidos de *K. daigremontiana*, los cuales presentaron efectos inhibitorios sobre un tipo de virus (*Epstein-Barr*) que ataca los linfocitos B humanos y se asocia con el desarrollo de muchas clases de neoplasia. Además de su capacidad anticancerígena, estos compuestos esteroideos presentaron actividad insecticida contra las larvas del gusano de seda.⁵ Recientemente, *Kruck* y otros⁶

aislaron de las hojas de *K. daigremontiana* una nueva forma de vitamina E, los β -, γ -, δ -tocomonoenoles, y postularon su relación biosintética con tocoferoles y tocotrienoles. Adicionalmente, también se ha reportado la presencia de triterpenoides y de ácidos grasos de cadena larga.⁷

Teniendo en cuenta que en la actualidad se estima que alrededor de 80 % de los tratamientos médicos a nivel mundial usan la fototerapia como único tratamiento o tratamiento de apoyo, porque muchas de las enfermedades mencionadas se han asociado de manera directa o indirecta a un aumento de radicales libres en los organismos vivos (estrés oxidativo),⁸ el objetivo de la presente investigación consistió en evaluar el potencial de *K. daigremontiana* como fuente promisoría de sustancias bioactivas con propiedades antioxidantes.

MÉTODOS

Material vegetal

Hojas y flores de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. & H., se recolectaron por el botánico D.A. Giraldo-Cañas en la zona rural de la ciudad de Medellín-Colombia, a una altitud de 2 860 m sobre el nivel del mar y un espécimen fue depositado en el Herbario de la Universidad de Antioquia (voucher, HUA 083311).

Análisis fitoquímico

Se llevó a cabo la determinación de aminoácidos, leucoantocianinas, flavonoides, quinonas libres, alcaloides, triterpenoides, cardiotónicos y taninos de las hojas y sus extractos, de acuerdo con los métodos descritos por *Douhou* y otros.⁹

Obtención de los extractos

Extracto de hojas: el material vegetal fresco se sometió a liofilización y luego se pulverizó (2,02 g de hojas). Posteriormente, se desengrasó y se sometió a percolación con metanol a temperatura ambiente (25 °C) hasta agotamiento. El extracto obtenido (0,029 g, rendimiento 1,48 %) fue concentrado a sequedad y redisoluelto en etanol y conservado a 4 °C hasta los ensayos de capacidad antioxidante.

Extracto de flores: 1,02 g de flores previamente deshidratadas y maceradas se adicionaron a 25 mL de metanol acidulado (HCl 10,0 % v/v) y se sometió a agitación magnética durante 24 h protegido de la luz. Luego, el extracto se centrifugó a 1 500 rpm durante 5 min y el sobrenadante se rotaevaporó a sequedad. El extracto resultante (0,022 g, rendimiento 2,2 %) se redisolvió en 1,0 mL de metanol y se guardó a 4 °C hasta los análisis posteriores.

Obtención de antocianinas a partir de las flores: la purificación de las antocianinas se realizó sobre la base del método descrito en *Segura-Carretero* y otros,¹⁰ con ligeras modificaciones; 1,0 g de flores previamente deshidratadas y maceradas se mezclaron con 50 mL de metanol acidulado (HCl 10,0 % v/v), y se dejaron en agitación magnética por 24 h. La solución resultante se filtró (PTFE 0,45 μ m) y se mezcló con 1,0 g de amberlita XAD7HP (20-60 Mesh), y se agitó por 24 h para garantizar máxima absorción de antocianinas. La amberlita se adicionó en una columna de vidrio (42 cm x 1 cm). Luego, la solución con antocianinas se vertió en la columna y después se realizaron lavados con agua microfiltrada hasta

decoloración de la solución. Las antocianinas retenidas se eluyeron con una solución de metanol acidulado 11 % (v/v) y el extracto obtenido se rotoevaporó a presión reducida y 30 °C hasta sequedad. El extracto final se redisolvió en 1,0 mL de metanol, se filtró (PTFE 0,45 µm) y se conservó en refrigeración hasta el análisis por espectrometría de masas (inyección directa).

Evaluación de la capacidad antioxidante

Contenido de antocianinas totales (TAC): se determinó de acuerdo con el método de diferencial de pH,¹¹ con algunas modificaciones. Brevemente, una alícuota de la muestra (c.a. 1,0 mg) se colocó en un balón volumétrico de 25 mL y se ajustó el volumen con una solución *buffer* de pH 1,0 (ácido clorhídrico/cloruro de potasio, 0,025 M). De manera similar otra alícuota de la muestra se colocó en un balón volumétrico de 25 mL y se ajustó el volumen con una solución *buffer* de pH 4,5 (ácido acético/acetato de sodio 0,4 M). Después de transcurridos 40 min de reacción en cada uno de los balones, la absorbancia se midió a 510 y 700 nm. La absorbancia final se calculó sobre la base de la expresión:

$$\text{Abs} = [(A_{510} - A_{700}) \text{ a pH } 1.0] - [(A_{510} - A_{700}) \text{ a pH } 4.5]$$

y el TAC se halló usando la ecuación:

$$\text{TAC (mg/L)} = (\text{Abs} \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1\ 000) (\epsilon \times 1)$$

Donde, Abs es la absorbancia, PM el peso molecular (449,2) para la cianidin-3-glucósido, FD, el factor de dilución y ϵ , la constante de absorptividad molar (26,900). El resultado se expresó como mg por litro de cianidin-3-glucósido. Todos los valores de TAC se normalizaron como contenido de cianidin-3-glucósido. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Ensayo del radical estable DPPH: la capacidad antioxidante de cada extracto en diferentes concentraciones se determinó de acuerdo con la metodología descrita por *Puertas-Mejía* y otros,¹² con pequeñas modificaciones. En resumen, una alícuota (50 µL) del extracto diluido en metanol (1:5 000) se adicionó a 2,5 mL de una solución etanólica de DPPH (73,5 µM). Inmediatamente después, se midió la absorbancia a 514 nm y luego cada 15 s, los primeros 2 min, luego cada 30 s hasta los 5 min y, finalmente, en intervalos de 5 min hasta la obtención del estado estacionario en la reacción o una disminución en la absorbancia menor que 10 %. La concentración inicial exacta del DPPH en el medio de reacción se determinó mediante una curva de calibración de soluciones de DPPH (2,5 a 100 µM; ecuación de la recta: concentración = 98,542x + 2,7775; R² = 0,9994) medidas a 514 nm. Como sustancia de referencia se usó el ácido en diferentes concentraciones, en dependencia de la actividad de estas sustancias. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Ensayo del catión-radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulphonic ácido) (ABTS): se determinó de acuerdo con la metodología descrita por *Mesa-Vanegas* y otros,¹³ con algunas modificaciones. El catión radical ABTS^{•+} se obtuvo por reacción de 38,2 mg de ABTS con 7,2 mg persulfato potásico disueltos en 10 mL de agua desionizada durante 24 h en cuarto oscuro. El radical ABTS^{•+} formado se diluyó con agua destilada hasta obtener la solución de trabajo con una absorbancia de 0,76 (± 0,020), a una longitud de onda de 734 nm. Luego, a 2,4 mL de la solución de ABTS^{•+} se adicionaron 50 µL del extracto diluido en agua (1:40) y la absorbancia de la solución se midió a los 6 min de reacción. Como sustancia de referencia se usó el Trolox (ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), en un rango de concentración de 0,2 a 2,0 mM, usando como solvente metanol. Como sustancia de

referencia se empleó el ácido ascórbico, siguiendo la misma metodología llevada para los extractos. Los resultados se expresaron en términos de TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox).

Análisis por espectrometría de masas: el extracto de flores purificado se analizó por infusión directa en un MS Agilent Technologies 6300 Series con trampa de iones (*Ion Trap MS System*), en un rango masas de 200 a 800 m/z, el voltaje del capilar de 2 200 v en modo positivo con la fuente de ionización ESI. La identificación de las antocianinas se realizó por comparación de los espectros de masas obtenidos con las bases de datos de la literatura.

Análisis estadístico: los valores mostrados en las tablas corresponden al promedio \pm las desviaciones estándares de tres mediciones en paralelo. Los datos de la EC₅₀ y TEAC se calcularon a partir de curvas de calibración. La evaluación estadística se realizó mediante ANOVA (Microsoft Excel 2010) con un nivel de significancia de $p < 0,001$.

RESULTADOS

La determinación fitoquímica (tabla 1) de las hojas de la planta, mostró la presencia de compuestos fenólicos y alcaloides, con una significativa cantidad de taninos y leucoantocianidinas.

Tabla 1. Análisis fitoquímico de las hojas de *Kalanchoe daigremontiana*

Familia de compuestos	Presencia
Aminoácidos	+
Taninos	+
Flavonoides	D
Triterpenoides	D
Cardiotónicos	D
Alcaloides	+
Leucoantocianidinas	+

+: presente; D: mínimo nivel detectado.

En la tabla 2 se muestra la capacidad antioxidante, medida como la habilidad que presentaron los compuestos presentes en los extractos para secuestrar los radicales libres estables DPPH y ABTS.

Mediante espectrometría de masas se consiguió caracterizar de manera tentativa 3 antocianinas mayoritarias en las flores, a través de la comparación de los espectros de masas obtenidos experimentalmente con datos espectroscópicos de la bibliografía (tabla 3).

Tabla 2. Capacidad antioxidante en hojas y flores de *Kalanchoe daigremontiana*

Extracto	EC ₅₀ , g ext/mmol DPPH	TEAC, mmol Trolox/kg ext	TAC, mg/L cianidina-3- glucósido
Hojas	4,20 ± 0,0a	2,05 ± 0,0c	-
Flores	4,40 ± 0,0b	1,71 ± 0,0d	32,7 ± 0,0
Ácido ascórbico	2,2 ± 0,1	-	-

TEAC: actividad antioxidante equivalente a Trolox, TAC: contenido de antocianinas totales. Cada letra (a ,b, c, d) representa diferencias significativas (ANOVA, factor simple, p< 0,001).

Tabla 3. Identificación tentativa de antocianinas mayoritarias en las flores de *Kalanchoe daigremontiana*

Antocianina	[M] ⁺ (m/z)	(m/z) Aglicona
Delfinidina 3-O-glucósido	465	303
Cianidina 3-O-glucósido	449	287
Pelargonidina 3-O-glucósido	433	271

DISCUSIÓN

Las especies del género *Kalanchoe* han sido plantas de marcado interés en el campo etnomedicinal, debido a sus efectos terapéuticos que son aprovechados para el tratamiento de reumatismo, inflamaciones, entre otras afecciones.¹⁴ En términos generales se observó un elevado efecto antioxidante tanto en las hojas como en las flores, comparable con el ácido ascórbico. Este resultado corresponde al esperado, porque la presencia de compuestos polifenólicos detectados en el análisis fitoquímico puede potencializar ese efecto en este tipo de matriz.

Por otro lado, la presencia de color violeta intenso de las flores suponía un alto contenido de antocianinas y que la especie *K. daigremontiana* podría ser una fuente potencial de colorantes y antioxidantes naturales. Se identificaron 3 antocianinas mayoritarias en las flores (tabla 3).

Sobre la base de los resultados de la actividad antioxidante reportados en esta investigación para la especie *K. daigremontiana*, y la presencia de taninos, flavonoides, triterpenoides y las antocianinas, se puede sugerir que la capacidad encontrada tanto en el extracto de hojas como en flores, puede estar relacionada a un efecto sinérgico entre las diferentes familias de compuestos previamente detectados. De modo adicional, la presencia de derivados de la vitamina E (β -, γ -, y δ -tocomonoenoles) identificados de forma preliminar en las hojas de la misma especie,⁶ también afectará de modo positivo esas propiedades antioxidantes como se ha demostrado anteriormente en una,¹² en el cual la presencia de compuestos polifenólicos en extractos vegetales incrementa ese efecto.

Por otro lado, el contenido de antocianinas determinado en las flores de *K. daigremontiana* fue alto (32,7 mg/L cianidina-3- glucósido) comparado con el reporte de Lee y otros¹⁵ en frutos rojos (13,1-59,2 mg/L cianidina-3- glucósido), matrices

ampliamente reconocidas por sus propiedades antioxidantes. Por esa razón, los resultados de esta investigación plantean la posibilidad de la utilización de la planta bajo estudio como una fuente importante de colorantes y antioxidantes naturales. La identificación de las antocianinas descritas en este trabajo fue comparable con los resultados reportados por *Nielsen* y otros¹⁶ en flores de la especie *K. blossfeldiana*, quienes identificaron la presencia de diglucósidos de pelargonidina, cianidina, y delfinidina, entre otras. Luego, sobre la base de los resultados se puede proponer al género *Kalanchoe* como una fuente vegetal importante de estas sustancias y que el potencial antioxidante reportado es una contribución sinérgica de estas.

Finalmente, el alto contenido de antocianinas encontrado en las flores de *K. daigremontiana*, reconocidos pigmentos naturales que imparten colores a las plantas para realizar diversas funciones, le da un valor agregado adicional a ese género. Esto representa una matriz potencialmente competitiva como reemplazo de colorantes sintéticos en diferentes productos de consumo humano como son alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos.

Se concluye que la *K. drageimontiana* posee alto efecto antioxidante tanto en las hojas como en las flores, comparable con el ácido ascórbico. Se identificó de modo tentativo la presencia de delfinidina 3-O-glucósido, cianidina 3-O-glucósido y pelargonidina 3-O-glucósido en el extracto de flores; por tanto, la especie bajo estudio puede ser aprovechada como fuente de sustancias bioactivas para su aplicación como aditivos en la industria de alimentos, cosmética o farmacéutica.

Este es el primer estudio basado en la evaluación de la capacidad antioxidante reportado para la especie *K. drageimontiana*, conocido hasta ahora por los autores.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Antioquia. Todos los experimentos se realizaron bajo las normas y leyes colombianas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Herrera I, Nassar JM. Reproductive and recruitment traits as indicators of the invasive potential of *Kalanchoe daigremontiana* (Crassulaceae) and *Stapelia gigantea* (Apocynaceae) in a Neotropical arid zone. *J Arid Environments*. 2009;73(11):978-86.
2. Herrera I, Hernandez M-J, Lampo M. Plantlet recruitment is the key demographic transition in invasion by *Kalanchoe daigremontiana*. *Population Ecology*. 2012;54(1):225-37.
3. Tkalec M, Car D, Gospoèiæ J. Response of *Kalanchoe daigremontiana* to wounding and infection with *Agrobacterium tumefaciens*. *Periodicum Biologorum*. 2012;114(1):83-9.
4. Supratman U, Fujita T, Akiyama K. Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. Daigremontiana* × *tubiflora*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 2001;65(4):947-9.
5. Supratman U, Fujita T, Akiyama K. Insecticidal compounds from *Kalanchoe daigremontiana* × *tubiflora*. *Phytochemistry*. 2011;58(2):311-4.

6. Kruk J, Pisarski A, Szymańska R. Novel vitamin E forms in leaves of *Kalanchoe daigremontiana* and *Phaseolus coccineus*. *J Plant Physiology*. 2011;68(17):2021-7.
7. Van Maarseveen C, Jetter R. Composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on *Kalanchoe daigremontiana* (Hamet et Perr. de la Bathie) leaves. *Phytochemistry*. 2009;70(7):899-906.
8. Firoozrai M, Nourbakhsh M, Razzaghy-Azar M. Erythrocyte susceptibility to oxidative stress and antioxidant status in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Research Clinical Practice*. 2007;77(3):427-32.
9. Douhou N, Yamni K, Tahrouch S. Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine, *Thymelaea Lythroides*. *Bull Société Pharmacie Bordeaux*. 2003;142(1-4):61-78.
10. Segura-Carretero A, Puertas-Mejía MA, Cortacero-Ramírez S. Selective extraction, separation, and identification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. using solid phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry (time-of-flight/ion trap). *Electrophoresis*. 2008;29(13):2852-61.
11. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study *J AOAC International*. 2005;88(5):1269-78.
12. Puertas-Mejía MA, Hillebrand S, Stashenko E. *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour Fragrance J*. 2002;17(5):380-4.
13. Mesa-Vanegas AM, Gaviria CA, Cardona F. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Rev Cubana Plant Med*. 2010;15(2):13-26.
14. Costa SS, Muzitano MF, Camargo LMM. Therapeutic potential of *Kalanchoe* species: Flavonoids and other secondary metabolites. *Natural Product Communications*. 2008;3(12):2151-64.
15. Lee J, Rennaker C, Wrolstad RE. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*. 2008;110(3):782-6.
16. Nielsen AH, Olsen CE, Møller BL. Flavonoids in flowers of 16 *Kalanchoe blossfeldiana* varieties. *Phytochemistry*. 2005;66(24):2829-35.

Recibido: 20 de abril de 2013.

Aprobado: 20 de julio de 2013.

Miguel A. Puertas-Mejía. Grupo de Investigación en Compuestos Funcionales. Instituto de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquia. A.A. 1226, Medellín, Colombia. Teléf.: +57(4) 219 5653; Fax +57(4) 219 8612. Correos electrónicos: mpuertas@exactas.udea.edu.co; mianpume07@gmail.co
