

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**BIOACTIVIDAD DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE
ESPECIES VEGETALES NODRIZAS, PROVENIENTES DE BOSQUES DE
PINABETES (*Abies guatemalensis*) DEL MUNICIPIO DE IXCHIGUÁN, SAN
MARCOS, GUATEMALA**

**GLADYS STELLA CRUZ BOLAÑOS
DEYLING MICHELLE MALDONADO DE LEÓN**

QUÍMICAS BIÓLOGAS

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2017

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**BIOACTIVIDAD DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE
ESPECIES VEGETALES NODRIZAS, PROVENIENTES DE BOSQUES DE
PINABETES (*Abies guatemalensis*) DEL MUNICIPIO DE IXCHIGUÁN, SAN
MARCOS, GUATEMALA**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

**GLADYS STELLA CRUZ BOLAÑOS
DEYLING MICHELLE MALDONADO DE LEÓN**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICAS BIÓLOGAS**

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2017

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M. A.	Secretaria
M. Sc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser nuestro guía en la vida y la de nuestros hijos. Por permitirnos cumplir nuestras metas y darnos la oportunidad de poder lograr este éxito.

A nuestros padres, por darnos el apoyo incondicional y amor que recibimos, durante este trayecto y en todos los aspectos de nuestras vidas. Por enseñarnos que con esfuerzo todo tiene su recompensa.

A nuestros asesores, Lic. Armando Cáceres e In. Agr. José Vicente Martínez Arévalo, por su dedicación, paciencia y por su apoyo para la realización de este trabajo de graduación.

A nuestro revisor, Lic. Osberth Morales, por su tiempo, dedicación y guía en este trabajo de graduación.

A LIPRONAT, departamento de Citohistología y Microbiología por permitir el uso de sus instalaciones y materiales, colaboración con el personal y asesoría por parte de ellos.

A Concyt, por su financiamiento para la realización de este proyecto.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala y Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por permitirnos ser parte del cambio en el país, aportando conocimiento y de esta manera poder contribuir a la mejora y desarrollo.

A nuestros familiares, por acompañarnos en cada etapa de nuestras vidas.

A nuestros amigos, porque sin ellos la vida no es lo mismo.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	2
III. INTRODUCCIÓN	4
IV. ANTECEDENTES.....	5
A. Bosques de <i>Abies guatemalensis</i> en Guatemala	5
B. Plantas nodrizas	12
1. Definición.....	12
2. Plantas nodrizas de <i>A. guatemalensis</i> encontradas en Ixchiguán, San Marcos.....	13
3. Plantas nodrizas incluidas en el estudio	14
C. Microorganismos incluidos en este estudio	20
1. Bacterias.....	20
2. Levaduras	23
3. Hongos	26
D. Actividad Antioxidante	28
1. Métodos.....	28
E. Metodología de demostración.....	31
1. Obtención de extractos y aceites	31
2. Actividad biocida	34
3. Antimicrobianos.....	36
III. JUSTIFICACIÓN	39
IV. OBJETIVOS	40
A. Objetivo General.....	40
B. Objetivos Específicos.....	40
V. MATERIALES Y MÉTODOS	41
A. Universo de trabajo	41
1. Universo	41
2. Muestra.....	41
B. Materiales.....	42
1. Recursos Humanos.....	42

2. Recursos materiales.....	42
C. Recursos institucionales.....	47
D. Procedimiento	47
1. Obtención de extractos y aceites vegetales	47
2. Tamizaje de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i>	48
3. Tamizaje de la actividad antimicótica <i>in vitro</i>	49
4. Tamizaje de la actividad antilevadura <i>in vitro</i>	49
5. Tamizaje de la actividad larvicida.....	50
6. Tamizaje de la actividad citotóxica contra nauplios de <i>Artemia salina</i>	50
7. Actividad atrapadora del radical libre DPPH•	50
8. Método Folin-Ciocalteu	51
E. Observación y reporte	51
1. Tamizaje de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i>	51
2. Tamizaje de la actividad antimicótica <i>in vitro</i>	51
3. Tamizaje de la actividad antilevadura <i>in vitro</i>	51
4. Tamizaje de la actividad larvicida <i>in vitro</i>	52
5. Determinación de citotoxicidad	52
6. Actividad atrapadora del radical libre DPPH•	52
7. Método de Folin-Ciocalteu.....	52
F. Diseño del estudio.....	52
G. Análisis de resultados	53
V. RESULTADOS.....	55
VI. DISCUSIÓN	58
VII. CONCLUSIONES	60
VIII. RECOMENDACIONES	61
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
X. ANEXOS.....	69
A. Distribución geográfica.....	69

I. RESUMEN

Las plantas nodrizas son todas aquellas especies vegetales que son útiles para la sobrevivencia y convivencia de otras plantas. *Abies guatemalensis* Rehder (pinabete), lamentablemente, es una especie endémica en peligro de extinción y para poder asegurar la sobrevivencia del pinabete, es necesario estudiar las plantas nodrizas de dicha especie, de las cuales se estudiaron seis, los cuales tienen como interés la actividad antimicrobiana, citotóxica y antioxidante. Todos estos con el fin de darle una mayor relevancia a las plantas y, de esta manera, haya un interés en la población por preservarlas; sobre todo en el área de Ixchiguán, en el departamento de San Marcos, de donde provienen dichas plantas.

Se colectaron y obtuvieron seis especies de plantas nodrizas de bosque “Los Cuervos” en Ixchiguán, San Marcos y se secaron a la sombra y al horno desecador, hasta obtener un porcentaje de humedad menor al 10%. Se obtuvieron extractos para hacer los análisis por medio de Rotavapor; para los cuales se montaron bioensayos biocidas: contra bacterias, hongos, levaduras, larvas y actividad antioxidante. Los aceites esenciales por medio del método de Neoclevenger.

Los resultados demuestran que tienen poca actividad antimicrobiana y muy pobre actividad larvicida con concentraciones mayores a 1 mg/mL. Ya que la actividad antioxidante la de mayor relevancia, la cual puede ser un gran interés entre la población, dado que se debe diluir bastante, por debajo del 25% para poder llevar a cabo, con éxito, los ensayos.

Los aceites esenciales presentaron un porcentaje de Rendimiento menor del 0.3%, por lo que no se pudo trabajar con ellos, ya que son muy volátiles.

II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

Una especie vegetal nodriza es aquella que facilita la existencia de otras especies vegetales, mejorando el ambiente en el que se desarrolla al proveerle materia orgánica, humedad y sombra. En el presente proyecto, se llevará a cabo la investigación sobre la presencia de actividad biocida y antioxidante, en seis especies vegetales nodrizas nativas del Bosque Los Cuervos, Ixchiguan, San Marcos, para contribuir con la restauración ecológica de bosques de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) y conocer si estas especies podrían tener uso terapéutico.

Al concepto de conservación ecológica, debe sumarse el de restauración, dado que puede confundirse y solo hacer reservas sin conservar lo que se está perdiendo. Se ha observado que la presencia de estas especies vegetales nodrizas contribuye al crecimiento de pinabete (*A. guatemalensis*), el cual es una especie nativa amenazada de extinción que está siendo afectado por la tala desmoderada, debido a que la venta de pinabete es considerada como un ingreso económico para la población de Ixchiguan y, el mal uso de las tierras, lo cual amenaza su sobrevivencia en su hábitat natural. Se trata de rescatar lo que se ha perdido y conservar lo que se tiene, lograr una combinación armoniosa para no afectar una u otra, con el rescate de ambas.

La valoración de especies va de la mano con los conceptos de “aprovechar” que implica el uso adecuado de los recursos naturales para el beneficio humano y “rehabilitar” que implica restaurar el área que los humanos han dañado, deforestado y mal utilizado. Por lo tanto, para permitir el crecimiento y desarrollo del pinabete (*A. guatemalensis*) es necesario acondicionar el suelo, sin que esto lo perjudique y a otros organismos. En estudios anteriores, se ha demostrado que el uso de una mezcla de especies vegetales nodrizas nativas y exóticas para recuperar el área tiene resultados positivos y reproducibles que hacen posible el crecimiento de especies desaparecidas, creando con éstas un ámbito ideal y así lograr la reforestación. Asimismo, se busca recuperar su valor para garantizar su conservación por la población.

En el marco de los proyectos de restauración ecológica de la Facultad de Agronomía, se ha otorgado una ayuda financiera del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Concyt) para

continuar con los estudios del Bosque Los Cuervos ubicado en Ixchiguán, San Marcos. Este proyecto está dirigido a realizar el análisis antibacteriano, antifúngico, larvicida, actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina* (actividad biocida) y actividad antioxidante de seis especies vegetales nodrizas provenientes de dicho bosque.

III. INTRODUCCIÓN

La restauración de los bosques de pinabete, *A. guatemalensis*, es una tarea ardua y necesaria, ya que es una especie endémica de Guatemala y se encuentra como especie en peligro de extinción debido a la tala desmoderada para su comercio ilegal, lo cual complica su crecimiento y reproducción (Baile & Bailey, 1976; Breedlove, 1986). Las regiones donde se encuentran bosques de pinabete son los municipios de Huehuetenango y San Marcos (Martínez, 2011).

Para su restauración se debe crear un ambiente adecuado, en el cual las plantas nodrizas no son una excepción. Son de suma importancia, dado que su presencia ofrece protección a sus plántulas o a las de otras especies, de alta radiación, nutrientes, humedad y herbivoría (Martínez, 2011). Las plantas nodrizas que en esta investigación se presentan, son seis especies de arbustos que crecen a los alrededores de los pinabetes. Las especies aquí estudiadas son: *Acaena elongata* L., *Baccharis vaccinioides* Kunth, *Buddleja megalcephala* Donn. Sm., *Rubus trilobus* Moc. & Sessé ex Ser., *Stevia polycephala* Bertol, *Symphoricarpos microphyllus* Kunth.

Entre los estudios realizados a estas plantas se encuentran su actividad biocida, lo que incluye su actividad antimicrobiana, antimicótica, antilevadura, contra *Artemia salina* citotóxica e insecticida, además de su actividad antioxidante.

Esto con la finalidad de tener un conocimiento más amplio de estas plantas, para que la población las cuide y de esta manera lograr que las siembren abundantemente y/o preserven, favoreciendo el crecimiento del pinabete.

IV. ANTECEDENTES

A. Bosques de *Abies guatemalensis* en Guatemala

El pinabete (*A. guatemalensis*) es una especie de conífera perteneciente a la familia *Pinaceae*. Natural de Centroamérica se encuentra en el sur de México, Guatemala, norte de Honduras y en el sur de El Salvador. Debido a la pérdida de su hábitat, se encuentra como especie en peligro de extinción (Bailey, 1976; Breedlove, 1986). Debido a la tala desmoderada para su comercio ilegal dándole usos como: madera, tejados, carbón y para la producción de árboles navideños (Andersen, Córdova, Nielsen, & Kollmann, 2008), haciendo que esto sea un factor que complica su crecimiento y reproducción.

La especie nativa de Guatemala y de crecimiento específico en la región montañosa (endémica). Su distribución natural, geográficamente, se circunscribe a los departamentos de Totonicapán, Quetzaltenango, San Marcos, Huehuetenango, Quiché, Zacapa (Sierra de la Minas) y Jalapa (Cerro Miramundo). Es una especie arbórea, que puede alcanzar hasta una altura de 50 m y de diámetro, hasta de 1 m. Se localiza entre el rango altitudinal de los 2 400 a 3 500 msnm, en las zonas de vida 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).

Los bosques de *A. guatemalensis* 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 humedad relativa promedio es del 75%, una precipitación promedio de 1 300 mm anuales. Fisiográficamente son montañas cubiertas de rocas y cenizas volcánicas recientes, provenientes de los volcanes que rodean el área (Martínez, 2014).

El departamento de San Marcos se encuentra situado en la región suroccidental de Guatemala, su extensión territorial es de 3 791 km². Limita al norte con Huehuetenango, al sur con el Océano Pacífico y Retalhuleu, al este con Quetzaltenango y al oeste con el estado mexicano de Chiapas. La cabecera departamental se encuentra a 252 km de la Ciudad de Guatemala (Godfrey y Collins, 1987).

Se caracteriza por un clima generalmente templado, aunque posee una variedad de climas debido a su topografía. En la costa sur debido a la planicie del terreno el clima es cálido; en el altiplano el clima es frío. Sin embargo, su suelo es naturalmente fértil para una gran variedad de cultivos como: maíz, frijol, arroz, banano, cacao, caña de azúcar, tabaco, café, papa, trigo, avena, cebada, manzana, durazno, melocotón y hortalizas (Godfrey y Collins, 1987).

Ixchiguán, municipio de San Marcos, cuenta con una población de 25 176 habitantes (censo 2010). Es considerada la población habitada de mayor altura en Centroamérica y la segunda más alta en América Latina. La población se dedica principalmente al cultivo de papa, tanto para el consumo como para el comercio. Además, se cultiva maíz, varias hortalizas adaptadas al frío y pinabete (Godfrey y Collins, 1987).

1. *Abies guatemalensis* Rehder (*Pinaceae*)

Sinónimos: *Abies tacanensis* Lundel, *Abies guatemalensis* var. *tacanensis* (Lundell) Martínez.

Nombres comunes: pinabete, oyamel de Guatemala, abeto de Guatemala, pashaque o romerillo

a) Botánica y ecología

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, y 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 (Salazar, et al., 2000).

b) Hábitat

Es una especie en riesgo de extinción, que crece en bosques subtropicales templados húmedos en las altas montañas, especialmente entre los 2 700 y 3 600 msnm. Es el abeto más

meridional de todo el continente americano. Requiere de una precipitación anual de 1 500 a 3 000 mm. 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 (*P. ayahuite*), *P. rudis* y ciprés (*Cupressus* sp) (Salazar, et al., 2000).

El *A. guatemalensis* 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/100cc (Martínez, 2011).

En Guatemala el pinabete puede encontrarse en tres tipos de asociaciones boscosas:

- i. Bosque puro, donde la presencia de otras especies arbóreas es muy ocasional y por ende el pinabete es la especie dominante. Actualmente las regiones donde se encuentran esta asociación pura de pinabete son en los municipios de Huehuetenango y San Marcos (Anexo 1), cuyo rango altitudinal está entre 3 100 a 3 400 msnm.
- ii. Bosque mixto de coníferas, donde *A. guatemalensis* se encuentra asociada con otras pináceas como *Pinus ayacahuite* (Roezl) Shaw (pino blanco), *Pinus montezumae* Lamb. var *montezumae* (pino macho), *Pinus hartwegii* Lindl (pino de las cumbres), raras veces con *Pinus pseudostrobus* Lindl. var *pseudostrobus* (pino triste); o cupresáceas como *Cupressus lusitanica* Lindl. (Endl.) (ciprés). El pinabete suele ocupar el primer o segundo lugar de dominancia. Estos bosques se encuentran generalmente entre 2 800 a 3 200 msnm.
- iii. Bosque mixto con latifoliadas, donde el pinabete aparece asociado con especies de hoja ancha, como la fagácea *Quercus* spp. La dominancia generalmente la presenta *Quercus* (Strandby, et al., 2008).

c) Distribución de bosques de *A. guatemalensis* en Guatemala

La especie *A. guatemalensis* en Guatemala se encuentra distribuida en 10 departamentos y cuarenta y seis municipios y/o localidades, que corresponden a Huehuetenango, San Marcos,

Quetzaltenango, Totonicapán, Quiché, Sololá, Chimaltenango, Jalapa, Chiquimula y Zacapa (estas dos últimas, en la zona que se conoce como Sierra de las Minas). La cobertura actual de las especies es de 25 812 ha, contrastadas con las 55 858 ha de distribución histórica. A pesar de que a simple vista tiene una amplia superficie de distribución, la amenaza principal que afrontan estos bosques es el grado de fragmentación. El tamaño promedio de los fragmentos de bosque es de 522 ha, pero casi el 80% tiene menos de 100 ha y de éstos, un 55% tiene menos de 25 ha. Las mejores poblaciones se encuentran en tierra municipales de Totonicapán con 16 500 ha y Todos Santos en Huehuetenango con 2 700 ha; y el área protegida de Sierra de las Minas con 1 300 ha (Martínez, 2011).

Tabla 1. *Distribución de Abies guatemalensis Rehder en Guatemala*

Departamento	Municipios y/o áreas geográficas
San Marcos	Tacaná, Ixchiguan, San José Ojetenam, Concepción Tutuapa, Tajumulco, Sibinal, San Lorenzo, Tejutla, Comitancillo, San Marcos y San Pedro Sacatepéquez.
Quetzaltenango	San Carlos Sija, San Francisco La Unión, San Miguel Siguilá, San Martín Sacatepéquez, Palestina de Los Altos, San Juan Ostuncalco, Sibilia, Cabricán, Cantel y Zunil.
Huehuetenango	San Juan Ixcoy, Todos Santos, San Juan Atitán, San Mateo Ixtatán, Santa Cruz Barillas, Chiantla, San Rafael Petzal, San Pedro Soloma, Santa Eulalia, La Libertad, Aguacatán y Cuilco.
Totonicapán	San Francisco El Alto, Santa María Chiquimula, Santa Lucía La Reforma, Totonicapán y Montañas de María Tecún.
El Quiché	Nebaj
Sololá	Nahualá, Santa Catarina Ixtahuacán y San José Chacayá.
Chimaltenango	Tecpán
Jalapa	Cerro Miramundo
Chiquimula	Ipala
Zacapa	Sierra de las Minas

Fuente: Martínez, 2011.

Las condiciones climáticas y de sitio donde se desarrolla naturalmente *A. guatemalensis*, son únicas; formando asociaciones vegetales con especies de coníferas de mucho interés de igual forma (Martínez, 2011).

La temperatura es un factor clave en la ecología de la especie. Los rangos de temperatura óptimos para su desarrollo oscilan desde -4°C (temperaturas muy bajas), hasta 27°C, que para la región del altiplano son un poco elevadas. Mientras las temperaturas medias oscilan entre los 6° y 7°C (Martínez, 2011).

Así se pueden observar rangos en distintas localidades; por mencionar algunas como Totonicapán y Sololá, que poseen variaciones que comprenden entre 0° y 20°C; San Juan Ostuncalco y Palestina de los Altos, Quetzaltenango que están entre -4.0° y 27°C y Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango, presenta temperaturas que van desde los -3.0°C hasta los 26°C (Martínez, 2011).

La precipitación pluvial en los bosques naturales de pinabete, es variable de igual forma. Se estima que oscila entre los 600 mm (Sierra de los Cuchumatanes, Huehuetenango) hasta los 2 500 mm, reportados para Totonicapán y Sololá. Localidades de Quetzaltenango y San Marcos, presentan precipitaciones entre los 1 000 y 1 500 mm al mismo tiempo (Martínez, 2011).

d) Estado de conservación de los bosques de *A. guatemalensis* en San Marcos, Guatemala

Actualmente se presentan parches de *A. guatemalensis*, que se han mantenido porque es una especie protegida. 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 que consistieron en: 1) vegetación herbácea dominante, 2) arbustos, 3) arbustos y árboles, 4) árboles y pinabete y 5) pinabete. Para los estadios 1 y 2 la parcela fue de 100 m² y para los estadios del 3 al 5 de 500 m² (Martínez, 2014).

De la manera se puede nombrar los estadios por la fisonomía dominante:

- Estadio 1: Musgos y algunas herbáceas de alturas de 50 cm a 1 m con edad de 5 a 8 años.

- Estadio 2: Hierbas anuales y arbustos con edad de 8 a 20 años.
- Estadio 3: Arbustos y árboles de hoja ancha y agosta con edad de 20 a 40 años.
- Estadio 4: Arbustos, pinabete y otras pináceas y estadio con edad de 30 a 80 años.
- Estadio 5: Pinabete con edad mayor a los 80 años (Martínez, 2014).

Los mayores valores de importancia están en tres de las especies de musgos, que por su pequeño tamaño muchas veces pasan desapercibidos, encontrando pocos trabajos que muestren el valor ecológico de estos. Sin embargo, su papel ecológico es muy importante porque forman un mantillo en el suelo que retiene la humedad y evitan la erosión. Almacenan agua para su subsistencia, por lo tanto, retienen agua en el suelo. Además, mejoran la retención de nutrientes y son hogar y alimento de mucha fauna minúscula. Por lo tanto, son muy importantes para este tipo de ecosistemas, liberando lentamente agua y de esta manera ayudando a que el ciclo hidrológico se lleve a cabo con normalidad (Martínez, 2014).

El estrato arbustivo presenta las especies que tienen valor como plantas nodrizas en la protección de árboles en sus primeros estados de desarrollo y que contribuye al mantenimiento de la humedad. Mucho del cambio provocado hacia el estadio sucesional tres en adelante se puede atribuir al papel de las especies nodrizas en la protección de las plantas forestales en el proceso de establecimiento y que ha sido reconocido por varios autores (Martínez, 2014).

e) Factores que afectan el estado de conservación de los bosques de *A. guatemalensis* en Guatemala

La influencia del ser humano es la principal causa de la pérdida y deterioro de estos bosques a través de las siguientes acciones:

- Pastoreo en el sotobosque: es una actividad que se desarrolla desde la época de la colonia con la introducción de rebaños de ovejas y cabras principalmente. La condición de este tipo de bosque con baja densidad de plantas y pobre recuperación provoca que se dañe las plantas que crecen en el sustrato inferior del bosque. Lo más importante tal vez sea, que se reduce las posibilidades de repoblación natural del pinabete y de otras especies forestales y por lo tanto la recuperación de estos ecosistemas (Martínez, 2011).

- El desramado: uno de los usos más atractivos del pinabete, es para árboles de navidad. Actividad que se está fomentando a través de bosques artificiales que se siembran y certifican para este fin. Sin embargo, persiste la actividad de los depredadores del bosque, que cortan las ramas para elaborar árboles artificiales para venta local. Esta actividad trae consigo un debilitamiento del árbol pudiendo provocar la muerte. Por otro lado, la época de producción de las semillas en condiciones naturales es entre los meses de octubre a enero, con lo cual se reduce la posibilidad de polinización y fertilización, disminuyendo la cantidad de semilla y baja las posibilidades de regeneración natural (Martínez, 2011).
- Cambios en el uso del suelo: el uso del suelo del bosque para actividades agrícolas, es un fenómeno que se presenta en todos los bosques de Guatemala, esto por la sobrepoblación y por la mala distribución de la tierra. La reducción de los bosques de Palestina de Los Altos, Quetzaltenango por esta causa, ha sido de un 86% entre 1972 y 1993. Sin embargo, debe hacerse notar que el régimen de tenencia de la tierra tiene una influencia directa sobre este fenómeno, es así que la frontera agrícola ha sido detenida por las áreas de los bosques comunales en especial en Totonicapán (Martínez, 2011).
- Extracción de madera: la tala es una actividad que si bien es cierto no es actualmente la de mayor importancia en los bosques de pinabete, como pudo haber sido hasta el siglo XIX, talvez porque no representa una madera de calidad, si puede provocar algunos problemas ecológicos. Así que hay pérdida en la calidad genética, pues generalmente se hace una tala selectiva, cortando los mejores ejemplares. De la misma manera se producen cambios microclimáticos, que traen consigo la disminución de la capacidad germinativa de la semilla, al cambiar la composición florística o bien al quedar claros en el bosque (Martínez, 2011).

La deforestación de las partes altas de las cuencas hidrográficas por uso en agricultura y pastoreo, tiene como consecuencia áreas descubiertas, erosión, cambio en el microclima y disminución de biodiversidad tanto por arriba como por debajo del suelo; por lo tanto, en las partes bajas el caudal de agua disminuye en la época seca y las corrientes arrastran mucho suelo y provocan inundaciones en la época lluviosa, siendo necesaria una recuperación de las cuencas (Martínez, 2014).

La parte alta del departamento de San Marcos, comprendida de 2 800 a 4 420 msnm, es una meseta donde las condiciones son propicias para los bosques de pinos, ciprés, encino, aliso y pinabete. Desde hace mucho tiempo estos lugares han sido utilizados para agricultura y pastoreo de forma irracional, así la porción que comprende los municipios de Ixchiguan, Tacaná, Sibinal, San José Ojetenam y la parte alta de San Marcos, tienen ahora sólo vestigios de lo que en el pasado fueron rodales de bosque de mayor distribución (Martínez, 2014).

B. Plantas nodrizas

1. Definición

En la regeneración natural de los bosques el papel de algunas especies es muy importante para el establecimiento y desarrollo de otras especies que sucederán a estas. Estas especies son conocidas como plantas nodriza 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).

Dicho de otra manera, se le llama planta o especie nodriza a alguna especie que modifica las condiciones microclimáticas, generando micrositios un poco más beneficiosos para las plantas. Por lo tanto, las especies que crecen asociadas a las nodrizas están mejor que cuando crecen solas.

Las plantas nodrizas dan protección (o recursos) a plántulas de otras especies en un ambiente difícil, mientras estas últimas crecen lo suficiente para enfrentar las condiciones del medio. 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 (Ramírez-Contreras y Rodríguez-Trejo, 2009).

Las plantas pueden ejercer fuertes efectos positivos directos o indirectos hacia otras especies. Por ejemplo, Callaway y colaboradores encontraron que *Pinus monophylla* Torr. & Frém, fue ayudado por *Artemisia tridentata* Nu (Ramírez-Contreras y Rodríguez-Trejo, 2009).

Cuando algunas plantas son ayudadas por otras especies, su crecimiento es un indicador de los efectos de la especie nodriza y tal crecimiento puede deberse a una mayor

concentración de nutrientes. El nitrógeno (N) forma parte de aminoácidos y proteínas, de la clorofila y participa en procesos enzimáticos. Los árboles plantados junto a *Lupinus arboreus* Sims se benefician del N fijado de la atmósfera por esta especie, gracias a sus asociaciones simbióticas con la bacteria *Rhizobium lupini*. El mantenimiento de *Lupinus* implica una entrada continua de N en los ecosistemas forestales. La descomposición de la materia orgánica y los brinzales de *Lupinus* exudan componentes de N que los árboles cercanos pueden usar para su desarrollo (Ramírez-Contreras y Rodríguez-Trejo, 2009).

El fósforo (P) juega un papel muy importante en procesos como: generación de energía, síntesis de ácidos nucleicos, fotosíntesis, respiración, activación e inactivación de enzimas, metabolismo de carbohidratos y fijación de nitrógeno. Las raíces de las plantas pueden alterar la solución del suelo y hacer disponible o incrementar la disponibilidad de P inorgánico, por ejemplo, mediante la acidificación de la rizósfera, la exudación de ácidos orgánicos y la secreción de fosfatos (Ramírez-Contreras y Rodríguez-Trejo, 2009).

El potasio (K) influye en la apertura y cierre estomacal, consecuentemente tiene que ver con la resistencia a ambientes secos y fríos. Las bajas temperaturas del suelo pueden afectar la adquisición de nutrientes, pues el agua estará viscosa, se afecta la membrana de las células de las raíces y se reduce la demanda de nutrientes en los brotes (Ramírez-Contreras y Rodríguez-Trejo, 2009).

La radiación fotosintéticamente activa (RFA) se utiliza en el estudio de la ecofisiología de las plantas, especialmente cuando se analizan procesos de intercepción de luz en fotosíntesis. Hay poca información relativa a potencial competencia por luz entre especies nodriza y las beneficiadas (Ramírez-Contreras y Rodríguez-Trejo, 2009).

2. Plantas nodrizas de *A. guatemalensis* encontradas en Ixchiguán, San Marcos

Se encontró como especies con valor de nodrizas de las que se conoce muy poco sobre su manejo para utilizarlas más ampliamente, tales como *A. elongata*, *B. vaccinioides*, *B. megalcephala*, *Holodiscus argenteus* (L.) Maxim, *Lupinus ehrenbergii* Schlecht, *R. trilobus* y *S. microphyllus*. Estas y, otras especies arbustivas, ayudan directamente en la retención de

humedad de suelo contribuyendo a una mayor provisión de agua durante todo el año (Martínez, 2014).

Las especies más comunes utilizadas como nodrizas son *B. vaccinioides*, *A. elongata*, *B. megalcephala* y otras más que pueden tener esa función como *S. polycephala* y *S. microphyllus* (Martínez, 2014).

Como parte de la restauración forestal que se está realizando en el departamento de San Marcos, para reforestar con *A. guatemalensis*, una especie nativa amenazada de extinción, se está trabajando con plantas autóctonas pertenecientes a la región de Ixchiguán. Estas plantas juegan un papel importante como nodrizas, ya que facilitan la existencia de otras, mejoran el ambiente en el que se desarrolla, al generarle sombra, humedad y/o materia orgánica.

Para ello, se consultó en las siguientes bases de datos, donde no se encontró información de cada una de las especies aquí citadas: The Plant List, Scielo, Science Direct, Ebscohost, Napralert, Hinari, Highwire, Springer.

3. Plantas nodrizas incluidas en el estudio

a. *Acaena elongata* L. (Rosaceae)

Sinónimos: *Acaena agrimonioides* Kunth, *Acaena lappacea* Ruiz y Pav., *Ancistrum elongatum* Poir (Global Biodiversity Information Facility, 2001).

Nombres comunes: Mozote (San Marcos, Guatemala); Mozotillo, Tlachá (Volcán de Santa María, Guatemala); Pegapega, Secam (volcán de Zunil, Guatemala) (Standley & Steyermark, 1946).

i) Botánica y ecología

Arbusto erecto o extendido, de 0.5 a 4 m de alto. Las ramas son anguladas, cilíndricas y van en disminución, con crestas amarillas, suelen verse entre peludas y sin pelos. Tiene tallos, que funcionan como hojas más o menos rígidos, son lineares, que van de angostos a ligeramente ensanchados, son rectos o ligeramente curvos. En su mayoría, tienen tres venas longitudinales prominentes, con o sin venas menores longitudinales, éstas son sin anastomosis

entre ellas. El apéndice es agudo u obtuso con una esquina afilada. Tiene una glándula cerca de la base, que es una protuberancia < 2 mm de largo (Kodela, 2012).

Las hojas son alternas, de 2 a 4 cm de largo, glabras, impar-pinnadas con 7 a 13 folíolos divididos de 5 a 15 cm de largo, los márgenes están dentados, estípulas adnatas al pecíolo. Las flores son diminutas, de color verdoso, en el tallo tienen picos de hojas de 10 a 14 cm de largo, sésiles, el tubo de espinas diminutas. El fruto es un aquenio celebrada en el espinoso receptáculo ovoide amplio, de 0.5 a 1 cm de largo (Standley & Steyermark, 1946).

Acaena es sin duda una de las plantas más perniciosas de las tierras altas y también una de las plantas características y comunes en las poblaciones elevadas. Esta es una planta común en las asociaciones arbustivas de segundo crecimiento en los países con climas fríos (Anexo 2) (Standley & Steyermark, 1946).

ii) Etnobotánica

En Chiapas, México es utilizada por la población en situaciones de torceduras, quebraduras, quemaduras, entre otras (Berlin & Berlin, 1996).

iii) Composición química y actividad farmacológica

En las revisiones de literatura realizadas no se encontró ninguna información sobre el tema.

b. *Baccharis vaccinioides* Kunth (Asteraceae)

Sinónimos: *Baccharis lancifolia* Pruski (Global Biodiversity Information Facility, 2001)

Nombres comunes: Arrayán (San Marcos, Guatemala) y mesté (Chiapas, México) (Martínez, 1979; Nash & Williams, 1976; Villamar, Cano y Rodarte, 1994).

i) Botánica y ecología

Arbusto hasta de 3 m de altura muy ramoso. Las hojas son alargadas y puntiagudas. Las flores son amarillas y están agrupadas en cabezuelas. Originaria de Brasil, habita en clima templado entre los 2 000 y los 2 900 msnm. Crece a orilla de caminos, asociada a vegetación

perturbada en bosques de encino y de pino (Anexo 3) (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Villamar, et al., 1994).

ii) Etnobotánica

En el estado de Chiapas, México, con frecuencia se emplea para aliviar el dolor del estómago; se utiliza el conocimiento de las hojas cuya agua se toma regularmente, machacadas y hervidas o mezcladas con cáscara de guayaba silvestre (*Psidium guineense* Sw.), corteza de nance (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), semilla de aguacate y la hierba (*Tagetes nelsonii* Greenm.), se toma como infusión. Además, se menciona como útil para curar otros padecimientos digestivos como diarrea, disentería y en algunas enfermedades respiratorias como tuberculosis y tos (Villamar, et al., 1994).

Tópicamente, las hojas calentadas, se utilizan como emplasto en reumatismo, torceduras y dolores articulares (Villamar, et al., 1994). En la Tabla 2, se resume la aplicación de las diferentes partes de la planta por información etnobotánica aportada por la población.

En Guatemala, la población aún desconoce sus beneficios terapéuticos.

Tabla 2. *Aplicación de Baccharis vaccinioides en Chiapas, México*

Enfermedad	Parte de la planta	Proceso	Vía de administración
Dolor al orinar	Ramas	Cocción	Oral
	Hojas	Infusión	Oral
Torceduras	Hojas	Calentar	Tópica
Diarrea	Ramas	Infusión	Oral

Fuente: (Aguilar, Camacho, Chino, Jácquez, y López, 1994)

iii) Composición química y actividad farmacológica

En las revisiones de literatura realizadas no se encontró ninguna información sobre el tema.

c. *Buddleja megalcephala* Donn. Sm. (*Loganiaceae*)

Nombre común: Salvia (San Marcos, Guatemala) y Patushé (Quetzaltenango, Guatemala) (Standley & Williams, 1969).

i) Botánica y ecología

Son árboles hasta 12 m de altura, por lo general con un tronco grueso y poco ramificado, las ramas gruesas cubiertas con un tomento denso; hojas lanceoladas o alargadas-lanceoladas, enteras, agudas a acuminadas, obtusas en la base, pecíolos de 1 a 2 cm de largo, las hojas de 7 a 20 cm largo, 2 a 5 cm de ancho, verde brillante, superficie inferior glabrata, de color blanquecino a marrón, tomento estrellado; inflorescencias terminales, 6 a 30 cm de largo, generalmente en racimos cortos, simples o ramificados; con cáliz tubular, densamente tomentoso, 3 a 4.5 mm de largo, los lóbulos acuminados o estrechamente triangulares, corola 6 a 8 mm largo, en el interior naranja profundo, fuera más pálido, con el exterior estrellado tomentoso, con pelos dispersos, fragante; con numerosas semillas (Standley & Williams, 1969).

Presente en bosques de alta montaña, a menudo en asociación con *Pinus*, *Abies*, *Cupressus* o *Juniperus*, a veces formando pequeños y densos rodales; generalmente se encuentra a 2 400 a 4 050 msnm. Se localiza en México y Guatemala, específicamente en los departamentos de Chimaltenango, Huehuetenango, Quetzaltenango, San Marcos, Sololá y Totonicapán (Standley & Williams, 1969).

ii) Etnobotánica

En las revisiones de literatura realizadas no se encontró ninguna información sobre el tema.

iii) Composición química y actividad farmacológica

En las revisiones de literatura realizadas no se encontró ninguna información sobre el tema.

d. *Rubus trilobus* Moc. & Sessé ex Ser. (*Rosaceae*)

Sinónimos: *Rubus trifidus* Thunb. (Global Biodiversity Information Facility, 2001)

Nombres comunes: Mora y Morita (San Marcos, Guatemala) (Standley & Williams, 1966).

i) Botánica y ecología

Son plantas delgadas, suberectas, sin ramas. Los tallos, a menudo, son desordenados y apoyados en los arbustos, a veces, de 5 m de altura o incluso más. Escasamente ramificado, la corteza marrón o púrpura, glabro, hojas caducas, las ramillas puberulentas o pilosas. Ramas hispídas con pecíolos y pedúnculos. Hojas largas pecioladas, delgadas, de color verde oscuro por encima, más pálido por debajo, pilosas en ambas superficies, finamente aserrados, de tres lóbulos, vellosas, lóbulos agudos, serrados, los laterales divergentes una media más larga con estípulas y brácteas lanceoladas. Flores solitarias en la parte superior de las ramas; segmentos de cáliz ovalado, cóncavo, difuso, foliáceo y espatulado en el ápice, más largos que los pétalos. Carpelos numerosos, subglobosos; sépalos ovalados, caudado-acuminadas, de 1.5 cm de largo, tomentosas en el interior, pétalos de color blanco, de 2 cm de largo; fruto hemisférico, negro-púrpura, 1.5 cm de ancho (Loudon, 2006; Nash & Williams, 1976).

El arbusto es típico de la selva alta, que ocurre principalmente a 2 700 msnm o más. Rara vez, es abundante en cualquier localidad, que ocurre como individuos aislados, aunque en la Sierra de los Cuchumatanes, es abundante. El fruto es dulce, pero con un marcado sabor acidulado (Nash & Williams, 1976).

Se encuentra en bosques de montaña, húmedo o mojado, o mixto de coníferas, con frecuencia en los bosques de roble, *Cupressus*, o *Abies*; a veces, en cuevas de arena blanca, a 2 000 a 4 200 msnm; en Sacatepéquez, Quetzaltenango, San Marcos y el sur de México (Anexo 4) (Nash & Williams, 1976).

ii) Etnobotánica

En las revisiones de literatura realizadas no se encontró ninguna información sobre el tema.

iii) Composición química y actividad farmacológica

En las revisiones de literatura realizadas no se encontró ninguna información sobre el tema.

e. *Stevia polycephala* Bertol (*Asteraceae*)

Nombre común: Chicajol (San Marcos, Guatemala) (Nash & Williams, 1976).

i) Botánica y ecología

Es un arbusto de hasta de 2 m de altura, con uno a varios tallos, de corteza lisa y color marrón, fruncido, cubierta con pelos suaves muy cortos, hojas opuestas, lanceoladas, cerca de 7 a 18 cm de largo, 1.7 a 5.3 cm de ancho, glandular a punteada, completamente aserradas, ápice acuminado, ligeramente rugosa o peluda, con pelos que se doblan y enmarañados (tomentoso) entre las venas; las inflorescencias presentan corimbos terminales redondeados, 6 a 20 cm de diámetro, ramas opuestas; con corola blanca, rosa o lavanda, de unos 6 mm de largo; aquenios alrededor de 5.5 mm de largo; vilano generalmente una corona corta unida, escalas iguales, minuciosamente dentados, de 0.2 mm de altura, en ocasiones separadas, desiguales o iguales , tan grande como 1 mm largo, la corona nunca incompleta ni lacerada (Nash & Williams, 1976).

Se encuentra en bosques montañosos nublados o en suelo de grava en las colinas; en los departamentos de Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Sacatepéquez, San Marcos, Sololá y Suchitepéquez (Anexo 5). Se recolecta desde junio hasta marzo y florece durante todo el año (Nash & Williams, 1976).

ii) Etnobotánica

En las revisiones de literatura realizadas no se encontró ninguna información sobre el tema.

iii) Composición química y actividad farmacológica

En las revisiones de literatura realizadas no se encontró ninguna información sobre el tema.

f. *Symphoricarpos microphyllus* Kunth (*Caprifoliaceae*)

Nombres comunes: Malacate (San Marcos, Guatemala) y Perlilla (México) (Villamar, et al., 1994).

i) Botánica y ecología

Arbusto erecto, muy ramificado, de 1 a 3 m de alto. Tiene hojas pequeñas, láminas ovaladas de 0.8 a 2.5 cm de largo por 0.5 a 1.5 cm de ancho, ápice agudo redondeado, con bordes no dentados de color verde oscuro en ocasiones velludas. A veces, tiene flores solitarias, en pseudorracimos o pocas flores de forma escondida entre las hojas, incoloras estrechamente campanulado o tubulares de 0.7 a 1.3 cm de longitud, lóbulos iguales ovados, cinco estambres. Sus frutos son blancos como perlitas de 4 a 9 mm de longitud. Las semillas son aplanadas, ovaladas, de 3 a 7 mm de ancho, fenotipo que explica la dificultad de su propagación sexual (Monroy, Castillo-Cedillo, y Colín, 2007; Villamar, et al., 1994).

Originario de México, habita en climas semisecos y templado, entre los 2 200 y 2 900 msnm. Asociada a matorral xerófilo, bosques de encino y de pino. Se encuentra distribuida desde Nuevo México hasta Guatemala, incluyendo el centro del Eje Volcánico Transversal de México (Anexo 6) (Monroy, et al., 2007; Villamar, et al., 1994).

ii) Etnobotánica

Esta especie es un producto forestal no maderable (PFNM) y se usa para eliminar las lesiones que salen en la boca; para lograr tal efecto, se mastican las hojitas teniendo cuidado de no tragarlos. Este remedio no se debe hacer a niños pequeños porque arde demasiado, por ser picante o, bien, se frota la boca con los frutos con carbonato (Villamar, et al., 1994).

iii) Composición química y actividad farmacológica

Del tallo se ha aislado la cumarina fraxín, y de las hojas y tallo, el monoterpeno loganina (Villamar, et al., 1994).

C. Microorganismos incluidos en este estudio

1. Bacterias

a. *Escherichia coli* (Migula) Castellanin & Chalmers (*Enterobacteriaceae*)

Las colonias son enteras, brillantes, circulares, suaves, traslúcidas y ligeramente convexas. El cultivo incuba a 37°C, aeróbicamente. Es una bacteria bacilar, negativa a la tinción de Gram. Es la bacteria más constantemente encontrada en las materias fecales del hombre y de muchas especies animales. Puede encontrarse en los intestinos del ser humano en calidad de saprobio sin causar daño, produciendo colicinas que tienen efecto inhibitorio sobre otras especies potencialmente patógenas. Las infecciones producidas por cepas de *E. coli* patógenas pueden estar limitadas a mucosas o bien diseminarse. Algunos síndromes clínicos que pueden resultar de la infección por cepas patogénicas son infección de vías urinarias, sepsis, diarrea, disentería, cistitis, meningitis, entre otras. Esta cepa se utiliza con fines de referencia a la susceptibilidad antibiótica (Chan, Sherman & Bourke, 2006; Romero, 2007).

En Chiquimula, Guatemala se analizaron leches artesanales siendo estas no aptas para el consumo humano por presentar *Escherichia coli* (Olivet, 2008); asimismo, se demostró la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 como causante de infecciones urinarias en el Hospital “Bella Aurora”, donde la mayor cantidad de urocultivos positivos se presentó en personas adultas con edades comprendidas entre 18-70 años (62.63%) y del género femenino (87.88%) (Pastor, 2006).

b. *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehman & Neumann (*Mycobacteriaceae*)

Las colonias en agar o caldo infusión cerebro corazón (BHI) son irregulares, rugosas, elevadas, opacas, onduladas y duras. Puede producir ocasionalmente pigmentación. Aunque hay algunas cepas que forman colonias lisas. Es una bacteria positiva a la tinción de Gram, con la capacidad de formar biopelículas. Su hábitat natural es el suelo, el agua y las plantas. Está clasificado como saprofítico, considerado como un organismo de escaso potencial patógeno. Aun siendo infrecuente, se le ha asociado con infecciones en el paciente con enfermedad broncopulmonar obstructiva, con enfermedades de la piel y partes blandas, tras traumatismos, cirugía, inyecciones de medicamentos, infecciones articulares, bacteremia relacionada con catéteres, endocarditis, linfadenitis e infección diseminada en el inmunodeprimido (Chan, et al., 2006; Brown, 2000).

En Guatemala, no hay casos reportados que vinculen a *M. smegmatis* con alguna enfermedad. Se evalúa, ya que posee muchas características similares a *M. tuberculosis*, siendo ésta última

patógena y muy infecciosa; es de rápido crecimiento y no es patógena al humano (García, 2008).

c. *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter (*Pseudomonadaceae*)

En agar sangre produce hemólisis beta, en medios de enterobacterias producen colonias de color gris con brillo metálico, con aroma a uvas fermentadas. Se utilizan medios como agar peptona con o sin sangre, MacConkey y EMB. La identificación es por: olor a uvas o nixtamal por la producción de trimetilaminas y por la pigmentación ya que produce piocina, de color azul, y pioveridna o fluoresceína, que va de amarillo verdoso a amarillo café. Bacilo negativo a la tinción de Gram, aerobio y anaerobio facultativo. Móvil, con una microcápsula compuesta por polisacáridos, no forma esporas, no fermenta los azúcares, oxidasa positivo. Metabolismo oxidativo de tipo respiratorio. Especie que se ha encontrado en infecciones hospitalarias, frecuentemente en personas inmunodeprimidas, con quemaduras y alteraciones metabólicas; es resistente a muchos antimicrobianos que se utilizan en la práctica diaria. Puede instalarse en cualquier órgano o tejido, invadir el oído externo y colonizar las vías urinarias, los pulmones, el endocardio, la córnea y los huesos (Romero, 2007).

En Guatemala se le considera, principalmente, una bacteria infecciosa nosocomial. Sin embargo, dado que sus requerimientos alimenticios son mínimos, las enfermedades producidas por esta bacteria están asociadas a su preferencia por los medios húmedos. Se refiere a nosocomial, ya que es raro que en una persona sana cause algún tipo de enfermedad (Felipe, 2010).

d. *Salmonella enterica* subsp. *enteric* (ex Kauffmann & Edwards) Le Minor & Popoff serovar *typhimurium* (*Enterobacteriaceae*)

Bacilo entérico, negativo a la tinción de Gram, móvil. Es estrictamente no fermentativa de la lactosa. Es una bacteria que se encuentra únicamente en humanos. Se transmite en el ciclo ano – mano – boca. Por lo que se puede encontrar en algunos alimentos, como la carne, los huevos, ensaladas, lácteos, etc. Es un patógeno que se aloja en muchos órganos de las personas infectadas. Se requiere de una dosis muy pequeña para infectarse, produciendo fiebre entérica, gastroenteritis, septicemia o lesiones focales. La salmonelosis es considerada

altamente virulenta, debido a que entre sus factores de virulencia se encuentran: la habilidad para invadir las células, lipopolisacáridos completos, capacidad para reproducirse intracelularmente, elaboración de toxinas. Cabe destacar, que es el agente etiológico de la fiebre tifoidea, presente en países en vías de desarrollo. Dos tipos de colonias pueden distinguirse, los que reaccionan ante el antisuero del Grupo B y los que no (Chan, et al., 2006). Se debe realizar una batería de agares, para poder distinguirla. Ésta produce ácido, a partir de la glucosa, mas no de la lactosa ni de la sacarosa, en TSI. Descarboxila la Lisina, rindiendo cadaverina (sustancia alcalina) en LIA. Muy importante, genera ácido sulfhídrico en TSI y LIA, por lo tanto, se torna hacia un característico color negro, el medio de cultivo. No hidrolisa la urea (Crump, Luby, & Mintz, 2004).

Dado que Guatemala es un país en vías de desarrollo, es un país endémico para la fiebre tifoidea, causada por la bacteria *Salmonella enterica* subs. *enteric*. Causa enfermedad sistémica febril (González-López, et al, 2014)

e. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (*Staphylococcaceae*)

Tiene colonias color amarillento. Las colonias, en agar o caldo tripticasa soya, son pequeñas, blancas, opacas, mucoides, redondas y convexas. Se observa hemólisis tipo β , en Agar Sangre de Carnero. Se recomienda transferir de agar en agar, para mantener los valores de CIM. Bacterias esféricas, positivas a la tinción de Gram, son inmóviles. Son resistentes a la meticilina, por lo que su mecanismo de patogenicidad es importante. Intoxica por medio de la comida, las heridas y produce infecciones en la piel (Chan, et al., 2006). Es parte de la microbiota humana, encontrándose en piel, nariz y membranas. Puede producir patologías en humanos, produciendo infecciones supurativas, intoxicación alimenticia y síndrome tóxico. Es una bacteria resistente a: extremos de pH, altas temperaturas, desecación, penicilinas, desinfectantes comunes, causante muy frecuente de enfermedades nosocomiales (Pérez y González, 2002)

En Guatemala es el causante de muchas infecciones entéricas, así como de la piel, siendo su mayor patogenicidad en los nosocomios (Schneider, 2009).

2. Levaduras

a. *Candida albicans* (Robin) Berkhout (*Cryptococcaceae*)

En agar extracto de levadura peptona dextrosa (YEPD), después de incubar por dos días a 25°C, las colonias son de color crema, brillantes y suaves. Las colonias antiguas muestran estructuras filamentosas al margen y tienen plegamientos. Patógeno oportunista. Positivo a la tinción de Gram. Las células son ovoides (3.0 a 6.0 x 4.0 a 8.0 µm), aisladas y, raramente, incrustadas en cultivos jóvenes. Las células se alargan y forman filamentos articulados, en cultivos antiguos. Es parte de la microbiota normal y puede provocar candidiasis; en ese caso se presenta como una afección vaginal (vaginitis), de la cavidad oral (muguet), del intestino o de la piel; en un físico debilitado, inmunodeprimido o convaleciente de una larga cura antibiótica (Chan, et al., 2006).

La candidiasis es el primer hongo que ataca a persona inmunodeprimida o que acaban de contraer VIH. Se manifiesta sobre todo en boca, vagina y esófago. Se considera la infección de entrada para otras infecciones en personas con sida. En Guatemala, se encuentra más en nosocomios, infectando a personas con VIH/SIDA. En poca cantidad se encuentra en personas inmunosuprimidas, manifestándose como monoliasis, vaginitis y balanitis, entre otros *Candida tropicalis* Berkhout (*Cryptococcaceae*) (Silva, 2007).

En agar Sabouraud las colonias son color blanco – crema, suaves, lisas, brillantes, con la apariencia clásica de una levadura (Kreger-van Rij, 1984). En CHROMagar desarrolla colonias color azul (Gatica, 2002). Identificada como la levadura patógena de mayor prevalencia del grupo *Candida* no *albicans*. Produce pseudohifas con blastoconidios que nacen de modo individual o en racimos irregulares pequeños a lo largo de las pseudohifas. Presente en el tracto gastrointestinal y urinario. Producen estreñimiento, diarrea, dolor abdominal, entre otros (Koneman, 2008).

El sistema gastrointestinal es el lugar más común para las personas que sufren de cantidades invasoras de *Candida tropicalis* para experimentar los síntomas. Estos incluyen exceso de gases, estreñimiento, diarrea, indigestión, dolor abdominal y una variedad de sensibilidades a los alimentos repentina e intensa o alergias (Reséndiz-Sánchez & Morales-Aguirre, 2007). Es la mayor causa de septicemia y candidiasis diseminada, especialmente en pacientes con linfoma, leucemia y diabetes (Kreger-Van, 1984). En Guatemala se le encuentra

mayormente en personas inmunocomprometidas. Se le ha aislado en lesiones orales, orina, entre otros (Paiz, 2008).

b. *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin, (*Sporidiobolaceae*)

Las colonias son típicas de un hongo levaduriforme, son color blanco, brillantes y mucoides. Es una levadura positiva a la tinción de Gram, puede producir cápsula, lo cual lo hace patógeno. Al entrar por las vías respiratorias altas, el hongo coloniza el árbol bronquial, y la evidencia sugiere que la criptococosis inicia como una enfermedad pulmonar con diseminación a la piel, huesos, vísceras abdominales y particularmente hacia el sistema nervioso central (Chan, et al., 2006).

Son las personas inmunosupresas quienes presentan síntomas, entre los cuales se encuentran: visión nublada o doble, dolor óseo, fatiga, fiebre, dolor de pecho, náusea, sarpullido (incluidas petequias, úlceras u otras lesiones en la piel), glándulas inflamadas, pérdida de peso (Kauffman, 2011).

En Guatemala solamente hay estudios realizados a pacientes inmunosuprimidos (Rivas, 2012).

c. *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (*Saccharomycetaceae*)

Tipo de levadura utilizado industrialmente en la fabricación del pan, cerveza y vino. El ciclo de vida alterna una forma haploide y una diploide, donde ambas se reproducen en forma asexual por gemación. No se considera un patógeno común, en la actualidad cobra importancia en sepsis en enfermos de leucemia y otras infecciones oportunistas en personas con sida (Tortora, Furke, & Case, 2007). La incapacidad para utilizar nitratos y la capacidad de fermentar varios carbohidratos son las características típicas de los *Saccharomyces*. Sus colonias pueden crecer y madurar en 3 días y muestran un color amarillo oscuro. Hongo levaduriforme que presenta células alargadas, globosas a elipsoidales con gemaciones o blastoconidios multilaterales. Ascosporas con hasta cuatro ascosporas esféricas o elipsoides y de pared lisa en su interior. Las colonias en agar glucosado de Sabouraud son cremosas, blandas y glabras como las formadas por *Candida* sp (Kreger-van Rij, 1984).

Se han descrito casos de fungemia y endocarditis en pacientes con neoplasias (leucemias), receptores de trasplantes o infectados por el VIH y peritonitis en pacientes en diálisis ambulatoria crónica. También se le ha asociado con vulvovaginitis indistinguibles de las producidas por *Candida albicans*. Se aísla con frecuencia en muestras fecales de receptores de trasplante de médula ósea (Kreger-van Rij, 1984). En Guatemala se ha aislado frecuentemente en pacientes inmunosupresos, con VIH/SIDA, en lesiones orales (Paiz, 2008).

3. Hongos

a. *Aspergillus fumigatus* Fresenius (*Trichocomaceae*)

Colonia de crecimiento rápido (3.5 días), plana, al principio blanca, aterciopelada o polvorosa, la que a medida que se desarrollan los conidios, se va tornando de color verde-azulado oscuro y de aspecto pulverulento. Los cultivos viejos tienden a formar una capa gris ahumada, sobre las colonias, su reverso es blanco o de color canela o camello. Microscópicamente, cabezas uniseriadas con fiálides que recubren la mitad a las dos terceras partes superiores. Puede tolerar hasta los 45 °C. Principal agente etiológico de la aspergilosis pulmonar en el hombre y los animales superiores y es la especie más frecuente que causa enfermedad en pacientes inmunodeprimidos (Forbes, Sahm y Weissfeld, 2009; Mier, Toriello y Ulloa, 2002).

En Guatemala, se registran pocos casos, dado que a nivel mundial tiene una prevalencia del 1 al 2%, lo cual no es alarmante, dado que se da, principalmente, en personas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), derivándose al 91 – 95% en tasa de mortalidad (De La Hoz & García Cuán, 2014).

b. *Aspergillus niger* van Tieghem (*Trichocomaceae*)

Colonia lanosa, al principio blanco, que se torna amarilla y se va oscureciendo desde color café hasta llegar a negro. Su reverso es blanquecino o amarillento. Microscópicamente, sus conidióforos son lisos, de longitud variable, las cabezas conidiales son biseriadas, las métulas y fiálides cubren radialmente la vesícula y los conidios tienen la pared áspera a equinulada. Es una especie importante de la micología industrial. Agente etiológico de

aspergiloma, infección pulmonar, otomicosis externa y queratitis micótica (Forbes, et al., 2009; Mier, et al., 2002).

En Guatemala se reportan pocos casos, dado que se dan más en personas inmunocomprometidas y con problemas alérgicos; causándoles lesión pulmonar severa y progresiva (Guzmán, 1984).

c. *Microsporum gypseum* (Bodin) Guiart & Grigorakis (*Arthrodermataceae*)

Colonia de color canela, pulverulenta; el reverso es ocre claro, con velocidad de crecimiento de una semana. Microscópicamente, macroconidios de paredes gruesas, rugosas, elípticas, con tabiques múltiples; microconidios escasos o ausentes. Especie geofílica patógena que con más frecuencia afecta al hombre, pero su incidencia en casi todo el mundo es baja. Agente etiológico de dermatofitos (Forbes, et al., 2009; García-Martos, Ruíz-Aragón, García-Agudo, y Linares, 2004).

Es una de las especies que mayormente y más frecuentemente causan infecciones dérmicas en Guatemala (Meza, 1995).

d. *Tricophyton rubrum* Malmsten (*Arthrodermataceae*)

Hongo de crecimiento lento que produce colonias aplanadas o sobre elevadas, por lo general de color blanco o rojizo, con una superficie algodonosa o aterciopelada. El color rojo cereza característico se observa mejor en el reverso de la colonia; sin embargo, éste se produce recién después de 3 a 4 semanas de incubación. No tiene requerimientos especiales de cultivo. No perfora el pelo in vitro ni produce ureasa. Es un agente etiológico de las dermatomicosis (Forbes, et al., 2009). Asimismo, es frecuentemente encontrado en infecciones de pie, ingle, cabeza y cuerpo. Por lo que, se les puede denominar tiña, siendo la del cuerpo (*Tinea corporis*), la del cabello (*Tinea capitis*), la del área unguinal (*Tinea cruris*), en las manos, (*Tinea manuum*) y la del pie, (*Tinea pedis*) (Foster, Ghannoum, & Elewski, 2004).

En Estados Unidos, en un estudio multicéntrico realizado entre 1999 y 2002, encontraron también que *T. rubrum* fue el hongo patógeno más prevalente entre su población. Además, hicieron notar que la incidencia de este patógeno ha aumentado en los últimos años como

causa de tiña de las uñas, tiña del cuerpo, tiña de la ingle, tiña de la mano y tiña del pie (Foster, et al., 2004).

Es una de las especies que mayormente y más frecuentemente causan infecciones dérmicas en Guatemala (Meza, 1995).

e. *Tricophyton mentagrophytes* Malmsten (*Arthrodermataceae*)

Produce colonias de crecimiento rápido pueden ser color crema o amarillo con gránulos gruesos o pulverulentas. El reverso de la colonia por lo común es de color rosa o castaño, y en ocasiones anaranjado o rojo oscuro. Produce ureasa dentro de los 2 a 3 días posteriores a la inoculación, perfora el pelo. Agente etiológico de dermatomicosis. Puede producir tiña en piel lampiña, tiña unguinal, onicomycosis de superficie blanca y *tinea capitis* (Forbes, et al., 2009; Hay, 2006).

Es una de las especies que mayormente y más frecuentemente causan infecciones dérmicas en Guatemala (Meza, 1995).

D. Actividad Antioxidante

La bioactividad es la capacidad que tiene un material de interactuar químicamente con los tejidos del organismo. Los compuestos bioactivos son componentes que tienen una actividad biológica dentro del organismo, que se traduce en beneficios para la salud (Castro y Ledea, 2011).

1. Métodos

a. Actividad antioxidante

Posiblemente, el peligro más importante que acecha de modo continuo a las células proviene de las moléculas oxidantes, entre las que destacan diversos tipos de radicales libres, tales como alquil, hidroxil, hipoclorito, oxígeno singlete, peroxi, superóxido y peróxido de hidrógeno. Estos radicales libres pueden tener un origen endógeno al formarse de modo natural en las células del organismo, o bien un origen exógeno, al proceder de diversos agentes externos, tales como los disolventes orgánicos, el humo del tabaco, los pesticidas, algunos

poluentes (ozono), etc. La reactividad de los radicales libres formados durante los procesos metabólicos normales, les permite inducir un amplio espectro de reacciones muy nocivas para el organismo humano. Para evitarlas, se desarrollan como medios protectores unos sistemas biológicos muy eficientes, que en su mayoría son sistemas enzimáticos: glutatión peroxidasa, que protege a los eritrocitos de la oxidación de la hemoglobina y de la hemólisis; glutatión reductasa, capaz de recuperar la forma reducida del glutatión; glutatión transferasa, implicada en la transformación hepática de ciertos xenobióticos que, bajo la forma de ácidos mercaptúricos, son eliminados por la orina. Cuando por alguna causa falla esta protección, aparecen los efectos deletéreos provocados por los radicales libres (Bello-Gutiérrez, 2012).

Los excesos de radicales libres pueden dar lugar a la inducción de importantes fisiológicos, que por lo general desembocan en el desarrollo de ciertas enfermedades. Para contrarrestar estos efectos nocivos, el organismo suele disponer de moléculas ricas en electrones que, al donarlos, ejercen un efecto antioxidante. Sin embargo, cuando los sistemas antioxidantes defensivos del organismo se ven superados por la actividad dañina de los radicales, aparece un estrés oxidativo, iniciador de ciertas situaciones patológicas con una mayor o menor trascendencia sobre la salud. Cada vez son más abundantes los estudios que ponen de manifiesto la presencia en los alimentos de origen vegetal de componentes químicos con la capacidad de realizar funciones antioxidantes una vez que han quedado liberados dentro del organismo, por lo que su consumo podría significar el desempeño de un papel crítico frente al desarrollo de algunas enfermedades degenerativas, reduciendo o retrasando la posibilidad de padecerlas (Bello-Gutiérrez, 2012).

En relación con las enfermedades, los radicales libres son liberados durante la inflamación, isquemia o hipoxia de los tejidos. En un organismo saludable hay equilibrio molecular entre la generación de radicales libres y de sustancias protectoras, pero si este equilibrio se altera inclinándose a favor de los radicales libres, los daños generales por oxidación llevan a envejecimiento prematuro, cataratas, carcinogénesis, enfermedad de Parkinson, Alzheimer y aterosclerosis. A su vez, esta última provoca hipertensión, angina, isquemia, accidentes cerebrovasculares y otros problemas (Revista Panamericana de Salud Pública, 1997).

i) Método de Folin-Ciocalteu

La determinación del contenido total de compuestos fenólicos, utilizando el método originalmente propuesto por Folin en 1927 y modificado por Singleton y Rossi, no es considerada en sí misma una metodología para medir actividad antioxidante, a pesar de que su principio se basa en la capacidad redox de los polifenoles. Sin embargo, la alta correlación de los resultados con otros métodos como la Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno (CARO) y Difenil Picril Hidrazilo (DPPH) ha hecho que este método se popularice como una herramienta simple y rápida para predecir actividad antioxidante, principalmente en matrices complejas, donde la cantidad de compuestos fenólicos más que la composición específica de estas sustancias determina la actividad antioxidante (Londoño, 2012).

El método se fundamenta en la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en una muestra, por la acción del polianión molibdotungstosfórico para generar un producto coloreado con un máximo de absorción a 765 nm. Una de las modificaciones al método propuesta por Singleton implica el uso de ácido gálico como compuesto fenólico de referencia, de tal manera que los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico (EGA). Actualmente el método de Folin-Ciocalteu es ampliamente utilizado, principalmente en complemento con otros métodos para medición de actividad antioxidante, puesto que ya se conoce el valor de EGA para una amplia cantidad de frutas, vegetales, bebidas; por lo tanto, es posible la comparación de una muestra con estos datos, siempre y cuando se sigan los procedimientos reportados (Londoño, 2012; Mesa-Vanegas, Gaviria, Cardona, Sáez-Vega, Blair y Rojano, 2010).

La concentración de fenoles totales, en extractos, es medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado es el reactivo de Folin-Ciocalteu (Gracia, 2007).

ii) DPPH

Este ensayo fue propuesto originalmente por Brand-Williams. El DPPH• es uno de los pocos radicales orgánicos estable, presenta una fuerte coloración violeta, es comercialmente disponible y no tiene que ser generado in situ como el ABTS•+. El ensayo se fundamenta en la

medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH•, esta medición puede hacerse espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 517 nm, cuya absorbancia disminuye al ser reducido por un antioxidante. La reacción de estabilización se considera que transcurre principalmente mediante un mecanismo de transferencia de electrones, con un aporte marginal de transferencia de átomos de hidrógeno (Rojano, Gaviria, Gil, Saez, Schinella y Tournier, 2008; Londoño, 2012).

Los resultados se suelen expresar como EC₅₀, es decir, la concentración de antioxidante necesaria para estabilizar un 50% del DPPH•. Sin embargo, han surgido otros parámetros como la eficiencia anti-radicalaria (EA) basada en la cinética de la reacción y que involucran, además de la concentración de antioxidante, el tiempo necesario para ejercer su efecto (Londoño, 2012).

Entre las ventajas de este método están su simplicidad y el bajo requerimiento instrumental; sin embargo, entre las desventajas están la dificultad de interpretar los resultados cuando se tienen sustancias cuyo espectro de absorción se solapa con el del radical; adicionalmente el DPPH• es un radical estable, centrado en nitrógeno, que dista mucho de parecerse a las especies reactivas de importancia biológica; de hecho muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo no lo hacen así con DPPH•, debido al impedimento estérico que representa la estructura química que rodea al radical, lo cual hace que sustancias pequeñas generalmente muestren una mayor actividad (Londoño, 2012).

E. Metodología de demostración

1. Obtención de extractos y aceites
 - a. Extractos

Para la utilización de las plantas medicinales para la investigación fitoquímica y farmacológica es necesario realizar extracciones que sean reproducibles, cuantitativas, estables y eficientes para el efecto que se desea demostrar (Cáceres, 1996).

Los principios activos de las plantas medicinales se obtienen por una extracción generalmente llamada “sólido-líquido” que se lleva a cabo cuando menos en tres etapas:

Penetración del disolvente en los tejidos vegetales e hinchazón; disolución de sustancias extraíbles y difusión de sustancias extraíbles disueltas fuera de la célula vegetal (Cáceres, 1996).

La forma de extracción más frecuente es por maceración, que tiene algunas ventajas sobre la percolación y contracorriente. Otros métodos de extracción son vortical (turbo), ultrasonido y eléctrica. Los parámetros para una extracción son: tamaño de la partícula, agitación, recambio de disolvente. Para la extracción exhaustiva se utilizan procedimientos que implican recirculación del disolvente como percolación, repercolación y contracorriente (Cáceres, 1996).

Los extractos fluidos son similares a las tinturas o macerados, pero los principios están concentrados por evaporación parcial o total del disolvente, según la Farmacopea Alemana (DAB 8) se recomienda obtener al menos dos partes de extracto fluido por una parte de materia médica (Cáceres, 1996).

De acuerdo a la forma de su presentación final pueden ser: tintura (1:10), extractos fluidos (1:2), blandos (consistencia semejante a la miel), viscosos o firmes (masas plásticas líquidas en caliente), secos (en los que se ha desecado la miscella) y nebulizados (obtenidos por atomización del disolvente) (Cáceres, 1996).

La extracción para tamizaje consiste en realizar una extracción por maceración a temperatura ambiente con uno a tres disolventes con diferentes polaridades, generalmente diclorometano o hexano, éter o etanol y agua. Por la toxicidad y efectos farmacológicos de estos disolventes es preciso concentrar los extractos evaporando el disolvente a presión reducida y temperatura controlada (rotavapor) hasta alcanzar un estado de miel. En el caso de los extractos acuosos se suele concentrar por medio de liofilización. En esta forma los extractos son más estables y fáciles de almacenar y dosificar (Cáceres, 1996).

b. Aceites esenciales

Se refiere a tres formas de preparar líquidos oleosos para uso directo o bien, combinado. El primero se refiere a la extracción del aceite esencial por arrastre de vapor. La segunda

forma se refiere a plantas que tienen semillas oleaginosas con propiedades medicinales y que por prensado o extracción se obtiene un aceite. La tercera forma se refiere a plantas que por contener sustancias solubles o extraíbles en aceites vegetales pueden producir aceites medicinales (Cáceres, 1996).

i) Hidrodestilación

La hidrodestilación, se define como el proceso para obtener el aceite esencial de una planta aromática, mediante el uso del vapor saturado a presión atmosférica. Por efecto de la temperatura del vapor (100°C) en un cierto tiempo, el tejido vegetal se rompe liberando el aceite esencial (Palomino y Cerpa, 1999).

Cuando se usa vapor saturado o sobrecalentado, fuera del equipo principal, es llamado “destilación por arrastre de vapor”. Cuando se usa vapor saturado, pero la materia prima está en contacto íntimo con el agua que genera el vapor, se le llama “hidrodestilación” (Guenther, 1948; Palomino y Cerpa, 1999).

ii) Arrastre de vapor

La extracción por arrastre de vapor de agua, se lleva a cabo por la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por éste y otros “no volátiles”. Lo anterior, se logra por medio de la inyección de vapor de agua directamente en el interior de la mezcla, denominado “vapor de arrastre, sin embargo, su función no es la de “arrastrar” el componente volátil, sino condensarse en el matraz, formando otra fase inmiscible, que cederá su calor latente a la mezcla a destilar para lograr su evaporación. En este caso, se tendrán la presencia de dos fases insolubles a lo largo de la extracción (orgánica y acuosa). Por lo tanto, cada líquido se comportará como si el otro no estuviera presente. Cada uno ejercerá su propia presión de vapor y corresponderá a la de un líquido puro, a una temperatura de referencia. La condición más importante para que este tipo de extracción pueda ser aplicado, es que el componente volátil y la impureza sean insolubles, ya que el producto destilado volátil formará dos capas al condensarse, lo cual permitirá la separación del producto y del agua, fácilmente. Es necesario establecer que existe una diferencia entre una destilación por arrastre y una simple, ya que, en la primera, no se presenta un equilibrio de fases líquido-vapor entre los dos

componentes a destilar, como se da en la simple; por lo tanto, no es posible realizar diagramas de equilibrio, ya que en el vapor nunca estará presente “no volátil”, mientras esté destilando el volátil. Se obtiene un producto puro, que requiere decantación para ser separado del agua (Guenther, 1948).

2. Actividad biocida

Los bioensayos generalmente *in vitro* dan una idea preliminar de la posible bioactividad de un extracto crudo, fracción purificada o principio activo puro. Las técnicas de tamizaje pretenden orientar al farmacólogo, químico y farmacognosista con técnicas sencillas, a bajo costo y que puedan realizarse a un número grande de muestras en forma rápida, sencilla, reproducible y de bajo costo (Cáceres, 1996).

a. Tamizaje

Es una de las etapas iniciales de la investigación, permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados constituyen, únicamente, una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del “screening” farmacológico. Así, cuando una planta revela acción sobre el sistema nervioso central durante el tamizaje farmacológico y presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloidal. De la misma manera, el hecho de evidenciarse la presencia de flavonoides en el tamizaje fitoquímico y una acción anti-inflamatoria en el screening farmacológico, ésta última puede asociarse a la fracción de flavonoides. Esta fracción puede ser aislada y sometida a pruebas más específicas (Sharapin, 2000).

b. Tamizaje antimicrobiano

El principio del método involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobianos en un reservorio (discos de papel), aplicado sobre la superficie del agar, en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión. Se formará, así por difusión, un gradiente de concentración del antimicrobiano y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio. El diámetro obtenido dependerá, no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa del agar, su pH y composición, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, la temperatura, la velocidad de duplicación bacteriana, el tamaño y fase de crecimiento del inóculo (Bär, Både-Schuman, Krebs, & Cromme, 2009).

Para que los resultados sean confiables, los procedimientos deberán ser controlados y estandarizados cuidadosamente. El método recomendado por el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico, por su nombre en inglés: The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), se basa en los estudios de Bauer y colaboradores (Domig, et al., 2007; Bär, et al., 2009).

Este es el método descrito de manera más completa para el cual se han desarrollado tablas de interpretación que están respaldadas por datos clínicos y de laboratorio. El único método alternativo que ha sido estudiado adecuadamente y que demostró datos comparables de los diámetros de las zonas de inhibición, con precisión similar y correlación satisfactoria con la CIM, es la modificación de doble capa de Barry, García y Thrupp (Biedenbach & Jones, 2001; Di Bonaventura, D'Antonio, Catamo, Ballonce, & Piccolomini., 2002).

Este método es una alternativa aceptable para la normalización del inóculo en las pruebas de sensibilidad de aislamientos de gérmenes patógenos de rápido crecimiento, como *S. aureus*, Enterobacterias y *P. aeruginosa*. El método de doble capa en agar no es aplicable a las pruebas con otros microorganismos tales como *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., etc. (Biedenbach & Jones, 2001).

Las pruebas por cualquiera de los dos métodos pueden interpretarse con las mismas tablas de medida de los halos de inhibición si los resultados de las pruebas con las cepas controles se encuentran dentro de los rangos esperados (Bär, et al., 2009).

c. Concentración inhibitoria mínima (CIM)

La CIM ha sido el indicador más utilizado, en terapia antimicrobiana, durante décadas. Se la define como la concentración más baja de droga que previene el crecimiento visible de microorganismos, luego de, 18 a 24 horas de cultivo. Es intuitivamente fácil de concebir que, si un antibiótico, se mantiene en el organismo en concentraciones por encima de la CIM para determinada cepa de un microorganismo, será capaz de inhibir el desarrollo de esa bacteria con comodidad. Este concepto ha iluminado el avance de la ciencia durante mucho tiempo. Aunque últimamente, nuevos conceptos cambian las bases de algunos de los conocimientos que veníamos manejando, la CIM continúa siendo un parámetro fundamental, sin cuyo conocimiento no se tendría posibilidades de éxito en terapia antibacteriana. Por su parte la concentración bactericida mínima (CBM), representa la mínima concentración de antimicrobiano capaz de matar al 99,9% de los microorganismos inoculados luego de entre 18 y 24 horas de cultivo. Determinados efectos perjudiciales, para las bacterias, persisten luego que la exposición del microorganismo al antimicrobiano ha terminado. Se llama a esto “efecto post-antibiótico”. Aunque el efecto post-antibiótico fue observado hace ya muchos años (Eagle y cols, 1950), más recientemente se descubrió que virtualmente todos los antimicrobianos lo producen en mayor o menor medida (Bär, et al., 2009).

3. Antimicrobianos

La actividad antimicrobiana se utiliza para evaluar la actividad inhibitoria de una planta y sus derivados, la potencia de un compuesto, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga vegetal, el espectro de microorganismos inhibidos y la concentración de la droga en el organismo humano. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano perfectamente y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio (Cáceres, 1996).

La medición de esta actividad puede hacerse por métodos de difusión y dilución. El método de difusión se usa como procedimiento cualitativo, semicuantitativo y a veces cuantitativo, generalmente los microorganismos son categorizados como resistente, intermedio o susceptible para cada agente antimicrobiano, estos son aplicados en forma de discos de papel filtro y se conoce como método de Bauer-Kirby (Cáceres, 1996).

El método de dilución se usa para determinar la CIM que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir o matar al microorganismo. El método de Mitscher, *et al.* (1972) Es el recomendado para el tamizaje de productos naturales, es muy reproducible, sensible y relativamente fácil de estandarizar y procesar gran cantidad de muestras. La CIM es la concentración más baja en la que no hay crecimiento visible; esta prueba se puede realizar en caldo (tubo) y en agar (placa) (Cáceres, 1996).

Los procedimientos con antifúngicos son similares a los antibacterianos. Las pruebas se complican por ciertas características de los hongos, que incluyen dimorfismo y requerimientos de crecimientos por tiempo prolongado. Hay tres métodos para pruebas de susceptibilidad con antifúngicos, dilución en caldo, dilución y difusión en agar, todos se basan en los mismos principios de los utilizados para agentes antibacterianos (Cáceres, 1996).

Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana o antibiogramas, son métodos *in vitro* que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específica y estandarizada (Domig, *et al.*, 2007). La meta principal del estudio de susceptibilidad, es proveer al clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada en pacientes con una infección específica. La metodología usada, para realizar el estudio de susceptibilidad, toma en consideración algunos de estos factores para determinar más eficientemente cómo un microorganismo podría responder *in vivo* a un determinado antibiótico (Domig, *et al.*, 2007).

Difusión en agar. Este método, que es el más frecuentemente usado, es también llamado difusión por disco o Kirby-Bauer, En este caso, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16 a 18 horas a 35°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco, puede ser convertido a las categorías de susceptible, intermedio o resistente (S, I o R), de acuerdo a las tablas publicadas por el NCCLS. Si las recomendaciones para realizar este método son fielmente seguidas, las

categorías se correlacionan muy bien con los resultados de los otros métodos (Klancnik, Piskernik, Jersek & Mozina, 2010).

Dilución en agar. Es considerado el método de referencia. En este método, placas conteniendo una determinada concentración de un antibiótico son inoculadas con el microorganismo en estudio y luego incubadas por 16 a 18 horas. Después de la incubación, se examina si el organismo crece o no en cada una de las placas, con lo cual se determina la CIM para el antibiótico. Si una cepa de *S. aureus* crece en una placa que contiene una concentración de oxalina de 0.06 µg/ml, pero no crece en una placa con una concentración de oxalina 0.12 µg/ml, significa que la CIM de oxalina que se requiere para inhibir a ese organismo es 0.12 µg/ml (Klancnik, et al., 2010). Dilución en placa. El conteo de poblaciones microbianas por dilución en placa es un método simple y rápido para la cuenta viable de células microbianas en el suelo. Sin embargo, la cuenta obtenida es generalmente 10 a 100 veces menos que aquella determinada por cuenta directa por microscopia. Las razones para esta discrepancia incluyen la exclusión de la cuenta no viable directamente en el suelo y la inhabilidad para proveer apropiados nutrimentos en el medio de crecimiento, para obtener la cuenta total en placa (Klancnik, et al., 2010).

4. Microdilución

Es un método cinético de determinación del poder bactericida. Se valora la capacidad de matar en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de antimicrobiano. En este sentido es complementario de la CMB (Klancnik, et al., 2010). Consiste en enfrentar un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo. Las concentraciones normalmente son la CMI, 2 y 4 veces la CMI y, a veces, las concentraciones que se alcanzan en suero, líquido o tejidos. Hay un control sin antibiótico. Se hace un recuento a las 0, 2, 4, 8, 24 y 48 horas habitualmente. En antibióticos muy bactericidas, puede hacerse a las 1, 2, 4, 5 y 24 horas. Los recuentos se expresan en escala semilogarítmica en el eje de las ordenadas y el tiempo en escala aritmética de las abscisas. Para facilitar la operación se puede utilizar un papel milimetrado. El poder bactericida se determina en la caída de 3 logaritmos decimales en un tiempo determinado. Es imprescindible el cálculo de la CMI preferentemente por el método de dilución en caldo (Klancnik, et al., 2010).

III. JUSTIFICACIÓN

Guatemala contiene uno de los pulmones del planeta. Desafortunadamente, debido a la tala desmedida e incontrolada, están siendo eliminados muchos árboles, teniendo como uno de los resultados intentos de reforestación sin estudios previos del ecosistema, por lo que son insatisfactorios e insuficientes. Este es el caso del pinabete (*A. guatemalensis*), el cual está en peligro de extinción, debido a que es utilizado en la época navideña, por lo que existe tala desmoderada y, como esta especie tiene la capacidad de producir semillas cada dos años, es más difícil conservarlo. Esta especie soporta un clima frío, con temperaturas bajo cero, por lo que necesita un suelo con alto contenido en materia orgánica. Se ha podido estudiar, que su crecimiento y su conservación se da con mayor facilidad, gracias a la ayuda de especies vegetales nodrizas, que habitan a sus alrededores.

Se realizarán los análisis biocidas (Bacterias: *C. neoformans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. aureus*; Levaduras: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae*; Hongos: *A. fumigatus*, *A. niger*, *M. gypseum*, *M. smegmatis*, *T. mentagrophites*, *T. rubrum*; y, Crustáceos: *Artemia salina*) sobre seis especies de plantas nodrizas: *A. elongata*, *B. vaccinioides*, *B. megalcephala*, *R. trilobus*, *S. polycephala*, *S. microphyllus*, que han demostrado ser útiles para facilitar el crecimiento de pinabetes.

Se analizarán los beneficios potenciales de las seis plantas en el ámbito de la salud, determinando cuáles podrían tener propiedades medicinales, debido a que son plantas de las que su conocimiento es escaso y, en algunos, casos desconocidos. En este caso particular, se investigará la actividad biocida. Por ser un área rural, se puede contraer infecciones fácilmente. Para poder ayudar a eliminarlas se quieren encontrar vías alternativas, que no sean dañinas ni para el ambiente ni que tengan efectos secundarios no deseados. De esta manera, se quiere estudiar, también, cuáles son los posibles usos medicinales de estas especies, además de su uso como especies nodrizas.

Todo ello, con el fin de favorecer a la población de las aldeas aledañas, proveyendo información útil para la salud, ya que se trata de personas que prefieren la medicina natural.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Demostrar la bioactividad de seis plantas nodrizas de bosques de pinabete (*A. guatemalensis*), de Ixchiguán, San Marcos.

B. Objetivos Específicos

1. Recolectar e identificar seis especies nodrizas del Bosque Los Cuervos.
2. Preparar extractos con etanol al 70% y aceite esencial de las seis especies.
3. Demostrar la actividad biocida (Bacterias: *C. neoformans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. aureus*, Levaduras: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae*; y hongos: *A. fumigatus*, *A. niger*, *M. gypseum*, *M. smegmatis*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *Artemia salina*) de los extractos obtenidos, por medio de tres métodos.
4. Demostrar la actividad antioxidante de los extractos, por medio de la actividad atrapadora del radical libre DPPH y el método de Folin – Ciocalteau

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

1. Universo

Plantas nodrizas provenientes de bosques de *Abies guatemalensis* de Ixchiguán, San Marcos, Guatemala.

2. Muestra

Seis especies de plantas nodrizas: *Acaena elongata*, *Baccharis vaccinioides*, *Buddleja megalcephala*, *Rubus trilobus*, *Stevia polycephala* y *Symphoricarpos microphyllus* provenientes de bosques de *Abies guatemalensis* de Ixchiguán, San Marcos, Guatemala.

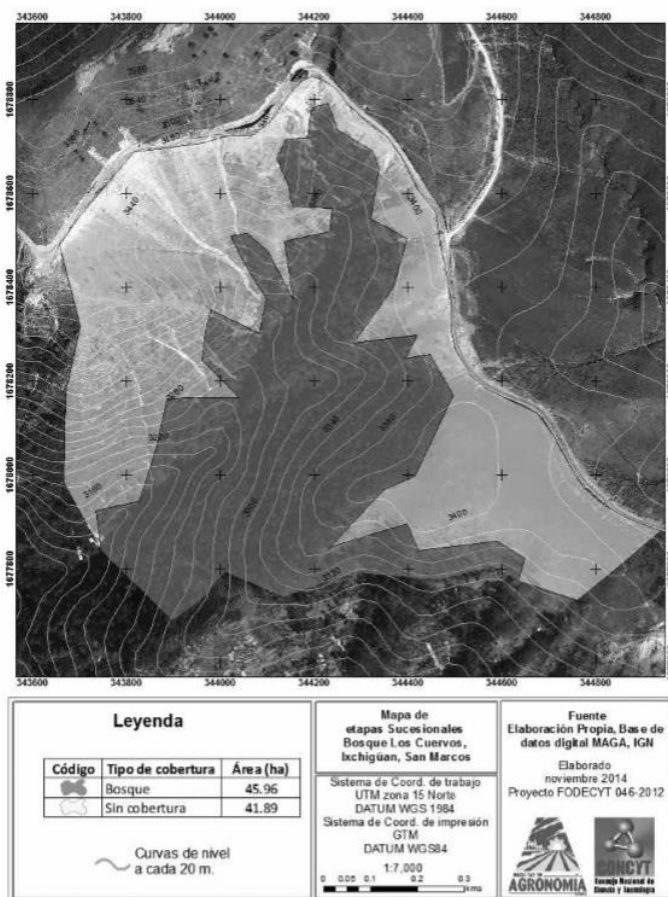


Figura 1. Mapa del bosque Los Cuervos. Área clara: lugar de recolección de muestras. Coordenadas 15° 10' 03" a 15° 14' 53" latitud N y 91° 17' 18" y 91° 59' 23" longitud O.

B. Materiales

1. Recursos Humanos

Investigadores: Br. Gladys Stella Cruz Bolaños y Br. Deyling Michelle Maldonado de León

Asesor: Lic. Armando Cáceres

Colaborador: Ing. Agr. Vicente Martínez

2. Recursos materiales

a. Cristalería

- Embudo
- Erlenmeyer de 250 mL y 500 mL
- Láminas cubreobjetos
- Láminas portaobjetos
- Tubos con tapón de rosca estériles
- Tubos de ensayo
- Vaso de precipitar (2 L)
- Vaso de precipitar (500 mL)

b. Equipo

- Asa de nicromo en argolla
- Autoclave (25 L)
- Balanza analítica
- Balanza semianalítica
- Bomba de oxígeno para pecera
- Bomba de vacío
- Cámara de Neubauer
- Campana bacteriológica
- Campana bacteriológica con flujo laminar
- Campana de extracción de gases

- Centrífuga
 - Computadora con procesador de datos
 - Congelador a -20°
 - Congelador a -80°
 - Desecadora
 - Espectrofotómetro tipo lector de ELISA con diferentes longitudes de onda
 - Estereoscopio
 - Estufa
 - Gradilla
 - Impresora
 - Incubadora a 27 °C y 35 °C
 - Jarra Gas - Pack
 - Lámpara de luz blanca
 - Lector ELISA
 - Mechero Bunsen
 - Micropipeteadores automáticos
 - Microscopio de luz blanca
 - Neoclevenger
 - Pinzas
 - Pipetas automática (100 – 1000 µL)
 - Pipetas automática (20 - 200 µL)
 - Pipetas automáticas (10 – 100 µL)
 - Programa de computadora Finney (DOS)
 - Refrigeradora a 4°C
 - Rotavapor
 - Sonicador
 - Soporte de metal
 - Vortex
- c. Materiales
- Algodón

- Cajas de Petri estériles
- Cajas de Petri simples
- Campanilla de Durham
- Capilares calibrados
- Cedazo
- Cinta adhesiva
- Cinta testigo
- Espátulas
- Guantes
- Hisopos
- Hojas de papel bond tamaño carta
- Marcador indeleble
- Membranas de nitrato de celulosa con 45 μm de diámetro
- Microplaca de fondo plano de 96 pozos
- Papel filtro
- Papel mayordomo
- Papel parafilm
- Pecera para cultivo
- Percolador
- Placas de 96 pozos estériles de fondo plano
- Placas de 96 pozos no estériles de fondo plano
- Placas TLC
- Plantilla para siembra
- Puntas amarillas (200 μL)
- Puntas azules (1000 μL)
- Regla (mm)
- Sal de mar
- Sobres para crear sistema microarofílico (Campy-pak BBL)
- Viales
- Tubos Eppendorf 1.5 mL

- d. Microorganismos
- i) Bacterias
- *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264
 - *Escherichia coli* ATCC 25922
 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - *Salmonella typhi* ATCC 14028
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- ii) Levaduras
- *Candida albicans* ATCC 10231
 - *Candida tropicalis* C 1312000
 - *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763
- iii) Hongos
- *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934
 - *Aspergillus niger* ATCC 9029
 - *Microsporum gypseum* C1152000
 - *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607
 - *Tricophytum mentagrophytes* ATCC 9972
 - *Tricophytum rubrum* C113200
- iv) Otros
- Huevos de *Artemia salina*
 - Larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*
- e. Colorantes:
- Colorantes de Gram
- f. Estándar:
- Estándar de Imipenem
 - Estándar de Mac Farland 0.5
- g. Medios de cultivo:
- Agar Müller Hinton
 - Agar Sabouraud
 - Agar tripticasa soya

- Agar-agar
 - Caldo Müller Hinton
 - Caldo nitrado
 - Caldo tripticasa soya y glicerol al 15%
 - Sangre de carnero
- h. Antibióticos:
- Antibiótico Gram + y -
 - Antifúngico
 - Solución de eritromicina
- i. Reactivos:
- Ácido gálico
 - Aceite mineral
 - Agua de chorro
 - Agua desmineralizada tridestilada
 - Agua destilada
 - Alcohol
 - Alfa - Naftilamida
 - Dextrosa
 - DPPH
 - Etanol 50%
 - Etanol 70%
 - Etanol 95%
 - Extracto de etanol 95%
 - Extractos de plantas a investigar
 - Folin-Ciocalteu
 - Fosfato diácido de potasio
 - Hexano
 - Hipurato de sodio
 - NaCO_3
 - Ninhidrina

- Peptona
- Peróxido de hidrógeno al 3%
- Reactivo de oxidasa
- Reactivo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium)
- Solución salina (0.85%)
- Sulfato de sodio
- Temefos

C. Recursos institucionales

- Laboratorio de Bioensayos No. 1, Departamento de Citohistología
- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT)

D. Procedimiento

1. Obtención de extractos y aceites vegetales

a. Extracto vegetal

Seleccionar el material vegetal y lavar con agua potable en una canasta calada y con hipoclorito de calcio (10 ppm) para desinfectar. Seguidamente, colocar el material en bandejas con papel kraft para secar, pasar por un tamiz #5 y recolectar el material en bolsa plástica, sellada e identificada (Menéndez, 2007).

Pesar 100 g de material vegetal, previamente molido y humedecer con etanol al 70% o 50% según sea el caso, dejándolo reposar durante 15 min. Posteriormente, agregar al percolador el material vegetal uniformemente, añadiendo etanol hasta que cubra la totalidad de la materia vegetal. Reposar durante 24 - 48 hr. Abrir la llave del percolador y coleccionar el líquido lentamente. Determinar los sólidos totales del menstuo de la primera percolación y repetir el procedimiento hasta, que la cantidad de sólidos totales sea la mínima posible. Por último, concentrar los menstuos de las percolaciones, comenzando con el más diluido, hasta obtener un extracto melcochoso que se colocó en un cristizador el cual fue almacenado en

una deshidratadora durante 2 a 3 meses; hasta obtener un material seco o melcochoso (Menéndez, 2007).

b. Aceite esencial

El material vegetal se corta en trozos pequeños y se coloca en la cámara de extracción. Se calienta el agua hasta ebullición y se mantiene el hervor durante una hora, observándose la condensación de dos fases líquidas que posteriormente son retiradas y separadas. En las destilaciones por arrastre de vapor más comunes, la fase acuosa en una ampolla de decantación y se extrae con hexano u otro disolvente orgánico de bajo punto de ebullición (éter etílico, diclorometano, etc.) (Lamarque, Zygadlo, López, Torres, y Maestri, 2008).

2. Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro*

Consta de varias etapas:

a. Dilución y filtración del extracto.

Pesar 30 mg de cada extracto a ensayar y disolver en 3 mL de etanol, al 50%. Agitar y filtrar en una campana de flujo laminar (Zapata, Duran, Stashenko, Betancur-Galvis, y Mesa-Arango, 2010).

b. Preparación de Agar-Planta.

Preparar 2 tubos, con 9 mL de agar Müller Hinton, para cada extracto y esterilizar a 121°C durante 15 min. Enfriar a 50°C. Luego, en una caja de Petri simple, agregar 1 mL de la solución del extracto filtrado y 9 mL de agar Müller Hinton. Tapar y homogenizar con movimientos circulares. Dejar solidificar e incubar a 36°C durante 24 h, para comprobar su esterilidad y guardar en refrigeración hasta el momento de su utilización (Zapata, et al, 2010).

c. Preparación del inóculo.

Purificar el microorganismo a utilizar. Inocular en una caja de Petri, con agar Tripticasa Soya. Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo, con 0.5 mL de caldo

tripticase soya. Incubar ambos a 36°C, durante 24 h. Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de solución salina estéril al 0.85% (Dilución 1:100) (Zapata, et al., 2010).

d. Demostración de la actividad antibacteriana.

Inocular en las cajas con Agar-Planta una asada de cada uno de los microorganismos. Utilizar el patrón de la plantilla y realizar tres repeticiones por microorganismo. Dejar reposar durante 10 min e incubar a 36°C, durante 24 h. Utilizar como control negativo 9 mL de Agar Müller Hinton con 1 mL de etanol al 50% (Zapata, et al., 2010).

3. Tamizaje de la actividad antimicótica *in vitro*

Preparar tubos con 13.5 mL de Agar Sabouraud para ser vertidos en cajas de Petri estériles e incubar a 36°C, durante 24 h para verificar esterilidad. Posteriormente, preparar el medio de Takashio y agregar 6 mL en tubos con tapón de rosca y dejar solidificar con slant e incubar a 25°C, durante 48 h, para descartar contaminación. Luego, sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 27°C, durante 21 días, hasta obtener crecimiento homogéneo. Agregar, a cada tubo, 2 mL de agua destilada estéril y desprender el hongo, con ayuda de una varilla, para ser trasvasado a viales con tapa de rosca. Realizar un conteo de esporas en cámara de Neubauer. A continuación, abrir 4 agujeros en las cajas de agar-planta en forma equidistante y añadir en ellos 30 µL de la suspensión de esporas. Incubar a 27°C, durante 14 días. Utilizar, para este proceso, como control negativo una caja con Agar Sabouraud y 1.5 mL de alcohol al 70% (Zapata, et al., 2010).

4. Tamizaje de la actividad antilevadura *in vitro*

Preparar tubos, con 9 mL de Agar Müller Hinton, para vertir en cajas de Petri estériles. Dejar solidificar e incubar a 36°C, por 24 h, para verificar la esterilidad del mismo. Sembrar la cepa, en una caja con Agar Sabouraud e incubar a 36°C, por 48 h. Tomar un inóculo del cultivo fresco para sembrar en 5 mL de caldo tripticasa soya e incubar a 36°C, por 24 a 48 h. Tomar, con pipeta estéril, 0.5 mL y suspender en 4.5 mL de solución salina estéril (dilución 1:10). A continuación, inocular con asa en punta la suspensión de levaduras, en cada sección,

según la plantilla e incubar a 36°C, por 48 h. Para el control negativo, sembrar por estrías la levadura en una caja con Agar Sabouraud (Zapata, et al., 2010).

5. Tamizaje de la actividad larvicida

Pesar 1 mg del extracto a ensayar y disolver con 1 mL de agua de chorro, reposada. Disolver con un Vórtex y en la microplaca, agregar, por triplicado (en 3 pozos diferentes) 100 µL del extracto disuelto y 100 µL de agua del chorro reposada con 10 a 15 larvas. Para el control negativo, colocar en otro pozo, 200 µL agua del chorro reposada con 10 a 15 larvas e incubar a temperatura ambiente (25 a 28°C) en un lugar oscuro, durante 24 h (Arana, 2002; Zapata, et al., 2010).

6. Tamizaje de la actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*

Para el tamizaje de la actividad citotóxica contra nauplios, de *A. salina*, se inicia con la preparación del agua de mar en un vaso de precipitar. Se disuelven 35 g de sal de mar, en un litro de agua destilada, y se hace una marca en el vaso para indicar el volumen de agua. Luego, se hierve por 30 min y completar el volumen, que se evaporó, según la marca; se filtra y refrigera hasta el momento de usar. La solución es estable por un mes, a temperatura (6 a 8°C). Se procede con el cultivo de *A. salina*. Se forra la mitad de una pecera con plástico oscuro, a la vez, colocar en un vaso de precipitar 200 mL de agua de mar y airear por 30 min. Al culminar el tiempo, colocar el agua en la pecera y agregar, aproximadamente, 40 mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro) e incubar por 48 h, a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar, los nauplios (larvas), pasan al área abierta de la pecera (lado con luz), para lograrlo no mover la pecera después de agregados los huevecillos, ya que pasarían del área cerrada y, esto, no permite el correcto conteo de nauplios (Zapata, et al., 2010).

7. Actividad atrapadora del radical libre DPPH•

Utilizar 100 µL de extracto y 900 µL de la solución de DPPH, para realiza el ensayo. Como referencia del reactivo utilizar la misma cantidad de DPPH y 100 µL del solvente de la muestra. Luego de 30 min de reacción a temperatura ambiente y en la oscuridad, leer la

absorbancia a una longitud de onda de 517 nm (Rojano, Gaviria, Gil, Saez, Schinella, y Tournier, 2008).

8. Método Folin-Ciocalteu

Iniciar la preparación de la curva de calibración, utilizar una solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL) y tomar volúmenes de 0 μ L a 160 μ L en intervalos de 20 μ L, completar el volumen de cada uno a 500 μ L con agua destilada. Para la determinación de fenoles en una muestra, pesar 5 mg de extracto y disolver en 1 mL de agua destilada, realizar una dilución 1:10 en agua destilada y, de esta solución, tomar 100 μ L, para después completar a 500 μ L con agua destilada. A cada uno de los estándares y muestras, previamente preparados, adicionar 250 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N y agitar por 5 min. Posteriormente, adicionar 1 250 μ L de Na_2CO_3 al 20% y dejar reposar por 2 hr (Gracia, 2007).

E. Observación y reporte

1. Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro*

Si se produce un crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo, la actividad se considera negativa. Si no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo, la actividad se considera positiva. La presencia de microorganismos fuera de la inoculación se considera como contaminación (Zapata, et al., 2010).

2. Tamizaje de la actividad antimicótica *in vitro*

Para la lectura e interpretación de resultados, medir la colonia del hongo en mm y calcular el porcentaje de inhibición. Comparar, el diámetro, contra el de las colonias en las cajas control. Se considera como positivo, los extractos que reducen el diámetro de la colonia un 75% (Zapata, et al., 2010).

3. Tamizaje de la actividad antilevadura *in vitro*

Se considera como actividad negativa, el crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. Actividad positiva, si no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. Contaminación si hay presencia de microorganismos fuera de la inoculación (Zapata, et al., 2010).

4. Tamizaje de la actividad larvica *in vitro*

Se cuenta en el estereoscopio el número de larvas muertas y determinar la CL₁₀₀ (Concentración letal al 100%) (Zapata, et al., 2010).

5. Determinación de citotoxicidad

Posteriormente, contar en el estereoscopio, el número de nauplios muertos. Agregar metanol a los pozos, esperar 15 min y contar de nuevo todos los nauplios. Si se observan nauplios muertos en el control negativo, la prueba no es válida y hay que repetirla (Menéndez, 2007).

6. Actividad atrapadora del radical libre DPPH•

Leer la absorbancia, a una longitud de onda de 517 nm. Calcular el porcentaje de inhibición expresada como μ M del compuesto (Rojano, et al., 2008).

7. Método de Folin-Ciocalteu

La absorbancia se mide a 760 nm. Expresar los resultados en mg de ácido gálico por g de extracto (mg AG/g extracto) (Gracia, 2007).

F. Diseño del estudio

El presente proyecto es un estudio analítico de tipo experimental. Midiendo las siguientes variables, con el número de repeticiones.

1. Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro* con 3 repeticiones.
2. Tamizaje de la actividad antimicótica *in vitro* con 3 repeticiones.
3. Tamizaje de la actividad antilevadura *in vitro* con 3 repeticiones.
4. Tamizaje de la actividad larvica *in vitro* con 3 repeticiones.
5. Determinación de citotoxicidad con 3 repeticiones.
6. Actividad atrapadora del radical libre DPPH con 3 repeticiones.
7. Método de Folin – Ciocalteu con 3 repeticiones.

G. Análisis de resultados

1. Tamizaje de la actividad antibacteriana in vitro

Si se produce un crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo, la actividad se considera negativa. Si no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo, la actividad se considera positiva.

2. Tamizaje de la actividad antimicótica in vitro

Para la lectura e interpretación de resultados, medir la colonia del hongo en mm y calcular el porcentaje de inhibición. Comparar, el diámetro, contra el de las colonias en las cajas control. Se considera como positivo, los extractos que reducen el diámetro de la colonia un 75%.

3. Tamizaje de la actividad antilevadura in vitro

Se considera como actividad negativa, el crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. Actividad positiva, si no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. Contaminación si hay presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

4. Tamizaje de la actividad larvícida in vitro

Se cuenta en el estereoscopio el número de larvas muertas y determinar la CL50 (Concentración letal al 50%).

5. Determinación de citotoxicidad

Posteriormente, contar en el estereoscopio, el número de nauplios muertos. Agregar metanol a los pozos, esperar 15 min y contar de nuevo todos los nauplios. Si se observan nauplios muertos en el control negativo, la prueba no es válida y hay que repetirla.

6. Actividad atrapadora del radical libre DPPH•

Leer la absorbancia, a una longitud de onda de 517 nm. Calcular el porcentaje de inhibición expresada como μM del compuesto.

7. Método de Folin-Ciocalteu

La absorbancia se mide a 760 nm. Expresar los resultados en mg de ácido gálico por g de extracto (mg AG/g extracto).

V. RESULTADOS

Se investigaron seis especies vegetales nodrizas provenientes del bosque “Los Cuervos” en Ixchiguán, en el departamento de San Marcos, a los cuales se les realizaron extractos etanólicos. El material vegetal se desecó en horno, hasta obtener el 10% de humedad, a lo que se le llama “droga vegetal”.

Los extractos etanólicos mostraron rendimientos *A. elongata* (Mozote) 70%; *B. vaccinioides* (Arrayán) 70%; *B. megalcephala* (Salvia) 70%; *R. trilobus* (Mora) 50%; *S. polycephala* (Chicajol) 70% y *S. microphyllus* (Malacate) 50% (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de rendimiento de extractos vegetales

Parámetro	Extractos					
	<i>A. elongata</i>	<i>B. vaccinioides</i>	<i>B. megalcephala</i>	<i>R. trilobus</i>	<i>S. polycephala</i>	<i>S. microphyllus</i>
Humedad	7.8	8.3	7.9	9	8.7	8
Etanol	70	70	70	50	70	50
Rendimiento	37.99	40.53	36.22	39.33	35.92	38.58

El tamizaje de la actividad antibacteriana en agar-planta demostró que los seis extractos presentan alguna actividad contra las bacterias *B. subtilis*, *E. coli*, *M. smegmatis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. typhi* (Tabla 4).

Tabla 4. Tamizaje de la actividad antibacteriana

Bacteria	Especies					
	A. <i>elongata</i>	B. <i>vaccinioides</i>	B. <i>megalocephala</i>	R. <i>trilobus</i>	S. <i>polycephala</i>	S. <i>microphyllus</i>
<i>S. aureus</i>	-	+	+	+	+	+
<i>S. typhi</i>	-	-	-	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>	-	-	±	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	+	-	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	±	+	-	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	+	+	+
<i>B. subtilis</i> subesp. <i>Spizizenii</i>	-	-	-	±	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	+	±

(+): hay actividad; (-): no hay actividad; (±): indeterminado

A todos los extractos que tuvieron actividad al tamizaje de 1 mg/mL se les realizó la prueba de CIM en placas de microtitulación; sin embargo, ninguna presentó actividad a esa concentración.

La actividad antilevadura y antimicótica demostró que no tienen actividad sobre los microorganismos, ya que no hubo ningún impedimento para que éstos crecieran.

La actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina* y la actividad larvicida contra *A. aegypti* y *Culex* sp. arrojó un resultado de >1 gramo. Se utilizaron larvas de *Culex* sp., dado que no había disponibilidad de larvas de *Anopheles albimanus* en el momento del análisis. Esto se debe a que de las 10 larvas que se analizaron, ninguna murió durante el análisis con el extracto. Teniendo como control positivo Dimetilsulfóxido (DMSO), en el cual todas las larvas murieron. Por lo que se demuestra que no tienen actividad tóxica contra estos organismos.

Tres extractos demostraron tener alguna actividad antioxidante. La mejor actividad atrapadora de radicales libres evaluados por DPPH se demostró en *A. elongata* (CI₅₀ de 0.22 ±

0.01 mg/mL) y *R. trilobus* (CI_{50} 0.32 ± 0.01 mg/mL); y una actividad moderada en *B. megalcephala* (CI_{50} 0.76 ± 0.04 mg/mL); las otras especies demostraron actividad antioxidante menor (Tabla 5). Ninguna de las especies demostró concentraciones importantes de fenoles totales, aunque *A. elongata* y *B. vaccinioides* tuvieron concentraciones entre 0.043 y 0.046 mgAG/g.

Tabla 5. Actividad atrapadora del radical libre DPPH• y determinación de fenoles totales por método de Folin – Ciocalteau

Extracto	DPPH• CI_{50} (mg/mL)	Fenoles mg AG/g
<i>A. elongata</i>	0.22 ± 0.01	0.043 ± 0.045
<i>B. vaccinioides</i>	1.61 ± 0.02	0.046 ± 0.043
<i>B. megalcephala</i>	0.76 ± 0.04	0.016 ± 0.033
<i>R. trilobus</i>	0.32 ± 0.01	0.026 ± 0.005
<i>S. polycephala</i>	1.18 ± 0.11	0.028 ± 0.075
<i>S. microphyllus</i>	1.61 ± 0.02	0.012 ± 0.049
Estándares		
Rutina	0.167 ± 0.006	
Quercetina	0.075 ± 0.001	
Vitamina C	0.088 ± 0.011	
Trolox	0.115 ± 0.001	
TBHQ	0.115 ± 0.001	

El porcentaje de rendimiento de los aceites esenciales oscila entre 0.03 y 0.04% para las seis especies vegetales nodrizas.

VI. DISCUSIÓN

Los aceites esenciales que se obtuvieron por medio del método de Neoclevenger demostró muy bajo rendimiento y no fue posible analizarlos, dado que se considera que cantidades o trazas insignificantes. Los porcentajes de rendimiento obtenidos fueron bajos: *A. elongata* 0.03%, *B. vaccinioides* 0.28%, *B. megalcephala* 0.417%, *R. trilobus* 0.31%, *S. polycephala* 0.36%, *S. microphyllus* 0.34%. Por consiguiente, se concluye que el aceite esencial no es un componente importante de dichas especies. Por otra parte en la revisión de la literatura realizada, ninguna de las especies del estudio ha demostrado la presencia de aceites esenciales en estudios anteriores (González, 2004; Zapata, et al., 2010).

Aunque la mayoría de extractos vegetales presentaron alguna actividad ante las bacterias analizadas, al hacerse un ensayo más a fondo la CIM demostraron que no poseen actividad. Lo anterior coincide con el estudio de Tortoriello, Meckes y Villarreal (1995) quien informaron leve actividad de *B. vaccinioides* sobre bacterias gram positivo. Por otra parte, Bussmann, y colaboradores (2010) observaron que los extractos etanólicos de *A. elongata* tienen un leve efecto en *S. aureus* y los extractos acuosos tienen un leve efecto sobre *E. coli*.

Ninguno de los extractos analizados demostró actividad contra *A. salina*, *A. aegypti* y *Culex* sp., lo cual es similar a lo informado por Ley De Coss, Cobos, Hernández y Guerra (2011) quienes no encontraron actividad alguna de los extractos sobre los protozoarios ciliados rumiales.

Ninguno de los extractos de las especies colectadas demostró una actividad biocida, si bien en el tamizaje de la actividad biocida antibacteriana se mostró cierta actividad inhibitoria menor de 1 mg/mL, en el caso de las otras actividades biocidas no se demostró ninguna actividad contra larvas de *A. aegypti*, *Culex* sp., *Artemia salina*, hongos y levaduras.

La posible variación de actividad podría deberse a que son cepas diferentes, el efecto de la altura (Ixchiguan se encuentra a 3 200 msnm, la ciudad de Guatemala está a 1 500 msnm), la época del año en que se realizó la colecta (fue en época seca entre febrero y marzo de 2013) o factores de laboratorio, como la metodología de extracción o de análisis.

La actividad más interesante encontrada en este estudio fue la actividad atrapadora de radical libre por medio de DPPH, ya que tres especies (*A. elongata*, *B. megalcephala* y *R. trilobus*) tuvieron una CI_{50} menor a la de los estándares de control (rutina, Trolox® y TBHQ), aunque menores que quercitina y vitamina C. En el caso de los fenoles totales se encontró moderada actividad en *A. elongata* y *B. vaccinioides*, pudiendo explicar en el primer caso que la actividad sea consecuencia en el contenido de fenoles. Se hizo una revisión de literatura en bases de datos, tanto en Google Scholar ® y en Scopus ® y no se encontró actividad antioxidante de ninguna de las especies del estudio; por consiguiente, podríamos concluir que esta es la primera vez que se describe la actividad antioxidante en estas especies.

Debido a que el proyecto pretendía encontrar alguna actividad biológica de las plantas en estudio para que al aprovechar su uso, los pobladores cuidaran estas especies, no se demostró ninguna actividad biocida que respalde esta pretensión. Sin embargo, los hallazgos más importantes se refieren a la actividad antioxidante observada, donde en tres especies se encontró actividad interesante. 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 para conocer las moléculas responsables de la actividad antioxidante y definir su posible aplicación como antioxidantes para la prevención o tratamiento de patologías humanas o bien, para la preservación de alimentos o uso cosmético.

VII. CONCLUSIONES

1. Se recolectaron seis especies vegetales nodrizas, identificadas como *A. elongata*, *B. vaccinioides*, *B. megalcephala*, *R. trilobus*, *S. polycephala*, *S. microphyllus*.
2. El porcentaje de rendimiento de los aceites esenciales que presentan las plantas nodrizas está entre los límites mínimos aceptables como indicadores de presencia.
3. Ninguno de los extractos analizados demostró actividad biocida.
4. Se encontró moderada actividad antioxidante frente al radical DPPH en tres especies (*A. elongata*, *B. vaccinioides* y *R. trilobus*), pero en ningún caso en concentraciones menores que los estándares utilizados.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Debido a que los extractos presentan un rendimiento bueno se pudo trabajar con suficiencia y por ser estables a largo tiempo pueden usarse para otras determinaciones.
2. A pesar de la presencia de aceites esenciales, éstos son muy volátiles, imposibilitando su utilización para análisis posteriores.
3. Continuar estudios de bioactividad y composición fitoquímica de las especies.
4. Continuar los estudios necesarios para encontrar alguna bioactividad que permita asegurar el interés de la población en cuidar las plantas, que ayudan a la sobrevivencia de *A. guatemalensis*.
5. Según el análisis de tierras, recomendar la siembra de las plantas nodrizas para una mejora en la siembra de otras plantas, dado que tienen una fuerte actividad antioxidante y presencia de compuestos fenólicos.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, A., Camacho, J., Chino, S., Jácquez, P. y López, M. (1994). *Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*. México: Instituto Mexicano del Seguro Social.
- 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.
- Arana, G. (2002). *Determinación de la actividad larvica de 18 especies de plantas detectadas por etnobotánica y bioprospección en Guatemala*. (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Bailey, L. H., & Bailey, E. Z. (1976). *Hortus* (3rd ed.). New York: MacMillan.
- Bär, W., Både-Schuman, U., Krebs, A. & Cromme, L. (2009). Rapid method for detection of minimal bacterial concentration of antibiotics. *Journal of Microbiological Methods*, 77, 85 - 89.
- Bello-Gutiérrez, J. (2012). *Calidad de vida, alimentos y salud humana: Fundamentos científicos*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Berlin, B., Breedlove, D. & Raven, P. (1974). *Principles of Tzeltal Plant Classification: An introduction to the Botanical Ethnography of a Mayan-Speaking People of Highlands Chiapas*. United States of America: Academic Press, INC.
- Berlin, E. & Berlin, B. (1996). *Medical ethobiology of the highland maya of Chiapas, Mexico: The gastrointestinal disease*. New Jersey: Princeton University Press.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). *Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional*. Recuperado el 21 de Noviembre de 2012, de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7711>
- Biedenbach, D. J. & Jones, R. N. (2001). In vitro activity of linezolid (U-100766) against *Haemophilus influenzae* measured by three different susceptibility testing methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 49 - 53.
- Breedlove, D. E. (1986). *Flora de Chiapas* (Vol. 4). Universidad Nacional Autónoma de México: Listados Florísticos de México
- Brown, B. A. (2000). Infections, due to nontuberculosis mycobacteria. En G. Mandel, *Principle and practice of infectious diseases* (pp. 2630 - 2636). Philadelphia: Churchill Livingstone.

- 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.
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria USAC.
- Castro, H. y Ledea, O. E. (2011). Determinación de la bioactividad in vitro de la Poliapatita. *Bioingeniería y Física Médica Cubana*, 12(1), 30 - 34.
- Chan, V., Sherman, P. & Bourke, P. (2006). *Bacterial genomes and infectious diseases*. Totowa: Humana Press.
- 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.
- Crump, J., Luby, S. & Mintz, E. (2004). The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ*, 82(5), 346-353.
- De La Hoz, I. M. y García Cuán, A. (2014). El diagnóstico diferencial de *Aspergillus fumigatus* es una necesidad en ambientes carboníferos. *Biociencias*, 9(2), 87 - 96.
- Di Bonaventura, G., D'Antonio, D., Catamo, G., Ballonce, E. & Piccolomini, R. (2002). Comparison of Etest, agar dilution, broth microdilution and disk diffusion methods for testing in vitro activity of levofloxacin against *Staphylococcus* spp. isolated from neutropenic cancer patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 147 - 154.
- Domig, K. J., Mayrhofer, S., Zitz, U., Mair, C., Petersson, A., Amtmann, E., . . . Kneifel, W. (2007). Antibiotic susceptibility testing of *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium pseudolongum* strains: Broth microdilution vs agar disc diffusion assay. *International Journal of Food Microbiology*, 1 - 5.
- Eagle, H., Fleischman, R. & Musselman, A. (1950). Effect of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin: Importance of the aggregate time penicillin remains at effectively bactericidal levels. *The American Journal of Medicine*, 9(3), 280 - 299.
- Encyclopedia of Life. (2013). *Encyclopedia of Life*. Recuperado el 25 de Febrero de 2013, de Encyclopedia of Life: <http://eol.org/>
- Felipe-Galindo, E. M. (2010). *Determinación de metaloenzimas en aislamientos de Pseudomonas aeruginosa provenientes del Hospital General San Juan de Dios*. (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

- Forbes, B., Sahm, D. y Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott; Diagnóstico microbiológico* (12a ed.). (S. Rondinone, Trad.) Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Foster, W., Ghannoum, M. A. & Elewski, B. (2004). Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection un the USA from 1999 to 2002. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 50(5), 748 - 752.
- García, M. (2008). *Inhibición de Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium smegmatis por extractos etanólicos de cinco plantas utilizadas popularmente para el tratamiento de infecciones respiratorias* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- García-Martos, P., Ruíz-Aragón, J., García-Agudo, L. y Linares, M. (2004). Dermatofitosis por *Microsporium gypseum*: Descripción de ocho casos y revisión de la literatura. *Revista Iberoamericana de Micología* (21), 147-149.
- Gatica, J. (2002). Utilidad del Agar Cromocandida para el diagnóstico dferencial de *Candida* spp. aisladas de muestras vaginales. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 67(4), 300-304.
- Global Biodiversity Information Facility. (2001). *Baccharis vaccinioides*. Recuperado el 21 de Febrero de 2013, de <http://data.gbif.org>
- Godfrey, T. y 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.
- González-López, J., Piedra-Carrasco, N., Salvador, F., Rodríguez, V., Sánchez-Montalvá, A., Planes, A. M., . . . Larrosa, M. N. (2014). ESBLE- Producing *Salmonella enterica* Serovar *Typhi* in traveler returning from Guatemala to Spain. *Emerging Infectious Disease*, 20(11), 1918 - 1920.
- Gracia, M. (2007). *Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales* . México: Universidad Autónoma de Querétaro. Recuperado el 11 de Enero de 2013, de http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf
- Guenther, E. (1948). *The essencial oil*. New York: Van Nostrand Company.
- Guzmán, L. (1984). *Preparación de antígenos de especies de Aspergillus y su uso en el diagnóstico de Aspergilosis Pulmonar secundaria a Tuberculosis* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

- Hay, R. J. (2006). Fungal infections. *Clinics in Dermatology*, 24(3), 201 - 212.
- Ingraham, J. y Ingraham, C. (1998). *Introducción a la Microbiología* (1a ed., Vol. 2). Barcelona: Editorial Reverté, S.A.
- Kauffman, C. (2011). *Cryptococcosis* (24 ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Klancnik, A., Piskernik, S., Jersek, B. & Mozina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2) 121 - 126.
- Kodela, P. (2012). *Acacia elongata*. Recuperado el 21 de Noviembre de 2012, de PlantNet: <http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgi-bin/NSWfl.pl?page=nswfl&lvl=sp&name=Acacia~elongata>
- Koneman, E. (2008). *Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color* (6a ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Kreger-van Rij, N. W. (1984). *The Yeasts: a taxonomic study* (3rd ed.). Michigan: Elsevier Science.
- Lamarque, A., Zygadlo, J., López, L., Torres, M. y Maestri, D. (2008). *Fundamentos teórico-prácticos de Química Orgánica*. Córdoba: Encuentro Grupo Editor.
- Ley De Coss, A., Cobos Peralta, M., Hernández Sánchez, D. y 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.
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Caldas: Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia.
- Loudon, J. (2006). *The gardener's magazine and register of rural & domestic improvement* (1a ed., Vol. I). London: Longman, Brown, Green and Longmans.
- Martínez Arévalo, J. (2016). Los bosques de *Abies guatemalensis* Rehder de San Marcos, Guatemala: una oportunidad para su restauración ecológica. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 3(1), 27 - 46.
- Martínez, J. (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 de Proyecto FODECYT 055-2009). Guatemala: FODECYT.

- Martínez, J. (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.
- Martínez, M. (1979). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. México: Fondo de Cultura Económica.
- Meckes, M., Villareal, M. L., Tortoriello, J. Berlin, B. & Berlin, E. A. (1995). A microbiological evaluation of medicinal plants used by the Maya people of Southern Mexico. *Phytotherapy Reserch*, 9(4), 244 - 250.
- Menéndez, I. (2007). *Caracterización de los extracto de tres plantas con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiprotozoarias* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos Guatemala, Guatemala.
- Mesa-Vanegas, A., Gaviria, C., Cardona, F., Sáez-Vega, J., Blair, S. y Rojano, B. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(2), 13-21.
- Meza, K. (1995). *Actividad antimicótica de siete plantas nativas de uso medicinal del departamento de Alta Verapaz* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Mier, T., Toriello, C. y Ulloa, M. (2002). *Hongos microscópicos saprobios y parásitos*. México, D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana.
- 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.
- Monroy, R., Castillo-Cedillo, G. y Colín, H. (2007). *La perlita o perilla Symphorycrpos microphyllus H.B.K (Caprofoliaceae) especie no maderable utilizada en una comunidad del corredor biológico Cichinautzin, Morelos, México* (Vol. 23). Cuernavaca: Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Mossel, D., Moreno, B. y Strijk, B. (2006). *Microbiología de los alimentos* (2 ed.). Zaragoza: Acribia
- Nash, D., y Williams, L. (1976). Flora de Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(12), 1229.
- Olivet, J. (2008). *Determinacion de Escherichia coli y Escherichia coli O157:H7 en leches obtenidas artesanalmente y distribuidas en 15 lecherías de la cabecera departamental de Chiquimula*. (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

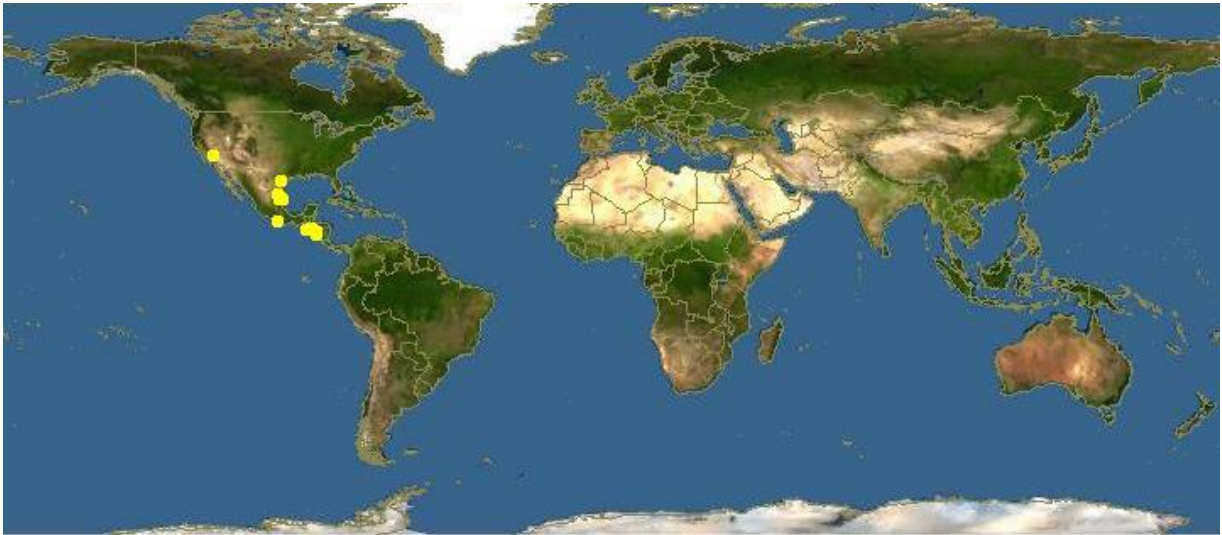
- Paiz, W. (2008). *Determinación y Caracterización de especies de Candida en personas viviendo con VIH/sida que acuden a la Clínica Familiar "Luis Angel García" del Hospital General San Juan de Dios* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Palomino, A. y Cerpa, M. (1999). *Hidrodestilación de los aceites esenciales*. Callao: Fenómenos de Transporte.
- Parham, P. (2006). *Inmunología* (2a ed.). (O. Giovanniello, Trad.) Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Pastor, J. (2006). *Identificación de Escherichia coli O157:H7 en pacientes con infección urinaria del Hospital "Bella Aurora"* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Pérez, B. y González, J. (2002). *Microbiología de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- Ramírez-Contreras, A. y Rodríguez-Trejo, D. (2009). Plantas nodriza en la reforestación con *Pinus hartwegii* Lindl. *Revista Champingo*, 15(1), 43-48.
- Reséndiz-Sánchez, J. y Morales-Aguirre, J. J. (2007). Factores asociados a mortalidad por fungemias causadas por *Candida* sp. en niños. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 64(2), 81 - 98.
- Revista Panamericana de Salud Pública. (1997). Enfermedades producida por radicales libres. *Revista Panamericana de Salud Pública [online]*, 1(5), 399 - 400.
- Rivas, V. (2012). *Determinación de la presencia de Cryptococcus neoformans en heces de paloma (Columba livia) en áreas públicas de la Ciudad de Antigua Guatemala. Sacatepéquez, Guatemala* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Rojano, B., Gaviria, C., Gil, M., Saez, J., Schinella, G. y Tournier, H. (2008). Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae*, 15(1), 173 - 181.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias* (3a ed.). México D.F.: Médica Panamericana.
- Salazar, R., Soihet, C. y Méndez, J. (2000). *Manejo de semillas de 100 especies forestales de América Latina* (Vol. 1). Turrialba: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Schneider, S. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos en Guatemala . En C. Rosell, *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico* (pp. 121-138). Roma: FAO.

- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello.
- Silva, M. (2007). *Anatomía Patológica y Patogenia*. Obtenido de *Candida albicans*: <http://candidalbicans.blogspot.com/2007/11/anatomia-patologica-y-patogenia.html>
- Standley, P. & Steyermark, J. (1946). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(4), 210.
- Standley, P. & Williams, L. (1966). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(8), 190.
- Standley, P. & Williams, L. (1969). Flora de Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(7), 159.
- Strandby, U., Prado, J., Bräuner, U., Smith, C., Nielsen, C., Sorensen, M. & Kollmann, J. (2008). Conservation through utilization: a case study of the vulnerable *Abies guatemalensis* in Guatemala. *Fauna & Flora International*, 42(2), 206-213.
- Tortora, G., Furke, B. & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (9a ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Villamar, A., Cano, L. y Rodarte, M. (1994). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana* (Vol. 1). México: Instituto Nacional Indigenista.
- Zapata, B., Duran, C., Stashenko, E., Betancur-Galvis, L. y Mesa-Arango, A. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de Aceite esenciales de plantas de la Familia Astareceae. *Revista Iberoamericana de micología*, 27(2), 101-103.

X. ANEXOS

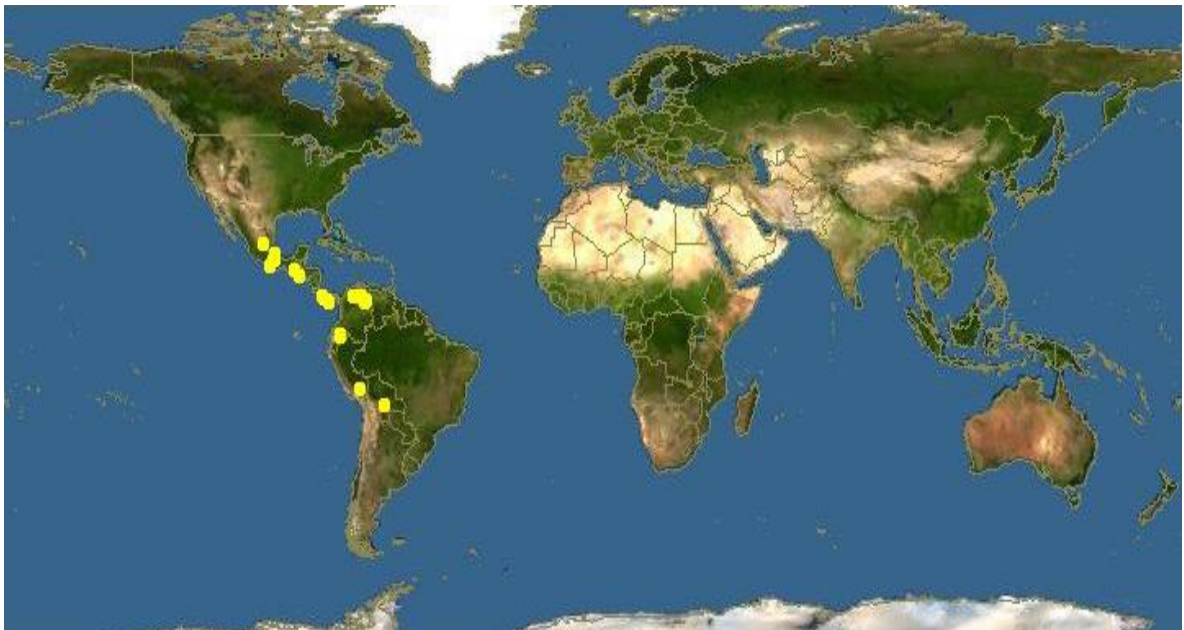
A. Distribución geográfica

Anexo 1. Distribución geográfica de *Abies guatemalensis*



Fuente: (Encyclopedia of Life, 2013)

Anexo 2. Distribución geográfica de *Acaena elongata*.



Fuente: (Encyclopedia of Life, 2013)

Anexo 3. Distribución geográfica de *Baccharis vaccinioides*



Fuente: (Encyclopedia of Life, 2013)

Anexo 4. Distribución geográfica de *Rubus trilobus*



Fuente: (Encyclopedia of Life, 2013)

Anexo 5. Distribución geográfica de *Stevia polycephala*



Fuente: (Encyclopedia of Life, 2013)

Anexo 6. Distribución geográfica de *Symphoricarpos microphyllus*



Fuente: (Encyclopedia of Life, 2013)