

## Bioactividad de extractos de seis especies vegetales nodrizas de bosques de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) de Ixchiguán, San Marcos, Guatemala

*Bioactivity of extracts from six nurse plants species from fir (Abies guatemalensis Rehder) forests from Ixchiguan, San Marcos, Guatemala*

Stella Cruz-Bolaños<sup>1\*</sup>, Deyling Maldonado-de León<sup>1</sup>, José V. Martínez-Arévalo<sup>2</sup>, Armando Cáceres<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y <sup>2</sup>Sub-área de Ciencias Biológicas, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC), Guatemala.

\*Autor al que se dirige la correspondencia: stella.1986@hotmail.com

Recibido: 11 de enero 2018 / Revisión: 08 de mayo 2018 / Aceptado: 12 de junio 2018

### Resumen

Plantas nodrizas son aquellas especies vegetales útiles para la sobrevivencia y convivencia de otras especies. *Abies guatemalensis* Rehder (pinabete), es una especie endémica en peligro de extinción y para asegurar su sobrevivencia es necesario estudiar sus plantas nodrizas. Se colectaron seis especies de plantas nodrizas provenientes de bosque Los Cuervos, Ixchiguán, San Marcos, se secaron a la sombra en un horno, hasta obtener un porcentaje de humedad < 10%. Se obtuvieron extractos etanólicos por percolación y concentración empleando rotavapor; los aceites esenciales fueron extraídos por hidrodestilación con Neoclevenger. Para los análisis de actividad biológica se realizaron ensayos contra bacterias, hongos, levaduras, larvas de insectos, nauplios de *Artemia salina* y actividad antioxidante. Los aceites esenciales presentaron un porcentaje de rendimiento < 0.3%. Cinco de los seis extractos etanólicos demostraron baja actividad antimicrobiana y larvicida (CIM: 1 mg/mL). Respecto a la actividad antioxidante por DPPH, *Acaena elongata* (CI<sub>50</sub> de 0.21 [0.019, 0.23] mg/mL) y *Rubus trilobus* (CI<sub>50</sub> 0.32 [0.31, 0.33] mg/mL) presentaron los mejores resultados y *Buddleja megalcephala* (CI<sub>50</sub> 0.75 [0.72, 0.77] mg/mL) presentó actividad moderada. Estos hallazgos estimulan a continuar la investigación de plantas nodrizas para identificar las moléculas responsables de la actividad antioxidante y definir su posible aplicación como antioxidantes para la prevención o tratamiento de patologías humanas o para la preservación de alimentos o uso cosmético, permitiendo que las comunidades conserven y aprovechen de manera sostenible dichas especies.

Palabras claves: *Acaena elongata*, *Rubus trilobus*, *Buddleja megalcephala*, antioxidantes

### Abstract

Nurse plants are species useful for the survival and coexistence of other plants. *Abies guatemalensis* Rehder (fir) is an endemic species in danger of extinction and in order to ensure its survival, it is necessary to study their nurse plants. Six species of nurse plants were collected from Los Cuervos forest, Ixchiguán, San Marcos, they were dried in the shade and in an oven until a moisture content < 10% was obtained. Ethanol extracts were obtained by percolation followed by concentration in rotavapor; essential oils were obtained by hydrodistillation with Neoclevenger. Assays for biological activity were established against bacteria, fungi, yeasts, insect larvae, nauplii of *Artemia salina* and antioxidant activity. The essential oils yields were < 0.3%. Extracts have little antimicrobial and larvicidal activity with a MIC 1 mg/mL of the ethanol extracts. The free radical trapping activity assay evaluated by DPPH, yielded good results: *Acaena elongata* (IC<sub>50</sub> of 0.21 [0.019, 0.23] mg/mL) and *Rubus trilobus* (IC<sub>50</sub> 0.32 [0.31, 0.33] mg/mL) and moderate activity in *Buddleja megalcephala* (IC<sub>50</sub> 0.75 [0.72, 0.77] mg/mL)). These findings stimulate research on nurse plants to identify the molecules responsible for the antioxidant activity and to define its possible application for the prevention or treatment of human pathologies or for the preservation of food or cosmetic use, allowing the communities to preserve and take advantage on a sustainable way.

Keywords: *Acaena elongata*, *Rubus trilobus*, *Buddleja megalcephala*, antioxidants

## Introducción

En la regeneración natural de los bosques el papel de algunas especies vegetales es muy importante para el establecimiento y desarrollo de otras especies que las sucederán. Estas especies son conocidas como plantas nodrizas por el papel que cumplen al cuidar de las especies arbóreas durante sus primeras fases. Una planta nodriza ofrece protección a sus plántulas o a las de otras especies de alta radiación, nutrientes, humedad y herbivoría (Martínez, 2011). Son especies que modifican las condiciones microclimáticas, generando micrositios más beneficiosos para las plantas, por lo que las especies que crecen asociadas a las nodrizas están mejor que cuando crecen solas. Bajo la sombra de una planta nodriza, incluyendo árboles, las temperaturas del aire y del suelo son menos extremas y la humedad de las capas superficiales del suelo tiende a permanecer a menor profundidad. Las plantas pueden ejercer fuertes efectos positivos directos o indirectos hacia otras especies. Por ejemplo, se ha demostrado que *Pinus monophylla* Torr. & Frém, es ayudado por *Artemisia tridentata* Nutt. (Callaway, de Lucia, Moore, Nowak, & Schlesinger, 1996), especies de *Lupinus* son nodrizas de *Pinus harwegii* Lindl. (Ramírez-Contreras, & Rodríguez-Trejo, 2009) y la cubierta arbustífera facilita la sobrevivencia de especies de *Quercus* en el sur de México (Rivas-Rivas, Ramírez-Marcial, Perales, Levy-Tacher, & Bonfil, 2017).

Los arbustos que fungen como plantas nodrizas reducen el alcance de la radiación solar en el suelo, y por tanto, la temperatura y la evaporación del agua son menores. Estas condiciones generan que el crecimiento bajo éste dosel sea mucho más benigno que crecer fuera de él; los arbustos actuarían como “nodrizas” para el resto de las especies que crecen asociados a ellos. Esto proporciona sitios menos estresantes para individuos de otras especies. De la misma manera, se facilitaría el proceso de recuperación de sitios degradados y pueden servir para proteger individuos de su misma especie (Elqui Semanario, 2012).

Un creciente número de evidencias experimentales indican que la proximidad entre plantas puede ser beneficiosa en ambientes dominados por estrés. En estas condiciones, la supervivencia de plántulas y plantones situados bajo la copa de un matorral pueden aumentar gracias al incremento de la humedad del suelo. Por lo que, el uso de matorrales como plantas nodrizas aumenta la tasa de supervivencia de los plantones (Castro, 2004).

Ejemplos recientes del uso de plantas nodrizas en la restauración de bosques incluyen el caso de tierras áridas degradadas reforestadas con especies nativas en el sur de California (Moreno, de-Bashan, Hernández, López, & Bashan, 2017); el efecto de la diversidad de árboles en la reforestación en condiciones de disturbios naturales (Jactel et al., 2017); el uso de nodrizas en la restauración de *Pinus albicaulis* Engelm. en condiciones de cambio climático (Keane, Holsinger, Mahalovich, & Tomback, 2017); las plantas nodrizas para restaurar ecosistemas en los que se vertieron desechos mineros (Navarro, Cano, Berdú, & Goberna, 2017); y, la preparación y facilitación de plantas nodrizas para restauración de ecosistemas forestales subárticos (Thiffault & Hébert, 2018).

Los ambientes de alta montaña son muy estresantes para la sobrevivencia y reproducción de las plantas. Las principales características de estos hábitats son las bajas temperaturas del aire y del suelo, los fuertes vientos y la inestabilidad del sustrato, la escasez de nutrientes y la corta duración del período favorable para el crecimiento. Produciendo una serie de limitaciones en el proceso reproductivo de las plantas que abarcan aspectos tan variados como trastornos en la producción de flores, disminución en el servicio de polinización y en la producción de semillas viables. El establecimiento exitoso de plántulas es un proceso poco común en ambientes de alta montaña. Esto se debe a la alta mortalidad de las plántulas producto de las temperaturas congelantes del aire, a la inestabilidad del sustrato y la escasez de nutrientes en el suelo (Cavieres, Peñaloza, Pápic, & Tambutti, 1998).

El pinabete es una especie de conífera perteneciente a la familia *Pinaceae*, nativa de Centroamérica, se encuentra en el sur de México y norte de Centroamérica. Debido a la pérdida de su hábitat, se considera como especie en peligro de extinción (Bailey, 1976; Breedlove, 1986). La tala inmoderada para comercio ilegal (Andersen, Córdova, Nielsen, & Kollmann, 2008), hace que este sea un factor que complica su crecimiento y reproducción.

El pinabete es un árbol siempre verde, de hasta 45 m de altura y hasta 1.5 m de diámetro y forma simétrica. La corteza posee placas no muy pronunciadas, color castaño, grisáceo o rojizo. La copa es de forma piramidal o cónico-oblonga. Las hojas ascendentes son lineares, brillantes y verde oscuras en el haz y plateadas en el envés; miden 3 cm de largo, dispuestas en forma de espiral, con la apariencia de estar colocadas en dos filas, con canales resiníferos (Salazar, Soihet, & Méndez, 2000).

La madera es blanca hacia la albura, con tonalidades rojizas o rosadas hacia el duramen, posee grano recto, fácil de hendir, flexible, medianamente dura, fuerte y de limitada resistencia a la intemperie. Se utiliza para fabricación de telares, forros interiores, techos para construcciones rurales, leña y carbón. Su pulpa es apreciada para papel. Su uso principal es para decorar iglesias y como árbol navideño. En lugares altos la especie soporta temperaturas bajo cero, la temperatura en los sitios de mayores poblaciones fluctúa entre 9 y 10°C. Se le encuentra en suelos con ceniza volcánica, con texturas franco turboso, franco arcilloso o franco arenosos, pero con altos contenidos de materia orgánica. Se distribuye naturalmente desde el sur de México hasta Guatemala, Honduras y algunas partes altas de El Salvador. Normalmente se encuentra asociado con pino blanco (*Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schldtl.), ocote (*Pinus rudis* Endl.) y ciprés (*Cupressus* spp.) (Salazar et al., 2000).

El pinabete generalmente se adapta a suelos profundos bien drenados con contenido de materia orgánica de 2.5 a 5%; con un pH de 5.4 a 5.7, aunque puede crecer en suelos con pH entre 6.0 a 6.5; con horizontes del subsuelo de arcilla arenosa con capacidad de intercambio catiónico menor de 15 meq/100 cc (Martínez, 2011).

La especie es nativa de Guatemala y de crecimiento específico en la región montañosa (endémica) donde tiene una distribución natural. Geográficamente se circunscribe a los departamentos de Totonicapán, Quetzaltenango, San Marcos, Huehuetenango, Quiché, Zacapa (Sierra de la Minas) y Jalapa (Cerro Miramundo). Se localiza en zonas de Bosque muy húmedo Montano Subtropical, Bosque muy húmedo Montano Bajo Subtropical y Bosque húmedo Montano Bajo Subtropical, en temperaturas que oscilan entre los 3 y 10°C (Consejo Nacional de Áreas Protegidas, 2008).

El departamento de San Marcos se encuentra situado en la región suroccidental de Guatemala, se caracteriza por un clima generalmente templado, aunque posee una variedad de climas debido a su topografía (Godfrey & Collins, 1987).

Los bosques de pinabete en Ixchiguán y el resto de San Marcos, presentan un clima de templado a frío, con temperatura media anual de 15°C, que llega a descender por la noche por debajo de los 0°C, presentándose heladas, sobre todo de noviembre a marzo. La temperatura es un factor clave en la ecología de la especie. En los meses de julio y agosto de 2012 se efectuó el levantamiento de información vegetal en

10 localidades a través de cinco estadios sucesionales (Martínez, 2014).

En los estudios anteriores se encontraron varias especies con valor como nodrizas de las que se conoce muy poco sobre su manejo para utilizarlas más ampliamente, tales como *Acaena elongata* L., *Baccharis vaccinioides* Kunth, *Buddleja megalcephala* Donn. Sm., *Holodiscus argenteus* (L.) Maxim., *Lupinus ehrenbergii* Schldtl., *Robus trilobus* Thunb., *Stevia polycephala* Bertol. y *Symphoricarpos microphyllus* Kunth. Estas y otras especies arbustivas, permiten altos prendimientos de plántulas de pinabete, lo que se demuestra con prendimientos mayores del 80% en plantaciones establecidas bajo plantas nodrizas (Mazariegos, 2012).

El objetivo de este estudio es demostrar la posible bioactividad de estas especies para concientizar sobre su uso y así poder exhortar a la población de áreas aledañas a su conservación, lo cual permitirá que su cuidado preserve mejor la diversidad y por ende el pinabete.

## Materiales y métodos

### Materiales

**Colecta, secado y molienda.** Se colectaron cuando menos tres individuos de seis especies vegetales nodrizas a finales de la época seca, provenientes del bosque Los Cuervos, Ixchiguán, San Marcos, que se encuentra entre las coordenadas 15° 10' 03" a 15° 14' 53" latitud norte y 91° 17' 18" y 91° 59' 23" longitud oeste entre 3,000 a 3,500 m.snm. Las especies colectadas son: *A. elongata*, *B. vaccinioides*, *B. megalcephala*, *R. trilobus*, *S. polycephala* y *S. microphyllus*, las cuales fueron identificadas y una muestra voucher fue depositada en el Herbario BIGU de la Escuela de Biología de la Usac (Tabla 1). Las especies vegetales nodrizas recolectadas fueron colocadas en bandejas plásticas, dentro del horno de secado a 40°C, hasta que alcanzaron un porcentaje de humedad (%H) menor al 10% para evitar la contaminación y descomposición del material por hongos. Después fueron pulverizadas y pasadas por el tamiz No. 3 para ser almacenadas en bolsas Ziploc® hasta su uso.

**Obtención de extractos etanólicos.** Para definir el mejor disolvente, se pesó 1 g del polvo vegetal, se coló en percoladores individuales y se vertieron 10 mL de etanol en diferentes concentraciones (95, 70 y 50%) y se dejó reposar por 24 h. En crisoles tarados e identificados según la concentración de etanol, se recolectó 1

mL de la tintura y se llevaron a sequedad. Se pesó cada crisol y el disolvente que presentó mayor porcentaje de rendimiento (%R) fue el que se consideró mejor disolvente para la especie vegetal. Se pesaron 100 g de polvo vegetal humedecido y se colocaron en un percolador, añadiendo 1 L del etanol según los resultados, hasta cubrir el material y se dejó reposar durante tres días para el primer menstuo; se recolectó el líquido lentamente en un balón y se concentró en un rotavapor marca Büchi®. Este procedimiento se repitió cinco veces. Cuando el extracto concentrado estuvo como miel, se vertió en un cristizador y se almacenó en una desecadora hasta cristalización (Sharapin, 2000)

**Obtención de aceites esenciales:** Se pesó 40 g de material vegetal en un balón, se le añadió agua destilada hasta la mitad del mismo, se colocó en una manta eléctrica y se conectó a un equipo Neoclevenger®. En este, el agua se calienta hasta ebullición y se realiza la extracción durante 2 h, el aceite evaporado se colecta en pentano que luego es evaporado en baño María obteniéndose el aceite esencial (British Herbal Pharmacopoeia, 1996); esta operación se realizó en triplicado.

### Actividad biológica

**Actividad antimicrobiana según Mitscher, Leu, Bathala, Wu y Beal (1972).** Se pesaron 30 mg de cada extracto y se disolvieron en 3 mL de etanol al 50%; se preparó Agar-Planta de cada especie por duplicado, con 9 mL de agar Müller Hinton (AMH) esterilizado a 121°C durante 15 min y se agregó 1 mL de la solución del extracto filtrado. Se tapó y homogenizó con movimientos circulares; se dejó solidificar, se incubó a 36°C durante 24 h para comprobar esterilidad y se guardó en refrigeración hasta su uso. Cultivos puros de bacterias (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y levaduras (*Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, *Candida albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 1312000), se inocularon en cajas de Petri con agar Tripticasa Soya y se incubaron a 36°C durante 24 h. Se diluyó 0.05 mL de la suspensión en 4.95 mL de solución salina estéril al 0.85% (Dilución 1:100). Se inoculó en cajas con Agar-Planta una asada del microorganismo, según el patrón de una plantilla y se hicieron cinco repeticiones por microorganismo. Se dejó reposar durante 10 min e incubó a 36°C durante 24 h. Se utilizó como control positivo AMH con etanol al 50% y como control negativo AMH. Para determi-

nación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) se usó el mismo procedimiento pero en cajas de Petrie cuadriplate en las que se puso 2.5 mL de agar-extracto en concentraciones de 0.75, 0.50 y 0.25 mg/mL, usando las mismas condiciones de incubación.

**Actividad antimicótica según Brancato & Golding (1983):** Se preparó el medio de Takashio y se agregó 6 mL a tubos con tapón de rosca, se dejó solidificar con inclinación y se incubó a 25°C durante 48 h para descartar contaminación. Se sembraron los hongos (*Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, *A. niger* ATCC 9029, *Microsporium gypseum* ATCC 115200, *Trichophyton mentaprophytes* ATCC 9972 y *T. rubrum* ATCC 113200) y se incubaron a 27°C durante 21 días, hasta crecimiento homogéneo. A cada tubo, se agregó 2 mL de agua destilada estéril, se desprendieron los hongos con ayuda de una varilla, se trasvasaron a viales con tapa de rosca y se contaron las esporas en cámara de Neubauer. Se prepararon tubos con 13.5 mL de Agar Sabouraud (AS) y 1.5 mL de cada extracto en etanol, se vertieron en cajas de Petri estériles y se incubaron a 36°C durante 24 h para verificar esterilidad. Se abrieron cuatro agujeros equidistantes en las cajas de Agar-Planta y se añadió 30 µL de la suspensión de esporas de cada especie en quintuplicado; se incubó a 27°C durante 14 días. Se tomó como control positivo una caja con AS y 1.5 mL de alcohol al 70% y como control negativo cajas de AS (Zapata, Duran, Stashenko, Betancur-Galvis, & Mesa-Arango, 2010).

**Nauplios de *A. salina*.** Se disolvió 35 g de sal de mar en 1 L de agua destilada, se hirvió por 30 min, se completó el volumen evaporado, se filtró y refrigeró hasta su uso. Se forró la mitad de una pecera con plástico oscuro y en un vaso de precipitar se aireó agua de mar durante 30 min. En el área oscura de la pecera se agregaron 40 mg de huevecillos y se incubaron por 48 h a temperatura ambiente con luz artificial; al eclosionar, los nauplios, pasaron al área iluminada. En una placa de 96 pozos fondo plano se colocó en cada pozo 100 µL de agua de mar y 10 nauplios, se retó con 100 µL de cada extracto en quintuplicado. Se incubó por 24 h y se contaron los nauplios totales y muertos por pozo. Como control positivo se usó metanol, como control negativo agua de mar (Solis, Wright, Anderson, Gupta, & Phillipson, 1993).

**Actividad antilarvaria según Arana (2002).** Se disolvió 1 mg de extracto vegetal en 1 mL de agua pura

(Solución madre 1:1 SM). Se tomaron tres diluciones de 100 y 50  $\mu\text{L}$  de SM en 50  $\mu\text{L}$  de agua pura y 25 de SM en 75  $\mu\text{L}$  de agua pura, que se colocaron en tres pozos de fondo plano por quintuplicado de cada extracto. Se colocaron 10 larvas de cada especie (*Aedes aegypti* estadio 4 y *Culex* sp. estadio 3) en cada pozo. Como control positivo se usó DMSO al 100% y como control negativo, agua pura.

## Actividad antioxidante

**Evaluación cualitativa de 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) según Sharma (2009) y Vogel y colaboradores (2005).** Se evaluó por cromatografía de capa fina; se diluyó 0.1 g de cada extracto en 5 mL de metanol. Se preparó un cromatofolio de sílica gel 60 F264 y con un microcapilar se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de cada extracto y 5  $\mu\text{L}$  de cada estándar (rutina, quercetina, vitamina C, Trolox y TBHQ). Como fase móvil se usó acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26) y se dejó saturar la cámara por 15 min. Se colocó la cromatoplaqueta en la cámara y se dejó correr hasta la marca. Para el revelado, se asperjó con DPPH (1 mg/mL) en metanol donde los extractos con actividad antioxidante presentan decoloración del DPPH (morado  $\rightarrow$  amarillo).

**Evaluación cuantitativa micrométrica de DPPH.** Se diluyó cada extracto según análisis preliminar, se utilizaron concentraciones de 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{L}$  de extracto en 500  $\mu\text{L}$  de solución de DPPH, para el ensayo de *A. elongata*; para *B. vaccinioides*, se utilizaron concentraciones de 40, 50, 60, 70 y 80  $\mu\text{L}$  de extracto en 2,000  $\mu\text{L}$  de solución; para *B. megaloccephala* y *R. trilobus* se utilizaron concentraciones de 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{L}$  de extracto en 1,000  $\mu\text{L}$  de solución; para *S. polycephala* y *S. microphyllus* se utilizaron concentraciones de 30, 40, 50, 60 y 70  $\mu\text{L}$  en 500  $\mu\text{L}$  de solución. Los ensayos se realizaron por quintuplicado usando como estándares rutina, quercetina, vitamina C, Trolox y TBHQ. Como referencia se utilizó reactivo de DPPH en la misma cantidad de cada muestra con los estándares. Luego de 30 min de reacción a temperatura ambiente y en la oscuridad, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm en un espectrofotómetro BioTek ELx800 (Rojano et al., 2008), por medio de regresión lineal.

**Fenoles totales.** Se inició con la preparación de la curva de calibración. Se utilizó una solución estándar

de ácido gálico (0.1 mg/mL) y se tomaron volúmenes de 10 a 160  $\mu\text{L}$  en intervalos de 20  $\mu\text{L}$  y se completó el volumen de cada uno a 500  $\mu\text{L}$  con agua destilada. Se usaron las concentraciones del ensayo de DPPH micrométrico en agua destilada. Se adicionó a cada estándar y muestra, 250  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin–Ciocalteu 1N y se agitó por 5 min; se adicionó 1,250  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y se dejó reposar por 2 h. Todo esto se realizó por quintuplicado. Se leyó a 700 nm en un espectrofotómetro Agilent 8543 (Gracia, 2007), según el método de fenoles totales en base de ácido gálico.

## Resultados

Se investigaron seis especies vegetales nodrizas provenientes del bosque Los Cuervos en Ixchiguán, San Marcos, de las cuales se obtuvieron extractos etanólicos. Primero se determinó la mejor concentración etanólica para extraer la mayor cantidad de solutos (30-95%) y se realizaron extractos por concentración cuyos rendimientos estuvieron entre 35-40%. También se obtuvo aceite esencial por hidrodestilación en Neoclevenge, que tuvieron un rendimiento regular bajo entre 0.03 y 0.41% (Tabla 1).

La actividad antibacteriana se demostró por un método cualitativo; a pesar de haber presentado inhibición en la prueba de tamizaje (1 mg/mL), ninguno de los extractos presentó actividad en la prueba cuantitativa de CIM. Las pruebas para determinar actividad antilevadadura, antimicótica, citotóxica contra nauplios de *A. salina* y contra larvas de *A. aegypti* y *Culex* sp. se realizaron por quintuplicado, en los extractos etanólicos a dosis de 1 mg/mL, demostrándose que ninguna de las especies vegetales nodrizas presentó alguna de estas actividades biológicas.

La actividad antioxidante se determinó por medio del método DPPH y el contenido de fenoles totales, como puede observarse en la Tabla 2. Los extractos de *A. elongata*, *R. trilobus* y *B. megaloccephala* demostraron actividad antioxidante por DPPH con valores entre 0.21 y 0.75 mg/mL.

## Discusión

Los extractos vegetales demostraron tener un rendimiento medio del 40%, lo cual no pudo ser comparado con otros estudios de extractos etanólicos de estas especies vegetales, ya que no se encontraron reportes previos de estas especies.

Tabla 1

Datos de las especies nodrizas colectadas\* y rendimiento de extractos y aceite esencial

Familia – Nombre científico	Nombre popular	Voucher	Extracto etanólico (%)		Aceite (%)
			Etanol	Rendimiento	Rendimiento
<b>Asteraceae</b>					
<i>Baccharis vaccinioides</i> Kunth	Arrayán	65,183	70	40.53	0.28
<i>Stevia polycephala</i> Bertol.	Chicajol	65,185	70	35.92	0.36
<b>Caprifoliaceae</b>					
<i>Symphoricarpos microphyllus</i> Kunth	Malacate	64,494	50	38.58	0.34
<b>Loganiaceae</b>					
<i>Buddleja megalcephala</i> Donn. Sm	Salvia	65,184	70	36.22	0.41
<b>Rosaceae</b>					
<i>Acaena elongata</i> L.	Mozote	65,182	70	37.99	0.03
<i>Rubus trilobus</i> Moc. & Sessé ex Ser.	Mora	64,495	50	39.33	0.31

Nota. \*Bosque Los Cuervos, Ixchiguán, San Marcos, altura 3,000-3,500 m.snm, entre las coordenadas 15° 10' 03" a 15° 14' 53" latitud N y 91° 17' 18" y 01° 59' 23" longitud O.

Tabla 2

Actividad atrapadora del radical libre DPPH• y determinación de fenoles totales por método de Folin – Ciocalteau

Extracto vegetal	DPPH (mg/mL)	Fenoles (mg AG/g)
<i>A. elongata</i>	0.21 [0.19, 0.23]*	0.043 [0.041, 0.045]
<i>B. vaccinioides</i>	1.61 [1.58, 1.64]	0.046 [0.043, 0.049]
<i>B. megalcephala</i>	0.75 [0.72, 0.77]	0.016 [0.012, 0.020]
<i>R. trilobus</i>	0.32 [0.31, 0.33]	0.026 [0.021, 0.031]
<i>S. polycephala</i>	1.18 [1.07, 1.29]	0.028 [0.025, 0.031]
<i>S. microphyllus</i>	1.62 [1.60, 1.64]	0.012 [0.008, 0.016]
<b>Estándares</b>		
Rutina	0.167 [0.161, 0.713]	
Quercetina	0.075 [0.074, 0.076]	
Vitamina C	0.088 [0.077, 0.099]	
Trolox	0.115 [0.114, 0.116]	
TBHQ	0.115 [0.114, 0.116]	

Nota. \*Se realizó una curva de regresión lineal con todas las concentraciones (por quintuplicado), para la obtención de los resultados con intervalo de confianza al 95%.

Los aceites esenciales, a pesar de presentar un rendimiento bajo, se encuentran entre los límites que se han reportado para otras especies como el estudio de Muñoz y colaboradores (2014), quienes trabajaron ocho plantas en las que el porcentaje de rendimiento se presentó en rangos de 0.2 a 0.7%, con excepción de 4.4% para el caso de *Lippia origanoides* Kunth, lo cual coincide con los resultados obtenidos. Se concluye que el aceite esencial no es un componente importante de dichas especies. En la revisión de la literatura realizada, ninguna de las especies estudiadas ha demostrado la presencia de aceites esenciales en estudios anteriores (González, 2004; Zapata et al., 2010).

Aunque la mayoría de extractos vegetales presentaron actividad ante las bacterias analizadas en la prueba de tamizaje (1 mg/mL), al hacerse el ensayo cuantitativo de confirmación por dilución en placas quadriplate, se demostró que no poseen actividad. Lo anterior coincide con el estudio de Meckes, Tortoriello y Villarreal (1995) quienes informaron una leve actividad de *B. vaccinioides* (10 mg/mL) sobre bacterias Gram positivo. Por otra parte, Bussmann y colaboradores (2010) observaron que los extractos etanólicos de *B. vaccinioides* tienen un leve efecto sobre *S. aureus* (64 mg/mL) y los extractos acuosos sobre *E. coli* (64 mg/mL).

Ninguno de los extractos analizados demostró actividad contra nauplios de *A. salina*, larvas de *A. aegypti* y *Culex* sp. En un estudio trabajado con *B. vaccinioides* no se encontró actividad alguna de los extractos solubles en agua sobre los protozoarios ciliados rumiales informado por Ley De Coss, Cobos, Hernández y Guerra (2011). En el caso de hongos y levaduras, no se encontró ninguna literatura al respecto.

La actividad más interesante encontrada en este estudio fue la actividad capturadora de radicales libres por medio de DPPH, ya que dos especies (*A. elongata* y *R. trilobus*) tuvieron una  $CI_{50}$  ligeramente superior a la de los estándares de control (rutina, Trolox® y TBHQ), aunque menores que quercetina y vitamina C. En el caso de los fenoles totales se encontró un contenido moderado en *A. elongata* y *B. vaccinioides*, pudiendo explicar en el primer caso que la actividad sea consecuencia del contenido de fenoles. Se hizo una revisión de literatura en las bases de datos Google Scholar® y Scopus® y no se encontró ninguna referencia sobre la actividad antioxidante por parte de ninguna de las especies del estudio. En base a esta revisión, podríamos concluir que esta es la primera vez que se describe la actividad antioxidante en estas especies.

Los hallazgos más importantes se refieren a la actividad antioxidante observada, donde en dos especies (*A. elongata* y *R. trilobus*) se encontró una actividad interesante y en uno (*B. vaccinioides*) actividad intermedia. Para aprovechar la actividad antioxidante observada, será necesario realizar pruebas de toxicidad que garanticen el uso seguro de estas especies vegetales en tratamientos de corto, mediano y largo plazo.

Estos hallazgos estimulan a continuar la investigación de plantas nodrizas para identificar las moléculas responsables de la actividad antioxidante y definir su posible aplicación como antioxidantes para la prevención o tratamiento de patologías humanas o para la preservación de alimentos o uso cosmético, permitiendo que las comunidades conserven y aprovechen de manera sostenible dichas especies.

## Agradecimientos

Este proyecto se realizó con un financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Concyt) por medio del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fodecyt, No. 046-2012). Agradecemos la colaboración y apoyo al personal del Laboratorio de Investigaciones de Productos Naturales (Lipronat) por el uso de sus instalaciones, equipo, materiales y asesoría, así como los departamentos de Citohistología y Microbiología de la Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

## Referencias

- Andersen, U. S., Córdova, J. P., Nielsen, U. B., & Kollmann, J. (2008). Provenance variation in germination and seedling growth of *Abies guatemalensis* Rehder. *Forest Ecology and Management*, 255(5-6), 1831-1840. doi: 11.1016/j.foreco.2007.12.009.
- Arana, G. (2002). *Determinación de la actividad larvívica de 18 especies de plantas detectadas por etnobotánico y bioprospección en Guatemala* (Tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Bailey, L. H., & Bailey, E. Z. (1976). *Hortus* (3rd ed.). New York: MacMillan.

- Brancato, F. P., & Golding, N. S. (1983). The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *Journal of Mycology*, *45*, 848-864.
- Breedlove, D. E. (1986). *Flora de Chiapas* (Vol. 4). Universidad Nacional Autónoma de México: Listados Florísticos de México.
- British Herbal Medical Association (1996). *British Herbal Pharmacopoeia*, London: Author.
- Bussmann, R. W., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., ... Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, *132*(1), 101-108. doi: 10.1016/j.jep.2010.07.048
- Castro, J., Zamora, R., Gómez, L., Gómez, J. M., Hodar, J., & Baraza, E. (2004). Uso de matorrales como plantas nodrizas en ambientes mediterráneos: Evaluación de una nueva técnica de repoblación forestal. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, *17*, 145-150
- Cavieres, L., Peñaloza, A., Papić, C., & Tambutti, M. (1998). Efecto nodriza del cojín *Laretia acaulis* (Umbrelliferae) en la zona alto-andina de Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural*, *71*, 337-347.
- Consejo Nacional de Áreas Protegidas. (2008). *Diagnóstico del Contexto Institucional, Ambiental y Forestal para la Conservación y Fomento de los Bosques Naturales y Plantaciones de pinabete (Abies guatemalensis Rehder)*. Guatemala: autor.
- Elqui Semanario (2012). *Efecto nodriza en plantas: buscan reducir las consecuencias de la desertificación en la región de Coquimbo, Chile*. Recuperado de [elquisemanario.blogspot.com/2012/07/efecto-nodriza-en-plantas-buscan.html](https://www.elquisemanario.blogspot.com/2012/07/efecto-nodriza-en-plantas-buscan.html)
- Godfrey, T., & Collins, W. (1987). *Una encuesta dialectal en el área mam de Guatemala*. Guatemala: Instituto Lingüístico de Verano de Centroamérica.
- González, A. (2004). *Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas*. Caldas: Universidad Nacional de Colombia.
- Gracia Nava, M. A. (2007). *Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales*. México: Universidad Autónoma de Querétaro.
- Jactel, H., Bauhus, J., Boberg, J., Bonal, D., Castagneryrol, B., ... Brockerhoff, E. G. (2017). Tree diversity drives forest stand resistance to natural disturbances. *Current Forestry Reports*, *3*, 223-243. doi: 10.1007/s40725-017-0064-1
- Keane, R. E., Holsinger, L. M., Mahalovich, M. F., & Tomback, D. F. (2017). Evaluating future success of whitebark pine ecosystem restoration under climate change using simulation modeling. *Restoration Ecology*, *25*, 220-233. doi:10.1111/rec.12419
- Ley De Coss, A., Cobos-Peralta, M., Hernández-Sánchez, D., & Guerra-Medina, E. (2011). Formulación de un medio de cultivo anaerobio para protozoarios rumiales y evaluación in vitro en la capacidad desfaunante del extracto de plantas. *Revista Científica- Facultad de Ciencias Veterinarias*, *21*(1), 43-49.
- Martínez, J. V. (2011). *Evaluación y caracterización de la sucesión vegetal secundaria y propuestas para la restauración ecológica alrededor de áreas con pinabete (Abies guatemalensis Rehder) en San Marcos* (Informe final Fodecyt 055-2009). Guatemala: Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos.
- Martínez, J. V. (2014). Sucesión vegetal en bordes de bosques de pinabete (*Abies guatemalensis Rehder*) del Occidente de Guatemala. *Revista de Ciencias Técnicas Agropecuarias*, *21*(4), 64-77.
- Mazariegos, O. (2012). *Evaluación y caracterización de la sucesión vegetal secundaria y propuestas para la restauración ecológica alrededor de áreas con pinabete (Abies guatemalensis Rehder) en las partes altas de las cuencas de los ríos Coatán y Suchiate, en el departamento de San Marcos*. Recuperado de <https://www.iucn.org/pt/node/12910>
- Mitscher, L. A., Leu, R. P., Bathala, M. S., Wu, W. N., & Beal, J. L. (1972). Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale, and methodology. *Lloydia*, *35*(2), 157-166.
- Moreno, M., de-Bashan, L. E., Hernández, J. P., López, B. R., & Bashan, Y. (2017). Success of long-term restoration of degraded arid land using native trees planted 11 years earlier. *Plant Soil*, *421*, 83-92. doi: 10.1007/s11104.017.3438-z
- Muñoz, J., Staschenko, A., & Ocampo, C. (2014). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

- Revista Colombiana de Entomología*, 40(2), 198-202
- Navarro.Cano, J. A., Berdú, M., & Goberna, M. (2017). Trait-based selection of nurse plants to restore ecosystem functions in mine tailings. *Journal of Applied Ecology*, 55(3), doi: 10.1111/1365.2664.13094
- Ramírez-Contreras, A., & Rodríguez-Trejo, D. (2009). Plantas nodriza en la reforestación con *Pinus hartwegii* Lindl. *Revista Champingo*, 15(1), 43-48.
- Rivas-Rivas, M. B., Ramírez-Marcial, N., Perales, H., Levy-Tacher, S. I., & Bonfil, C. (2017). Survival and growth of three *Quercus* species under contrasting coverage conditions in southern Mexico. *Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 23, 275-288. doi: 10.5154/r.rchscfa.2017.01.001
- Rojano, B., Gaviria, C., Gil, M., Saez, J., Schinella, G., & Tournier, H. (2008). Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae*, 15(1), 173-181.
- Salazar, R., Soihet, C., & Méndez, J. (2000). Manejo de semillas de 100 especies forestales de América Latina (Vol. 1). Turrialba: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Bogotá: Convenio Andrés Bello, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).
- Sharma, O. P., & Bhat, T. J. (1998). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113, 1202-1205. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.08.008
- Solis, P. N., Wright, C. W., Anderson, M. M., Gupta, M. P., & Phillipson, D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica*, 59, 250-252. doi: 10.1055/s-2006-959661
- Thiffault N., & Hébert F. (2017). Mechanical site preparation and nurse plant facilitation for the restoration of subarctic forest ecosystems. *Canadian Journal of Forest Research*, 47, 926-934. doi: 10.1139/cjfr-2016-0448
- Tortoriello, J., Meckes, M., Villareal, M. L., Berlin, B., & Berlin, E. A. (1995). Spasmolytic activity of medicinal plants used to treat gastrointestinal and respiratory diseases in the highland of Chiapas. *Phytomedicine*, 2(1), 57-66. doi: 10.1016/S0944-7113(11)80050-4
- Vogel, H., Gonzalez, M., Faini, F., Razmilic, I., Rodríguez, J., San Martín, J., & Urgina, F. (2005). Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean *Haplopappus*-species known as bailahuén. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 97-100. doi: 10.1016/j.jep.2004.10.027
- Zapata, B., Duran, C., Stashenko, E., Betancur-Galvis, L., & Mesa-Arango, A. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia *Astareceae*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(2), 101-103. doi: 10.1016/j.riam.2010.01-005