Steviana



Pleurotus albidus



Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales Departamento de Biología Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad Nacional de Asunción



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCION

RECTOR

Prof. Dr. Froilán Enrique Peralta Torres

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DECANO

Prof. Lic. Constantino Nicolás Guefos K., MAE

CUERPO EDITORIAL

-Editor

Bonifacia Benitez de Bertoni

-Asistente de edición

Claudia Pereira Sühsner Fidelina González Galeano

-Comité Editorial

- -Pastor Arenas, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos(CEFYBO-CONICET), Universidad de Buenos Aires, Argentina
- -María Fátima Mereles H., Parque Tecnológico Itaipú, FPTI-PY
- -Cecilia Trillo, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

-Comité Científico

- -Griselda Marín O., Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
- -María Vera, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
- -Christian Vogt, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
- -Lidia Pérez de Molas, Facultad de Ciencias Agrarias
- -Juana Inés De Egea, Wildlife Conservation Society (WCS)
- -Danilo Fernández R. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
- -Hector Nakayama, CEMIT-UNA

-Revisión de escrito en Inglés

-Nidia Beatriz Benítez Candia, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Revista Steviana: Indexada al Catálogo de Latindex, Nº de Folio 21767

DIRECCIÓN OFICIAL

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UNA
Teléfono-fax: (595-21) 585 600
Dirección Postal: 1039
Campus Universitario, San Lorenzo-Paraguay

Página web: www.facen.una.py

Páginas Contenido

5-12 -Propiedad antichagásica *in vitro* e *in vivo* de maculina aislada de *Helietta apiculata* Benth. (Rutaceae)

María Elena Ferreira, Hector Nakayama, Susana Torres, Gloria Yaluff, Luis Sanabria, Ninfa Vera de Bilbao, Alicia Schinini, Antonieta Rojas de Arias, Isabelle Guy, Helene Guinaudeau, Alain Fournet

-Incidencia y distribución de hongos filamentosos durante el proceso de beneficio húmedo del café

Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga, Martha Yolanda Quezada Viay, Danilo Fernández Ríos, Ernesto Moreno Martínez, Alberto Flores Olivas

20 - 35 - Asociación *in vitro* del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* Thunb. y anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*

Juliana Moura Mendes Arrua, Fillipe de Oliveira Pereira, Felipe Queiroga Sarmento Guerra, Everardo Albuquerque Menezes, Francisco Afrânio Cunha, Edeltrudes Oliveira Lima

-Caracterización biológica del Arroyo San Lorenzo en el tramo del Campus Universitario-UNA

Gilberto Antonio Benítez Rodas, Héctor David Nakayama, Juliana Moura Arrúa, Griselda Franco Cardozo, Rocío Rosmary Acosta Brítez, Liza María Ramírez Garay

50 - 69 - Caracterización físico-química del aceite esencial de *Origanum syria-cum* L. extraído a macro escala en distintos tiempos utilizando el método de destilación por arrastre de vapor

Miguel Martínez, Claudia Mancuello, Claudia Pereira, Fidelina González, Bonifacia Benítez, Francisco Ferreira, César Sena

70 - 79 - El género *Pleurotus* (Pleurotaceae-Basidiomycota) en Paraguay *Alma Flecha Rivas, Barbara De Madrignac, Michelle Campi*

 80 – 101 - Análisis de los remanentes de comunidades vegetales de las cuencas del Rio Salado y del Arroyo Pirayú, en el área de influencia del Lago Ypacarai

Bonifacia Benítez, Maria Vera, Siemens Bertoni

Propiedad antichagásica in vitro e in vivo de maculina aislada de Helietta apiculata Benth. (Rutaceae)

María Elena Ferreira ^{1,2}, Hector Nakayama ¹, Susana Torres¹, Gloria Yaluff ^{1,2}, Luis Sanabria¹, Ninfa Vera de Bilbao¹, Alicia Schinini¹, Antonieta Rojas de Arias ³, Isabelle Guy ⁴, Helene Guinaudeau ⁴, Alain Fournet ⁵

E mail del autor: meferpar@hotmail.com

Actividad antichagásica in vitro e in vivo de maculina aislada de Helietta apiculata Benth (Rutaceae).

La enfermedad de Chagas es uno de los problemas de salud pública más graves en el continente americano. Más allá de las campañas y programas que los países han desarrollado para informar, prevenir y sensibilizar sobre la enfermedad, sus causas y formas de transmisión, el verdadero desafío está en encontrar una cura. En este trabajo se estudió la actividad anti-T. cruzi de maculina aislada a partir de corteza de tallo de Helietta apiculatta Benth —una Rutaceae muy abundante en Paraguay— y estudiada mediante ensavos in vitro e in vivo sobre la cepa CI (Brener). En los ensavos in vitro la maculina presentó niveles muy bajos de actividad anti-T. cruzi; sin embargo, el ensayo in vivo presentó nivel alto de actividad. La maculina modificó el curso de la infección en ratones en comparación con el grupo control, presentando parasitemias en 62,5% en la administración por vía sub-cutánea y en 97,5% por vía oral, en los días 18 y 68 post-infección respectivamente, a diferencia del grupo control que presentó 100% de parasitemia. Los ratones tratados con benznidazol y maculina comparados con el grupo control en todo el curso de la infección presentaron diferencias significativas en la disminución de la parasitemia, el benznidazol (p<0.005) y la maculina (p<0.001), ambos administrados por vía oral y la maculina por vía sub-cutánea (p<0,005) respectivamente. En la evaluación serológica (ELISA), los ratones tratados con maculina y benznidazol —ambos por vía oral— presentaron 75% de serología negativa en la primera determinación, ambos estadísticamente significativos, el benznidazol (P<0,001) y la maculina (P<0,05), y los valores de densidad óptica más baios en el benznidazol. En la segunda determinación se observa 37.5% de negativización serológica en todos los grupos tratados, también estadísticamente significativos, donde la maculina presentó valores de (p<0,001) y el benznidazol (P<0,05), ambos vía oral y la maculina (P<0,05) vía subcutánea. Los valores de la densidad óptica más bajos se vieron en maculina administrada por vía oral. Palabras claves: Trypanosoma cruzi, Helietta apiculata, maculina, ensayos biológicos

In vitro and in vivo antichagasic activity of maculine isolated from Helietta apiculata Benth (Rutaceae). Chagas disease is one of the most serious public health problems in the Americas. Beyond the campaigns and programs that countries have developed to inform, prevent and raise awareness, the real challenge is to find treatment. This work studied the in vitro and in vivo anti-T. cruzi activity of maculine isolated from the stem bark of Helieta apiculatta Benth on the CI (Brener) strain of T. cruzi. In vitro bioassays with maculine showed very low level of activity against T. cruzi; however, the in vivo assays presented a high level of activity. Maculine modified the course of infection compared to the control group; presenting parasitaemia in 62.5% in subcutaneous administration and 97.5% in oral administration at 18 and

¹ Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud – UNA

² Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UNA

³ Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC/FMB/Diaz Gill Medicina Laboratorial), Asunción, Paraguay CEDIC.

⁴ Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux, Faculté de Pharmacie, Université d'Angers, Angers, France.

⁵ IRD US 084, Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, rue J.B. Clément, 92296 Châtenay.-Malabry cedex, France.

68 days post-infection respectively, while the control group presented 100% of parasitaemia. Mice treated with maculine, compared to the control group, showed significant differences in the decrease of parasitaemia; benznidazole (P <0.005) and maculine (P <0.01), both administered orally, and maculine (P <0.05) administered subcutaneously. In the serological evaluation (ELISA), mice treated with maculine and benznidazole —both orally administered— presented 75% of negative serology in the first determination, both statistically significant, benznidazole (P<0,001) and maculine (P<0,05); and the lowest optical density values were observed in benznidazole. In the second determination, 37.5% of mice showed negative serology in all treated groups, also statistically significant, where maculine presented (p <0.001) values and benznidazole presented (P<0,05) values when administered orally; and maculine showed (P <0.05) values whenadministered subcutaneously. The lowest optical density values were observed in orally administered maculine.

Keywords: Trypanosoma cruzi, Helietta apiculata, biological assays

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido consideradas a través de los años como el origen o punto de partida del desarrollo de los medicamentos, ya que han contribuido grandemente al descubrimiento de nuevas sustancias con actividad biológica y a la producción de fitofármacos. Es la fuente de medicamentos más económica y de mayor disponibilidad para la mayoría de los países (Tillan, 2002).

En Paraguay, los practicantes de la medicina tradicional son abundantes y formulan tratamientos basados mayoritariamente en plantas, si bien los aspectos como la calidad, la seguridad y la eficacia requieren de una atención más científica y dedicada (Ibarrola, et al. 2011). Habitamos un país con gran número de especies vegetales utilizadas para fines medicinales, y localmente existen demandas de la sociedad para la cobertura en productos innovadores en las áreas de la salud, industria y gestión del ambiente. Disponemos de especies nativas domesticadas, que racionalmente utilizadas asegurarán el desarrollo sustentable del rubro. En el mismo sentido, la OMS reconoce y recomienda la validación científica de la medicina popular en vistas a implementar programas sanitarios basados en plantas, que por ser de uso corriente, ven su aceptación facilitada. Las plantas medicinales han sido identificadas como una oportunidad en el campo de la ciencia, la tecnología y la innovación para el desarrollo, y puede ser capitalizado, a través del conocimiento, hacia la generación de genuinos recursos financieros (Ibarrola et al. 2011)

Las infecciones parasitarias son un problema de salud a nivel mundial: esto es particularmente cierto para los países subdesarrollados, donde estas enfermedades también causan una pérdida económica importante (Rollo 1991). La enfermedad de Chagas es uno de los problemas de salud pública más graves que existe en el continente. Más allá de las campañas y programas que los países han desarrollado para informar, prevenir y sensibilizar a las personas sobre la enfermedad, sus causas y formas de transmisión, el verdadero desafío está en encontrar una cura.

El tratamiento actualmente disponible en el mercado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas está limitado a solo dos medicamentos: nifurtimox (Lampit®, Bayer) y benznidazol (Lafepe®, Brasil). Estos compuestos presentan severos efectos colaterales y son más exitosos en la infección aguda y en la crónica temprana (De Andrade et al. 1996). Generalmente, la enfermedad se diagnostica en la fase crónica cuando la terapia ya es ineficaz (Cerecetto and Gonzalez 2002; Caldas et al. 2008). Existe una urgente necesidad de nuevos medicamentos para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas (Rassi et al. 2010). Aunque se necesitan nuevos y eficientes tratamientos para la enfermedad, solo una clase de drogas está en desarrollo clínico, los

Steviana, Vol. 6. 2014. Ferreira et al. Propiedad antichagasica in vitro e in vivo de maculina aislada de Helietta apiculata Benth. (Rutaceae)

triazoles, que han emergido como un nuevo tratamiento potencial (Ribeiro et al. 2009).

En estudios recientes se han demostrado que el extracto crudo de la corteza del tallo y las hojas de una planta perteneciente a la flora paraguaya el *Zanthoxylum chiloperone* y los alcaloides de tipo canthinonas, canthin-6-ona y 5-methoxycanthin-6-ona, estraídos de esa misma planta presentaron actividad contra el *Trypanosoma cruzi* (Ferreira et al. 2007), por lo que se ha sugerido que el estudio de otras plantas puede ser un camino de interés para el tratamiento barato y seguro frente a cepas resistentes a los pocos medicamentos existentes actualmente contra el *T. cruzi*.

En éste trabajo se estudió la actividad anti-Trypanosoma cruzi en ensayos in vitro e in vivo sobre la cepa Cl (Brenner) del alcaloide maculina (Figura 1) aislado a partir de corteza de tallo de *Helieta apiculatta* Benth una Rutaceae muy abundante en nuestro país.

El objetivo del trabajo fue evaluar la actividad anti-*Trypanosoma cruzi in vitro* del alcaloide maculina extraído de la corteza de tallo de *Helietta apiculata* Benth., en ensayos *in vitro* e *in vivo* frente a parásitos CL (Brenner) de *Trypanosoma cruzi* por vías oral y subcutánea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la evaluación antiparasitaria se utilizaron ensayos "in vitro" e "in vivo" en modelos de investigación en ratones, como paso importante para ensayos más avanzados, como son los modos de acción de la droga y estudios farmacodinámicos.

Material de estudio

Colecta de los especímenes vegetales en estudio

La especie vegetal *Helietta apiculata* Benth. utilizada para la realización de los ensayos *in vitro* e *in vivo* fue recolectada por

A. Fournet y M. E. Ferreira en el mes de marzo de 1995 en la Compañía Paso hú de Piribebuy, Departamento de Cordillera, Paraguay, e identificado por N. Soria (Departamento de Botánica de la Facultad Ciencias Químicas Universidad Nacional de Asunción, Paraguay).

Identificación Taxonómica y descripción de los especímenes vegetales

Es una especie botánica de la familia Rutaceae. Es endémica de Argentina y Paraguay. Es heliófita, de matorrales y otros ambientes caracterizados por formaciones subclimáxicas edáficas, encontrándose asociada con pindo (*Syagrus romanzoffiana*). También habita sitios húmedos secundarios y chacras. Es endémica en la zona de Piribebuy, lugar donde se realizó la cosecha de los especímenes estudiados.

Nombres vernáculos: "yvyrá oví" (yvyrá= árbol, ov= hoja, i= pequeña) es decir, árbol de hojas pequeñas o puntiagudas"; "yvyrá oví guasú" (guasú= grande o mayor) refiriendosé al tamaño del árbol. Es un árbol siempre verde, de tamaño mediano con una altura de 10 -25 m. Es muy difundido en la Región oriental, tanto en la cuenca del río Paraná como en la del Paraguay. Su madera amarilla es usada para la confección de flechas y arcos por los indios mbyá. Localmente se utiliza la madera en construcción y para la fabricación de carretas, yugos y otros artículos de utilidad rural. Es además fuente de energía ya que con él se prepara leña y carbón, su regeneración es rápida (Basualdo et al. 1997). En los yerbales la prefieren para el sapecado y tostado de la yerba mate porque despide muy poco humo al arder (López 1987) Su corteza tiene virtudes afrodisíacas. Utilizada también, en la elaboración de utensilios como mango de herramientas. Además, es utilizada por sus propiedades anti-inflamatorias como medicina popular en forma de infusiones. (Ferreira et al. 2011). El secado, envenenado y montaje de ejemplares fue realizado según metodología convencional para tratamiento de especímenes.

La identificación correcta del ejemplar en estudio con el concurso de un profesional Botánico (Dra. Nélida Soria) es un paso indispensable antes del estudio fitoquímico, farmacológico y/o toxicológico (Miguel Martínez et al. 2011). Un espécimen de la planta fue depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Químicas UNA con el código (AF 912), luego de haber sido identificado por la Dra. Nélida Soria.

Preparación de los materiales vegetales para extracción y uso

La corteza de *Helietta apiculata* Benth. utilizada en este estudio, fue secada a temperatura ambiente durante una semana, bajo sombra, para evitar la acción de la luz, la temperatura y la acción de microorganismos que pudieran descomponer los compuestos originales (Miguel Martínez et al, 2011).

Molienda y tamizado del material vegetal seco

La molienda se ha realizado con una máquina forrajera convencional y el tamizado por medio de un tamiz de acero inoxidable de 0.5 mm de diámetro. Todos los aislamientos finales e identificaciones de los productos de ésta planta fueron realizados en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Angers-Francia, por las Dras. Isabelle Guy y Helene Guinaudeau coordinados por el Dr. Alain Fournet.

Ensayos in vivo e in vitro (Lisis de parásitos) de Helietta apiculata. Estudios in vitro (Lisis de parásitos)

Fueron utilizados ratones albinos obtenidos en el bioterio del IICS (Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud – UNA), infectados experimentalmente con parásitos sanguíneos de Trypanosoma cruzi de la cepa CL (Brenner) mantenidos en ratones albinos identificados análisis por isoenzimático. La sangre de los ratones albinos infectados se obtuvo por punción cardíaca usando citrato de sodio al 3.8 % anticoagulante en una relación sangre/anticoagulante de 7:3. La maculina (Figura 1) fue disuelta en DMSO (acido dimetilsulfóxido) a una concentración final de 250 ug/ml.

Alícuotas de 10 ul del producto en diferentes concentraciones (4, 20, 100 y 250 ug/ml) fueron mezcladas en microplacas con 100 ul de sangre conteniendo concentraciones de parásitos de 1x 10⁶ parásitos por ml. Sangre infectada con DMSO y sangre infectada conteniendo violeta de genciana fueron usadas como controles. Las placas fueron agitadas por 10 minutos a temperatura ambiente luego mantenidas a 4 °C por 24 horas. Cada solución con 5 ul de muestra en lámina cubierta con laminilla 22x22 fue observada

observada al microscopio con objetivo de 400 X, para el contaje de parásitos (Fournet et al. 1996).

OMe

Figura 1. Estructura de la furoquinoleina maculina (1) extraida de *Helietta apicula*-

Estudios in vivo

Animales experimentales. Ratones albinos machos y hembras criados y mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), Asunción – Paraguay.

Tratamiento con las drogas. Los tratamientos se iniciaron al comprobarse que la infección estuviera bien establecida, a través de parasitemias directas, lo que ocurrió a tres días post-infección, y duró 15

días con una administración diaria. Los ratones fueron divididos al azar en cuatro grupos de ocho ratones cada uno. El benznidazol por vía oral a una concentración de 50 ug/ml fue utilizado como droga de referencia. La maculina fue administrada por vía oral y sub-cutánea a una concentración de 5 mg/kg de peso, y un grupo infectado fue el control no tratado a quienes se les administró por vía oral solución fisiológica.

En todos los grupos de ratones las parasitemias fueron determinadas en sangre venosa de la cola semanalmente durante 68 días. El suero de los ratones infectados fue evaluado por un ensayo inmunoenzimático (ELISA), al terminar el tratamiento y al finalizar el protocolo, con el fin de determinar el nivel de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*. Una vez obtenido todos los resultados se analizaron estadísticamente.

Las diferencias entre los grupos se determinaron usando el test ${f t}$ de Student. La significancia se estableció para P < 0.05. (Ferreira et al. 2011)

RESULTADOS

Ensayos in vitro e in vivo

En los ensayos *in vitro* realizados con el producto maculina (Figura 1), extraído de la corteza de tallo de *Helietta apiculata* Benth., podemos observar que presentó 63 % de lisis de parásitos, niveles muy bajos de actividad anti-*Trypanosoma cruzi*, sin embargo, en los ensayos *in vivo* presentó resultados muy auspiciosos. La maculina (Vaquette et al. 1976), extraída de *Helietta apicullata* Benth. fué bien tolerada por los ratones y no pudimos observar ningún efecto colateral en los experimentos. A continuación se presentan las tablas de resultados de los ensayos in vivo realizados.

Tabla 1. Efecto del tratamiento con maculina, en ratones experimentalmente infectados con *Trypanosoma cruzi* (fase aguda). Evaluación parasitológica

Dias post-infección	PARASITEMIA MEDIA \pm SD								
	Control	Benznidazol (50 mg)	Maculina (oral) (5 mg)	Maculina (SC) (5 mg)					
4	0	0	0	0					
11 *	90.8 ± 257	0	0	0					
18 *	313.6 ± 48.7	34.9 + 98.6	748.4 + 1424.9	0					
25 *	387.3 + 671.1	250.1 + 503.5	264.8 + 281.8	213.4 + 354.4					
32	241.1 + 553.2	296.8 +625.5	431.6 + 840.5	192.8 + 268.5					
40	870.5 + 1902.1	118.3 + 192.9	154.9 + 185.4	230.9 + 276.7					
45	865.8 + 1022.7	300.8 + 431.6	78.9 + 126.1 p < 0.005	85.4 + 140.6 p < 0.005					
53	1273.3 + 1647.8	23.3 + 65.8	25.8 + 72.8	55.9 + 158.0					
60	1050 + 2605.5	p<0.05 65.3 + 93.2	p < 0.005 1346.6 + 254.9	150.4 + 391.7					
68	1144.1 + 1641.9	9.4 + 26.5	85.1 + 153.1	5.3 + 14.8					

*Periodo de tratamiento (dos semanas) P < 0.005 con relación al control Benznidazol: droga de referencia N° de ratones por grupo: 8 Steviana, Vol. 6. 2014. Ferreira et al. Propiedad antichagasica in vitro e in vivo de maculina aislada de Helietta apiculata Benth. (Rutaceae)

Tabla 2. Efecto del tratamiento con maculina en ratones experimentalmente infectados con *Trypanosoma cruzi (Fase aguda)*. Evaluación serológica

Producto (Dosis)	N° ratones	Via Adm.	Dosis	1° Serología ^(a) Densidad óptica (Cut-off, 0,264)	Negativización serológica ^(a)	2° Serología ^(b) Densidad óptica (Cut-off, 0,264)	Negativización Serológica ^(b)
Control (PBS)	8	Oral	-	0.3985 ± 0.0922	0 % (0/8)	1598 ± 382	0 % (0/8)
Benznidazol (50 mg/kg)	8	Oral	50 mg	0.1692 ± 0.1179 $\mathbf{p} < 0.001$	75 % (6/8)	793 ± 860 p < 0.05	37.5 % (3/8)
Maculina (5 mg/kg)	8	Oral	5 mg	0.2098 ± 0.1368 p < 0.05	75 % (6 /8)	319 ± 591 p < 0.001	37.5 % (3/8)
Maculina (5 mg/kg)	8	SC	5 mg	0.2795 ± 0.1944	50 % (4 /8)	582 ± 842 p < 0.05	37.5 % (3/8)

- (a) 40 días post-infección; 15 días post-finalización del tratamiento. P<0.001 c/ relación al control
- (b) 68 días post-infección; 45 días post-finalización del tratamiento. P>0.05 c/ relación al control Benznidazol: droga de referencia

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En los ensayos *in vitro* realizados con el producto maculina, extraído de la corteza de tallo de *Helietta apiculata* Benth., podemos observar que presentó 63 % de lisis de parásitos, niveles muy bajos de actividad ant- *Trypanosoma cruzi*, sin embargo, en los ensayos *in vivo* presentó resultados muy auspiciosos.

La administración de maculina modificó el curso de la infección comparado con el grupo control; los niveles de parasitemia se pueden ver en la Tabla 2. Este grupo presentó el día 18 post-infección parasitemias negativas en 5 de 8 ratones (62.5%) y el día 68 (día del sacrificio) 7de 8 ratones (87.5%) con parasitemias negativas a diferencia del control (Tabla 1).

Los ratones tratados con el benznidazol, demostraron que en todo el curso de la infección presentaron diferencias significativas (P<0,005) en la disminución de la parasitemia comparadas con el grupo control, lo mismo que los tratados con maculina por vía oral y sub-cutánea que alcanzaron diferencias signi-

ficativas de P < 0.01 y P < 0.005 respectivamente.

En la Tabla 3 están presentados los resultados de la evaluación serológica (ELISA), y vemos que la maculina administrada por vía oral presentó el mismo comportamiento que el benznidazol, comparadas con el grupo control, con 75% de negativización serológica para ambos grupos en la primera determinación, siendo estadísticamente significativa para P < 0.001 en el benznidazol y P < 0.05 para la maculina, siendo los valores de la densidad óptica más bajos en el benznidazol. En la segunda determinación se observó un 37.5% de negativización serológica en los tres grupos tratados, con una inversión de los valores de densidad optica para la maculina administrada por vía oral (p < 0.001) al comparar con la densidad optica del benznidazol y la maculina administrada por vía subcutánea (P < 0.05) (Tabla 2). Aunque la respuesta inmune en este modelo fue más evidente en animales tratados con benznidazol y la maculina por vía oral que en los ratones no tratados, se debe destacar que el criterio de cura es la negativización de las pruebas serológicas o

al menos, una regresión progresiva y persistente del título de anticuerpos (Ferreira et al. 2007).

Este estudio mostró que el tratamiento con maculina por vía oral a ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi* produjo la cura parasitológica y serológica similares a los tratados con la droga de referencia, el benznidazol, pues se observó negativización serológica y parasitológica en porcentajes similares en ambos grupos.

En conclusión, este estudio revela que el producto maculina aislado de la corteza de tallo de *Helietta apiculata* presenta un efecto tripanocida en ensayos experimentales *in vivo*, constituyéndose en excelente candidato para completar estudios biológicos, toxicológicos y químicos y se convierte en una nueva perspectiva para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Finalmente debemos recalcar que el uso tradicional de plantas medicinales para una gran parte de la población mundial, es la única vía de tratamiento contra éstas y muchas otras enfermedades, y que la investigación de los productos naturales puede ser empleada para la solución de problemas de salud y bienestar del hombre.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias, A. R., Ferro, E. A. 1988. "Quantificación of *Trypanosoma cruzi* parasitemia Bydirect Micromethd". *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 82: 248.
- Basualdo, I., Soria Rey, N., Keel, S., Rivarola,
 N. 1997. "Recursos Fitigenéticos. Parque
 Nacional Cerro Corá-Amambay. Plantas
 Útiles". DPNUS. Facultad de Ciencias
 Químicas S. Lorenzo Paraguay, The *Nature Conservancy*. p. 66-67.
- Caldas, I. S., Talvani, A., Caldas, S., Carneiro, C.M., de Lana, M., da Matta Guedes, P. M., Bahia, M.T. 2008. "Benznidazole ther-

- apy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions". *Parasitology Research* 103, 413–421.
- Cerecetto, H. & Gonzalez, M. 2002. "Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments". *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2, 1187–1213.
- De Andrade, A.L., Zicker, F., de Oliveira, R.M., Almeida Silva, S., Luquetti, A., Travassos, L.R., Almeida, I.C., de Andrade, S.S., de Andrade, J.G., Martelli, C.M. 1996. "Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection". *Lancet* 348, 1407–1413.
- Dreyer, D.L. 1969. "Coumarins and alkaloids of the Genus Ptelea". *Phytochemistry* 8, 1013–1020.
- Ferreira, M.E., Nakayama, H., Rojas de Arias, A., Schinini, A., Vera de Bilbao, N., Serna, E., Torres de Ortiz, S., Sanabria, L., Lagoutte, D., Soriano-Agatón, F., Poupon, E., Hocquemiller, R., Fournet, A. 2007. "Effects of alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*infected mice". *Journal of Ethnopharmacology* 109, 258–263.
- Ferreira, M. E., Cebrián-Torrejón, G., Segovia Corrales, A., Vera de Bilbao, N., Rolón M., Vega Gómez, C., Leblanc, K., Yaluff, G., Schinini, A., Tórres, S., Rojas de Arias, A., Poupon, E., Fournet, A. 2010. "Zanthoxylum chiloperone leaves extract: First Sustainable Chagas Disease treatment". Journal Ethnofharmacol. Doi. 10.1016 j.jep 2010.2011.032
- Ferreira, M. E., Rojas de Arias, A., Yaluff, G., Vera de Bilbao, N., Nakayama, H., Torres, S., Schinini, A., Guyc, I., Heinzen, H., Fournet, A. 2010. "Antileishmanial activity of furoquinolines and coumarins from *Helietta apiculata*". *Phytomedicine* 17 375–378.

- Steviana, Vol. 6. 2014. Ferreira et al. Propiedad antichagasica in vitro e in vivo de maculina aislada de Helietta apiculata Benth. (Rutaceae)
 - doi:10.1016/j.phymed.2009.09.009.
- Fournet, A., Ferreira, M. E., Rojas de Arias, A., Schinini, A., Nakayama, H., Tórres, S., Sanabria, R., Guinaudeau, H. & Bruneton, J. 1996. "The effect of bisbenzyisoquinoline alkaloids on *Trypanosoma cruzi*" *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol 91, p 315.
- Galan, R.H., Massanet, G.M., Pando, E., Rodriguez, L.F., Salva, J. 1988. Synthesis of (7)3-1',1'-dimethylallyl)decursinol and 3-(1'-1'-dimethylallyl) xanthyletin. Heterocycles 27, 775–777.
- Ibarrola, D. A. y Dejen de Arrúa, R. L. (Editores) 2011. "Catálogo Ilustrado de 80 plantas Medicinales del Paraguay". Facultad de Ciencias Químicas UNA & Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). Pp. 178.
- Ito, C., Itoigawa, M., Otsuka, T., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H. 2000. "Constituents of Boronia pinnata" J. Nat. Prod. 63, 1344–1348.
- López, J. A., Little Jr., E. L., Ritz, G. F.,
 Rombold, J. S., Hahn, W. J., Sterrett, W.
 R., Mc Donald, M. J. 1987. "Arboles comunes del Paraguay Nande yvyra mata kuera". Cuerpo de Paz.
- Martínez, M., Pereira, C., González, F., Benítez, B., Verdan, M., Obdulio, M., Miyazaki, C. 2011. "Estudio y utilización de dos especies vegetales para la obtención de un medicamento piloto rico en minerales y omega-3. *Steviana*, Vol. 3. pp. 54-68". En: Hostettmann K. et al, 2008. "Manual de Estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos". Bogotá—Colombia: Convenio Andrés Bello. 120p.
- Mester, I. 1983. "Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rutales". In: Waterman, P.G. (Ed.), Grundon "Chemis-

- try and Chemical Taxanomy of the Rutales". *Academic Press, London.*
- Pozzi, H., Sanchez, E., Comin, J.H. 1967. "Studies on argentine plants—XXII: Heliettin, a new furocoumarine from *Helietta longifoliata* Britt". *Tetrahedron* 23, 1129–1137.
- Rassi Jr., A., Rassi, A., Marin-Neto, J.A. 2010. "Chagas disease". *Lancet* 375, 1388–1402.
- Robertson, A.V. 1963. "The protonmagnetic re'sonance of furoquinoline alkaloids and related compounds". *Austr. J. Chem.* 6, 451–458.
- Ribeiro, I., Sevcsik, A.M., Alves, F., Diap, G., Don, R., Harhay, M.O., Chang, S., Pecoul, B. 2009. "New, improved treatments for Chagas disease: from the R & D pipeline to the patients". *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e 4841, 1–6.
- Rollo, I. M. 1991. "Medicamentos empleados en el Tratamiento de las infecciones por protozoos". En: Goodman L S & Gilman A. "Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Quimioterapia de las parasitosis" Cap. 54. p. 906-913.
- Sankar, S.S., Gilbert, R.D., Fornes, R.E. 1982. "13C NMR studies of some hydroxycoumarins and related compounds". *Organ. Magn. Reson.* 19, 222–224.
- Tillan, J. 2002 Editorial. *Rev. Cub. de Plantas Medicinales*. Vol 7 02. En: Fragas, I.; Melchor, G.; Ruiz, L.; Fernández, O.; Lorenzo, O. y Rodríguez, J." Estudio de eficacia farmacológica de una crema de *Rhizophora mangle* L." *Rev. Salud Anim. Vol.* 25 No. 3: 173-179.
- Vaquette, J., Hifnawy, M.S., Pousset, J. L., Fournet, A., Cave', A. 1976. "Alcaloides d'Araliopsis soyauxii". *Phytochemistry* 15, 743–745.

Incidencia y distribución de hongos filamentosos durante el proceso de beneficio húmedo del café

Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga^{1,3}, Martha Yolanda Quezada Viay², Danilo Fernández Ríos³, Ernesto Moreno Martínez², Alberto Flores Olivas⁴

E-mail del autor: aaarrua@gmail.com

Incidencia y distribución de hongos filamentosos durante el proceso de beneficio húmedo del café. El café es una de las bebidas más tradicionalmente consumidas a nivel mundial. Durante su cultivo y procesamiento puede ser contaminado por diversos microorganismos, entre ellos los hongos filamentosos. En este trabajo se identificaron las especies presentes a lo largo del beneficio húmedo. Además se analizó la correlación entre el origen de la muestra, las especies presentes y la capacidad de producir micotoxinas; el manejo de la muestra, las especies presentes y la capacidad de producir micotoxinas; y la etapa de procesamiento de las muestras, las especies presentes y la capacidad de producir micotoxinas. Se determinó el contenido de Ocratoxina A y se estudió la relación entre origen y manejo de la muestra y el contenido de micotoxinas en los granos.

Palabras Claves: Aspergillus, inocuidad, micotoxinas, aflatoxinas, ocratoxinas, Geotrichum, Penicillium, Rhizopus.

Incidence and distribution of filamentous fungi during the wet milling process of coffee. Coffee is one of the most traditionally consumed beverages worldwide. It can be contaminated by a wide variety of microorganisms during growth and processing, among which filamentous fungi can be found. In this work we identified species present throughout the wet milling process. We analyzed the correlation between origin of the sample, species present and ability to produce mycotoxins; management of the sample, species present and ability to produce mycotoxins; and stage of processing, species present and ability to produce mycotoxins. We also determined the content of Ochratoxin A and studied the relationship between the origin and management of the sample and the content of mycotoxins in the beans.

Keywords: Aspergillus, safety, mycotoxins, aflatoxins, ochratoxins, Geotrichum, Penicillium, Rhizopus.

INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más tradicionales en el mundo, e ingrediente de una gran cantidad de alimentos. Su calidad está condicionada por una serie de factores entre los que se incluyen variedad, condiciones climáticas, método de cultivo, procesamiento y almacenamiento (Batista et al. 2009; Soliman 2005). El objetivo del proceso de beneficio del café es remover la pulpa, el mucílago, el pergamino y la película plateada que rodean la semilla para la obtención del grano limpio conocido como café oro (Batista et al. 2009). La contaminación microbiana puede ocurrir a lo largo del cultivo, el procesamiento el almacenamiento y la vida de anaquel de los granos. La acción microbiana opera en detrimento de la calidad e inocuidad del producto final; ella depende principalmente de factores ambienta-

¹Laboratorio de Biotecnología, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT), Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica (DGICT), Universidad Nacional de Asunción (UNA).

²Escuela de Postgrado, Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

³Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN), Universidad Nacional de Asunción (UNA).

⁴Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).

les que se dan durante el cultivo y almacenamiento del producto (Batista et al. 2003; Soliman 2005; Perrone et al. 2007; Almeida et al. 2007). Bacterias y hongos filamentosos han sido reportados en pulpa y granos de café procesados en países productores y consumidores de café, por lo cual, la acumulación de micotoxinas representa un riesgo constante (Almeida et al. 2007; Magnoli et al. 2007; Luna, Lozada, y Trigos 2010). La principal preocupación de estos reportes son las micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos de ciertas especies de hongos, que producen en seres humanos y animales síndromes llamados micotoxicosis. Son neuro y nefrotóxicas, oncogénicas, teratogénicas, y afectan a los sistemas inmunológico, neurológico y respiratorio (Perrone et al. 2007; Arrúa Alvarenga, Moura Mendez y Fernández Ríos, 2013). En el café se ha reportado frecuentemente la presencia de ocratoxina A (OTA), aflatoxinas (AF) y patulina (PAT) (Magnoli et al. 2007; Luna, Lozada, y Trigos 2010). Debido a que durante el proceso de beneficio el café es transformado a través de la exposición a una serie de condiciones diferentes de humedad y temperatura que predisponen a la aparición de microorganismos, especialmente hongos filamentosos, la acumulación de micotoxinas representa un riesgo constante. Especies del género Aspergillus, incluyendo A. niger, A. flavus, A. ochraceus y Penicillium han sido reportadas como las aisladas con mayor frecuencia en las muestras de café (Almeida et al. 2007; A. P. Magnoli et al. 2008; Batista et al. 2009; Luna, Lozada y Trigos 2010). Considerando todo lo anteriormente expuesto, la presente investigación se realizó con el objetivo de determinar la presencia de hongos potencialmente micotoxigénicos asociados al proceso de beneficio húmedo del café. La identificación de la micobiota es fundamental para determinar el potencial y la habilidad de los aislados de producir micotoxinas. Se puede presuponer que los aislados obtenidos tendrán potencial para producir micotoxinas que contaminen el café. En este trabajo se estudió la incidencia de hongos presentes a lo largo del proceso de beneficio húmedo de los granos en cuatro fracciones, a mitad del proceso de secado y en café seco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Se colectaron 25 submuestras de 250 gramos cada una de la cosecha del día de la variedad Oro Azteca (Coffea arábica), de dos puntos en el Estado de Veracruz: Teocelo (manejo convencional, con uso de productos fitosanitarios) e Ixuatlán del Café (manejo orgánico, sin aplicación de productos fitosanitarios). Café de altura, en ambos casos, bajo sombra boscosa. Una vez etiquetadas y embaladas de forma adecuada, en bolsas de papel madera y embaladas en cajas, las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Parasitología Molecular de la UAAAN, en Buenavista. Coahuila, donde fueron procesadas según el sistema de beneficio húmedo del café 24 horas después de la toma de muestras. En el estado de Coahuila fue realizado todo el trabajo posterior a la toma de muestras.

Aislamiento e identificación de hongos

Se estudió la incidencia de hongos presentes luego de la finalización del proceso de fermentación, a los seis días de secado, a los 12 días de secado en pista de cemento y en café oro. Los granos fueron desinfestados con hipoclorito de sodio al 1% siguiendo el protocolo de Batista et al. (2003). Posteriormente diez granos fueron sembrados por triplicado en placas de Petri con PDA (papa dextrosa agar) y MSA60% (malta sal agar 60 gramos por litro de medio de cultivo). Se incubaron a 27 °C y luz constante por siete días. Todas las

colonias fueron identificadas a nivel de género por medio de la observación de características macro y microscópicas y el uso de claves taxonómicas (Barnett y Hunter 1998). Los resultados de la micobiota se expresaron como porcentaje de hongos presentes en las distintas partes del grano y etapa de procesamiento del café, en el pergamino, exocarpo, endocarpo y endospermo de los granos (Marasas y Nelson 1987).

Identificación de hongos potencialmente micotoxigénicos

Todos los hongos con características macroscópicas consistentes con los géneros *Aspergillus* fueron purificados en Czapek agar. Se realizaron cultivos monoconidiales por medio de diluciones seriadas, que se identificaron por medio del uso de claves taxonómicas (Samson and Pitt 2000; Klich 2002; Abarca et al. 2004; Samson et al. 2007).

Cuantificación de micotoxinas y determinación de potencia toxigénica

La cuantificación de AF y OTA en café pergamino y verde se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Granos y Semillas de las Escuela de Postgrado en Cuautitlán Izcali, Estado de México, utilizando los kits *Aflatest* y *Ochratest* de Vicam Technologies (Vicam 1999a; Vicam 1999b). Las cepas de la Sección Flavi además fueron sembradas en Agar Coco para su observación bajo luz ultravioleta (Davis, Iyer and Diener 1987).

Análisis estadístico

El diseño estadístico fue completamente al azar. Se estudió el porcentaje de incidencia de cada hongo a lo largo del proceso de beneficio húmedo del café. Se realizó un ANAVA con el uso del Test LSD Fisher. Se analizó además la correlación entre la incidencia de hongos presentes y la parte del grano analizada, y

entre la incidencia de hongos presentes y la etapa del proceso, por medio del coeficiente de Spearman.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las muestras analizadas se identificaron: Aspergillus flavus, Aspergillus glaucus, Aspergillus niger, Geotrichum sp., Penicillium sp. y Rhizopus sp. en PDA (Tabla 1) y Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus carbonarius, Aspergillus glaucus, Geotrichum sp., Penicillium sp. y Rhizopus sp. en MSA60% (Tabla 2). En MSA se observó una mayor diversidad de especies presentes probablemente debido a que al retener agua como consecuencia de la presencia de sal en su constitución, permite el crecimiento de especies con necesidades de agua inferiores (Mazzani, Luzón and Chavarri 2007). Los hongos identificados coinciden con lo reportado en trabajos anteriores, siendo los de género Aspergillus, Secciones Nigri y Flavi, los más frecuentemente aislados. El objetivo fue identificar Aspergillus de las Secciones Flavi y Nigri dada su alta frecuencia de aparición en granos de café y su capacidad de producción de micotoxinas, especialmente OTA y AF (Abarca et al. 2004; Horn 2007).

Se observaron diferencias significativas en cuanto a la incidencia de hongos presentes en PDA y MSA60%. *Rhizopus* sp. fue el hongo con mayor incidencia de aislamiento tanto en PDA como en MSA; a pesar de ser considerado como un contaminante de poca importancia dado que no es productor de micotoxinas al crecer y desarrollarse sobre los granos, produce diversos metabolitos asociados a estos procesos. Además, la liberación de agua y gases producto de su respiración aumentaría el contenido de humedad del grano, lo que podría posibilitar la contaminación con otros microorganismos secundarios. Una alta incidencia de *Rhizopus* sp. podría además indicar

Steviana Vol. 6. 2014. Arrua A. et al. Incidencia y distribución de hongos filamentosos durante el proceso de beneficio húmedo del café

deficiencias en el proceso de secado del grano.

Tabla 1. Incidencia de hongos filamentosos en el proceso de beneficio húmedo de café en PDA.

Hongo	Media	
Geotrichum sp.	0,87	A
Aspergillus flavus	0,99	A
Aspergillus glaucus	1,35	A
Aspergillus niger	1,92	A
Penicillium sp.	2,93	A
Rhizopus sp.	17,44	В

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (p > 0.05).

Tabla 2. Incidencia de hongos filamentosos en el proceso de beneficio húmedo de café en MSA60%.

Hongo	Media	
Aspergillus carbonarius	0,05	A
Geotrichum sp.	0,16	A
Aspergillus glaucus	0,63	A B
Aspergillus niger	1,90	АВС
Penicillium sp.	2,78	ВС
Aspergillus flavus	4,29	C
Rhizopus sp.	8,02	D

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (p > 0.05).

No se observaron diferencias significativas en cuanto al origen de la muestra (Teocelo o Ixuatlan) y la incidencia de los diferentes hongos presentes a lo largo del proceso de beneficio húmedo en PDA. Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto al sistema de manejo de la muestra (convencional en Teocelo y orgánico en Ixualtán) en

PDA. Sin embargo en MSA 60% las diferencias fueron significativas; esto podría deberse a que MSA 60% permite el crecimiento de especies con menores necesidades de agua, y a que el crecimiento de los hongos aflatoxigénicos y ocratoxigénicos está condicionado por factores de pH, humedad y actividad del agua (Spadaro et al. 2010).

En lo que respecta a las etapas del proceso de beneficio, en PDA se observaron diferencias significativas entre partes del grano y días de secado. La incidencia de hongos filamentosos fue menor a medida que el grano disminuyó su contenido de humedad. En el pergamino que rodea a la semilla se observó una alta contaminación por Rhizopus sp. en la primera etapa de secado, probablemente debido a su elevado contenido de humedad; la incidencia más alta de patógenos se dio en el pergamino del grano a los seis días de secado. En MSA 60% también se presentaron diferencias significativas al analizar las diversas etapas del proceso de beneficio húmedo. Coincidentemente con lo obtenido en PDA, la mayor contaminación se dio en el pergamino a los seis días de secado. Esto podría deberse a que el pergamino es la capa más externa que rodea al grano y por tanto sufre mayor exposición a las condiciones del ambiente y hongos contaminantes secundarios.

El pergamino de café se encuentra principalmente constituido por fibras, proteínas y grasas, por tanto es sustrato propicio para el crecimiento de hongos saprófitos.

Se ha indicado que las mayores contaminaciones en el grano de café se producen en su parte externa, siendo la contaminación interna hasta un tercio inferior (Batista et al. 2003).

Al estudiar los factores que podrían influenciar a la micobiota durante el proceso de beneficio húmedo no se observó correlación entre la incidencia de los hongos filamentosos

Tabla 3. Incidencia de hongos filamentosos durante el proceso de beneficio húmedo del café.

Etapa del proceso	Media				Etapa del proceso	Media				
Pergamino 12 días de secado	1,11	Α			Endocarpo 6 días de secado	1,19	Α			
Endocarpo 12 días de secado	1,94	Α	В		Pergamino 12 días de secado	1,51	Α			
Endospermo 12 días de seca-	2,27	Α	В		Endospermo 12 días de seca-	1,67	Α	В		
do					do					
Post fermentación	3,62	Α	В		Endocarpo 12 días de secado	2,14	Α	В	C	
Endocarpo 6 días de secado	3,89	Α	В		Endospermo 6 días de secado	2,30		В	C	
Endospermo 6 días de secado	5,21		В		Post fermentación	3,33			C	
Pergamino 6 días de secado	10,46			C	Pergamino 6 días de secado	5,71				D

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ((p > 0.05)).

presentes con respecto a su origen geográfico, manejo y etapa del proceso de beneficio en PDA ni en MSA60%.

Es importante destacar que la contaminación microbiana puede ocurrir desde la cereza hasta la finalización del proceso de beneficiado húmedo del café. Al identificar los diferentes tipos de hongos filamentosos presentes a lo largo del proceso de beneficio húmedo y tomar acciones encaminadas a la reducción de aquellos potencialmente micotoxigénicos, se asegura la calidad e inocuidad del producto final (Bucheli y Taniwaki 2002; Batista et al. 2009).

Finalmente, se cuantificó el nivel de AF y OTA en café pergamino y verde. En las muestras analizadas no se detectó la presencia de AF a pesar de la importante incidencia de hongos de la Sección Flavi. Sorprendentemente los resultados difieren de lo reportado por Nakajima et al. (1997) y Soliman (2002), quienes cuantificaron niveles de AF variables en hasta 75% de las muestras analizadas en café verde. La ausencia de AF en las muestras de grano analizado podría explicarse por el hecho de que en café existen ciertos compuestos, como diterpenos, cafeína y taninos, que tienen acción protectora contra las AF (Cavin et al. 1998; Hasan 1999). Otro aspecto llamativo es que en 100% de los aislamientos de A. flavus sembrados en Agar Coco se observó fluorescencia bajo luz ultravioleta, lo que indica de manera cualitativa su potencial productor de AF.

En cuanto a OTA en Teocelo se detectaron niveles promedio de 1,73 ppm en café pergamino y 0,8 ppm en café verde. En Ixuatlán, 0,79 y 0,49 respectivamente, lo que indica menor contenido de OTA en café orgánico. La diferencia en estos valores, en cuanto a contenido absoluto de OTA podría deberse a que en los cafetales manejados orgánicamente se utilizaron bioproductos a base de *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp. Estos organismos poseen diferentes mecanismos para competir con otros hongos, entre ellos los productores de micotoxinas. A pesar de estos valores, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

CONCLUSIONES

Durante el proceso de beneficio húmedo del café tanto en cafetales de manejo convencional como orgánico se observó la presencia de siete especies de hongos filamentosos, entre ellas especies potencialmente micotoxigenicas: Aspergillus flavus, Aspergillus niger y Penicillium sp. No se encontró relación entre el origen de la muestra, el tipo de manejo y las especies de hongos presentes. Tampoco se pudo determinar la presencia de correlación entre la acumulación de OTA y el manejo y origen de la muestra. No se detectó la presencia de AF en los granos de café estudiados, de acuerdo a las condiciones de este estudio. Aun así, no existen diferencias significativas al analizar los datos estadísticamente.

Es importante profundizar estudios sobre micotoxinas en café en México, sobre todo aquellos destinados a la identificación de puntos críticos de contaminación a lo largo de la cadena productiva y así prevenir la ocurrencia de las mismas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, M. L., F. Accensi, J. Cano, y F. J. Cabañes. 2004. «Taxonomy and Significance of Black Aspergilli». *Antonie van Leeuwenhoek* 86 (1): 33-49.
- Almeida, A. P., J. de Alaburda, L. Shundo, V. Ruvieri, S. A. Navas, C. A. Leda Lamardo, y M. Sabino. 2007. «Ochratoxin A in brazilian instant coffee». *Brazilian Journal of Microbiology* 38 (2): 300-303.
- Arrúa Alvarenga, A. A., J. Moura Mendez, y D. Fernández Ríos. 2013. «Aflatoxins, a Real Risk». *Reportes Cientificos de la FACEN* 4 (1): 68-81.
- Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4. ded. St. Paul, Minn: APS Press.
- Batista, L. R., S. M. Chalfoun, G. Prado, R. Freitas Schwan, y A. E. Wheals. 2003. «Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.)». *International Journal of Food Microbiology* 85 (3): 293-300.
- Batista, L. R., S. M. Chalfoun, C. Ferreira Silva, M. Cirillo, E. Azevedo Varga, and R. Freitas Schwan. 2009. «Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods». *Food Control* 20 (9): 784-90.
- Bucheli, P., y M. H. Taniwaki. 2002. «Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee». *Food Additives and Contaminants* 19 (7): 655-65.

- Cavin, C., D. Holzhäuser, A. Constable, A. C. Huggett, y B. Schilter. 1998. «The Coffee-Specific Diterpenes Cafestol and Kahweol Protect against Aflatoxin B1-Induced Genotoxicity through a Dual Mechanism.» *Carcinogenesis* 19 (8): 1369-75.
- Davis, N. D., S. K. Iyer, y U. L. Diener. 1987. «Improved Method of Screening for Aflatoxin with a Coconut Agar Medium». Applied and Environmental Microbiology 53 (7): 1593-95.
 - http://aem.asm.org/content/53/7/1593.
- Hasan, H. A. H. 1999. «Role of caffeine and tannin in anti-toxigenic properties of coffee and tea». *Cryptogamie Mycologie* 20 (1): 17-21. doi:10.1016/S0181-1584(99)80004-9.
- Horn, B. W. 2007. «Biodiversity of Aspergillus section Flavi in the United States: A review». *Food Additives & Contaminants* 24 (10): 1088-1101.
- Klich, M. A. 2002. *Identification of Common Aspergillus Species*. New Orleans, Louisiana USA: United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, Southern Regional Research Center.
- Luna, M., y Lozada, y A. Trigos. 2010. «Aislamiento de cepas de Aspergillus niger, productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado». *Revista mexicana de micología* 32 (diciembre): 63-68.
- Magnoli, A. P., L. Tallone, C. A. R. Rosa, A. M. Dalcero, S. M. Chiacchiera, y R. M. Torres Sánchez. 2008. «Commercial bentonites as detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin». Applied Clay Science 40 (1–4): 63-71.
- Magnoli, C., A. Astoreca, M. L. Ponsone, M. G. Fernández-Juri, C. Barberis, y A. M. Dalcero. 2007. «Ochratoxin A and Aspergillus section Nigri in peanut seeds at different months of storage in Córdoba,

- Steviana Vol. 6. 2014. Arrua A. et al. Incidencia y distribución de hongos filamentosos durante el proceso de beneficio húmedo del café
 - Argentina». *International Journal of Food Microbiology* 119 (3): 213-18.
- Marasas, W. F. O., y P. E. Nelson. 1987. Mycotoxicology: Introduction to the Mycology, Plant Pathology, Chemistry, Toxicology, and Pathology of Naturally Occurring Mycotoxicoses in Animals. Edinburgh: Pennsylvania State University Press.
- Mazzani, C., O. Luzón, y M. Chavarri. 2007. «Aspergillus flavus asociado a Epitragus sp. (Coleoptera: Tenebrionidae) en maíz bajo riego en Turén, estado Portuguesa, Venezuela». Entomotropica 19 (3): 157-59.
- Nakajima, M., H. Tsubouchi, M. Miyabe, y Y. Ueno. 1997. «Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography». *Food and Agricultural Immunology* 9 (2): 77-83.
- Perrone, G., A. Susca, G. Cozzi, K. Ehrlich, J. Varga, J. C. Frisvad, M. Meijer, P. Noonim, W. Mahakarnchanakul, y R. A. Samson. 2007. «Biodiversity of Aspergillus species in some important agricultural products». Studies in Mycology 59: 53-66.
- Samson, R. A., P. Noonim, M. Meijer, J. Houbraken, J. C. Frisvad, y J. Varga. 2007. «Diagnostic Tools to Identify Black

- Aspergilli». *Studies in Mycology* 59 (1): 129-45.
- Samson, R. A., y J. I. Pitt, eds. 2000. Integration of Modern Taxonomic Methods For Penicillium and Aspergillus Classification Integration of Modern Taxonomic Methods For Penicillium and Aspergillus Classification. Amsterdam: CRC Press.
- Soliman, K. M. 2002. «Incidence, Level, and Behavior of Aflatoxins during Coffee Bean Roasting and Decaffeination». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (25): 7477-81.
- ———. 2005. «Effect of variety, locality and processing of coffee beans on the detection and determination of aflatoxins». *International Journal of Agriculture and Biology* 7 (1): 5-10. http://agris.fao.org/agrissearch/search.do?recordID=PK200500038 2.
- Spadaro, D., A. Lorè, A. Garibaldi, y M. L. Gullino. 2010. «Occurrence of ochratoxin A before bottling in DOC and DOCG wines produced in Piedmont (Northern Italy)». *Food Control* 21 (9): 1294-97.
- Vicam. 1999a. *OchraTest Instruction Manual*. Watertown, MA: Vicam.
- ——. 1999b. *Aflatest Instruction Manual*. Watertown, MA: Vicam.

Asociación in vitro del aceite esencial Eugenia caryophyllata Thunb. y anfotericina B sobre cepas de Candida tropicalis

Juliana Moura Mendes Arrua^{1,2}, Fillipe de Oliveira Pereira ³, Felipe Queiroga Sarmento Guerra ², Everardo Albuquerque Menezes⁴, Francisco Afrânio Cunha ⁴, Edeltrudes Oliveira Lima ².

¹Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, Universidad Nacional de Asunción – CEMIT, DGICT, UNA, Paraguay.

E mail del autor: aaarrua@gmail.com

Asociación *in vitro* del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* Thunb. y anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*. Candida tropicalis es una de las especies de *Candida* no-albicans más prevalentes en infecciones del torrente sanguíneo. Muchas especies del género *Candida* han exhibido resistencia a los antifúngicos utilizados en tratamiento. Los aceites esenciales se han presentado como alternativa debido a su potencial actividad antifúngica. El aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* es utilizado en la medicina tradicional como antinflamatorio, analgésico, antipirético y antifúngico. Con el objetivo de corroborar esta última propiedad terapéutica y buscar nuevas alternativas para el tratamiento antifúngico, se evaluó la actividad antifúngica del clavo de olor solo y asociado con anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*. En concentraciones de 512 y 1024 µg/mL se observó inhibición de la formación de pseudohifas y desarrollo de blastoconidios con morfología alterada. El aceite esencial mostró actividad fungicida dependiente de la concentración, y asociada a la anfotericina B presentó efecto aditivo. Los resultados de este trabajo son prometedores, pero son necesarios más estudios para elucidar el mecanismo de acción. **Palabras claves:** Candidiasis, efecto aditivo, antifúngico, medicina tradicional, fungicida

In vitro Combination of Essential oil of Eugenia caryophyllata Thunb and amphotericin B on strains of Candida tropicalis. Candida tropicalis is one of the most prevalent Candida non-albicans species in bloodstream infections. Many Candida species have shown resistance to antifungal agents used in treatment. Essential oils have been presented as an alternative due to their potential antifungal activity. The essential oil of Eugenia caryophyllata is used in traditional medicine as an anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and antifungal. In order to test for the latter therapeutic property and search for new antifungal treatment alternatives, antifungal activity of clove oil was evaluated alone and associated with amphotericin B on strains of Candida tropicalis. At concentrations of 512 and 1024 µg/mL inhibition of pseudohyphal formation and development of blastoconidia with altered morphology were observed. The essential oil showed concentration-dependent fungicidal activity, and additive effect in association with amphotericin B. The results of this study are promising, but further studies are necessary to elucidate the mechanism of action.

Keywords:candidiasis, additiveeffect, antifungal, traditional medicine, fungicidal

INTRODUCCIÓN

C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis y C. krusei son responsables alrededor del 95% de las infecciones invasivas producidas por hongos del género Candida (Pfaller y Diekema 2010). Candida tropicalis

es una de las especies de *Candida* no-*albicans* más prevalente, principalmente en América Latina (Pfaller et al. 2000).

En América del Sur y específicamente en el Brasil, *Candida tropicalis* se encuentra como el tercer agente más frecuente aislado en infecciones del torrente sanguíneo (infecciones sistémicas, candidemias) (Pfaller et al.

²Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Centro de Ciencias de la Salud, Universidad Federal de Paraíba – UFPB, Brasil.

³Centro de Ciencias y Educación, Universidad Federal de Campina Grande – UFCG, Brasil.

⁴Departamento de Análisis Clínicas, Universidad Federal do Ceará – UFC, Brasil.

2000; Godoy et al. 2003; Antunes et al. 2004; Almirante et al. 2005; Cheng et al. 2005; Colombo, Nucci y Park 2006; Nucci y Colombo 2007; Silva et al. 2011)

Según el agente etiológico, la mortalidad asociada a *C. albicans* varia de 25 a 45% en diferentes estudios, mientras tanto, cuando se refiere a *C. tropicalis*, dichos porcentajes varían entre 40 a 60% (Pappas, Rex y Lee 2003; Nucci y Colombo 2007).

C. tropicalis presenta considerable potencial biológico como agente oportunista en paciente con cáncer, leucemia y neutropenia (Wingard 1995; Nucci et al. 1998; Almirante et al. 2005; Nucci y Colombo 2007; Silva et al. 2011). Al contrario de C. albicans, la detección de C. tropicalis está frecuentemente asociada con el desarrollo de infecciones fúngicas sistémicas, entretanto diversos determinantes de virulencia son compartidos entre las dos especies (Zaugg y Zepelin 2001; Negri et al. 2012)

Cabe resaltar la existencia de aislados de *Candida* con resistencia *in vitro* e *in vivo* a antifúngicos de uso común destacándose especies de *Candida* no-*albicans*, a las que durante mucho tiempo no se les dio importancia pero que en los últimos años ha crecido la evidencia acerca de la virulencia e importancia de dichas especies (Silva et al. 2011; Nucci y Colombo 2007).

Especies como *C. krusei* y *C. glabrata* presentan resistencia intrínseca al fluconazol, sin embargo, *C. tropicalis* y *C. lusitaneae*, también han presentado una progresiva resistencia a dichos antifúngicos. A pesar de presentar varios efectos adversos, algunos relacionados con la infusión (agudos) como: náuseas, vómitos, fiebre, mialgias etc.; y otros relacionados con las dosis (crónicos): anemia y falla renal, la anfotericina B continua siendo el tratamiento de elección para los casos de candidiasis sistémicas (Ostrosky-Zeichner, Marr,

Rex, and Cohen, 2003; Tan et al. 2008; Negri et al. 2012).

Las limitaciones en el tratamiento ha inducido el uso de terapéutica antifúngica combinada, especialmente en pacientes críticos y como alternativa se han estudiado muchas combinaciones de antifúngicos comerciales y productos naturales (Nishi et al. 2009; Mukherjee et al. 2005; Wagner 2005; Rosato et al. 2008; Amber et al. 2010; Saad et al. 2010; Coutinho et al. 2009; Wagner 2011).

Históricamente, entre los productos naturales los extractos vegetales y en especial los aceites esenciales, han se destacado por sus múltiples usos y propiedades en la medicina popular: antiviral, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relajante, antiséptica, antinflamatoria entre otras (Nascimento et al. 2007; Park et al. 2007; Singh, Baghotia y Goel 2012).

Dichos conocimientos sirvieron de base para muchos trabajos científicos, los cuales confirmaron la notable actividad antifúngica que los aceites esenciales presentan, entre ellos: Cinnamomum zevlanicum, Citrus limon, Eucalyptus citriodora, Eugenia uniflora L., Peumus boldus, Rosmarinus officinialis, Zingiber officinale, Eucalyptus globulus, Cymbopogon winterianus, Thymus vulgaris, y sus fitoconstituyentes eugenol y carvacrol (Chami et al. 2004; Silva et al. 2012; de O. Lima et al. 2006; Bansod y Rai 2008; Castro y Lima 2010; Oliveira et al. 2011; Pereira et al. 2011; de Lira Mota et al. 2012; Lima et al. 2013; de Oliveira Pereira, Mendes, y de Oliveira Lima 2013).

Shin y Lin, 2004, determinaron la actividad antifúngica de diferentes aceites esenciales sobre cepas de *Trichophyton*, en donde se destacó el fuerte sinergismo entre *Pelargonium graveolens* y ketoconazol sobre cepas de *T. erinacei, T. schoenleinii* y *T. soudanense*. Un efecto semejante se observó cuando se evaluó la asociación de sus principales consti-

tuyentes: geraniol y citronelol con ketoconazol, especialmente contra *T. soudanense* y *T. schoenleinii*.

En 2008, Rosato y colaboradores demostraron el efecto sinérgico de la asociación de los aceites esenciales de *Melaleuca alternifolia*, *Origanum vulgare*, *Pelargonium graveolens* con la anfotericina B sobre once cepas de *C. albicans*. Además, la asociación entre *P. gravelens* y anfotericina B se mostró prometedora.

Amber et al. (2010) analizó la interacción del aceite esencial de *Ocimum sanctum* con fluconazol y ketoconazol sobre cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* sensibles y resistentes a fluconazol. De las 74 cepas estudiadas, en apenas 11 cepas no se observó sinergismo.

El aceite esencial de clavo de olor (cravo da índia) proviene de botones florales, de las hojas y troncos del árbol de Syzygium aromaticum (Oriente), Eugenia caryophyllata, Eugenia aromaticum (ocidente) o Eugenia caryophyllus. Existen apenas pequeñas diferencias morfológicas entre estas especies, como presencia y ausencia de pilosidades, pudiendo ser consideradas esencialmente la misma. Además muchos autores citan que son sinónimos (Schmid 1972; Burt and Reinders 2003; Daniel et al. 2009; Milind, Article, y Deepa 2011; Singh et al. 2012)

El aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* Thunb. es ampliamente utilizado y conocido por sus propiedades farmacológicas: actividad antibacteriana (Cai y Wu 1996; Kouidhi, Zmantar y Bakhrouf 2010; Kalemba y Kunicka 2003; Chaieb y Hajlaoui 2007), actividad antifúngica (Bansod y Rai 2008; Gayoso et al. 2005; Trajano et al. 2009; Singh et al. 2012), antiviral (Chaieb y Hajlaoui, 2007; Kurokawa et al. 1998), como anestésico (Altun, Hunt y Usta 2006; Seol et al. 2007), antioxidante (Jirovetz et al. 2007; Chaieb y Hajlaoui 2007; Yanishlieva, Marinova y

Pokorný 2006), anti-carcinogénico (Lee y Shibamoto 2001), insecticida (Yang, Lee, Lee, Choi y Ahn 2003) y repelente de mosquitos (Trongtokit, Rongsriyam, Komalamisra y Apiwathnasorn 2005). Además es muy utilizado en la gastronomía (Milind et al. 2011).

Dada la importancia de los aceites esenciales, en especial las especias que pueden ser utilizadas como alimentos funcionales y la escasa información sobre sus usos, resulta interesante aumentar el conocimiento sobre su potencial actividad antifúngica, buscando el equilibrio entre la aceptabilidad y la eficacia antimicrobiana (Frutuoso et al. 2013; Burt 2004).

Por todo lo expuesto, los objetivos de este trabajo fueron evaluar el efecto de la asociación del aceite esencial de *E. caryophyllata* y la anfotericina B sobre cepas de *C. tropicalis*, observar la acción de dicho aceite sobre la micromorfología y viabilidad fúngica y determinar el tipo de actividad antifúngica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos testados: Aceite esencial (AE) de *Eugenia caryophyllata* Thunb. (Cravo da índia, clavo de olor), que fue adquirido de FERQUIMA Ind. y Com./São Paulo y la anfotericina B de Sigma-Aldrich[®]. El aceite esencial fue analizado previamente por cromatografía gaseosa y se determinó que el principal fitoconstituyente es el eugenol, representando 74,2 %, seguido por el humuleno en un 9,9% (Mendes et al. 2012).

Cepas Fúngicas: Se utilizó una cepa estándar de *Candida tropicalis* ATCC 13803 proveniente del Laboratorio de Micología de la Universidad Federal de Paraíba y cepas clínicas aisladas de sangre CT 01 y CT 05.

Efecto de aceite esencial y anfotericina B sobre la micromorfología de C. tropicalis:

Se utilizó la técnica de micromorfología de levadura, utilizando el medio de cultivo agararroz en cámara húmeda (Sidrim y Rocha 2004). Las emulsiones de aceite esencial v anfotericina B equivalentes a la concentración inhibitoria mínima - CIM v CIMx2 (512 v 1024 μg/mL, 2 y 4 μg/mL, respectivamente) fueron agregadas al el medio de cultivo fundido sobre un porta objeto estéril. Después de solidificado, se sembró la cepa en dos estrías que fueron cubiertas con cubre objeto estéril. La placa fue incubada por 24 horas, 35°- 37°C v la preparación fue examinada en microscopio óptico con aumento de 400x para de observar la presencia de estructuras características como pseudohifas y blastoconidios.

Actividad del aceite esencial sobre la viabilidad fúngica de C. tropicalis (Time-kill)

En este ensayo fue observado el comportamiento de las cepas ATCC 13803 y CT 01, frente a las concentraciones inhibitorias mínimas de AE por el método de conteo de unidades formadoras de colonias. Al principio fue inoculada 0,5 mL de la suspensión de levaduras en 4,5 mL de caldo Sabouraud con concentraciones variadas de AE (CIM/2; CIM; CIM×2; CIM×4).

En los intervalos de 0, 2h, 4h, 8h e 24 h después de la incubación, una alícuota de 10 µL del inóculo fue sembrada de forma uniforme en placas de Petri conteniendo Agar Sabouraud Dextrosa. En las mismas condiciones también fue analizado un grupo control en la ausencia de aceite esencial y antifúngico estándar.

Las placas inoculadas fueron incubadas a 35-37°C por 24-48 horas. Después del periodo de incubación, se realizó el conteo de células viables, que fue expresado en UFC/mL y presentado en forma del gráfico de la curva de muerte microbiana (Klepser et al. 1998; Klepser et al. 1997).

Cuando hubo una reducción menor que 99,9% o de 3log10 de UFC/mL en comparación al control se consideró que el aceite tiene efecto fungistático; si la reducción fue mayor o igual a 99,9% o 3log10 se atribuye al AE actividad fungicida, o sea, que tiene la capacidad de matar microorganismos, al contrario de lo anterior que apenas inhibe el crecimiento (Correa-Royero, Tangarife, Durán, Stashenko y Mesa-Arango 2010; Ernst, Klepser, Wolfe y Pfaller 1997; Roling et al. 2002).

Ensayo de sinergismo - Método checkerboard

El efecto combinado del AE y el antifúngico estándar fue determinado a partir de la técnica de *checkerboard* para la derivación de índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada (Índice CIF). La turbidez de las suspensiones fúngicas fueron comparadas y ajustadas a la presentada por el tubo 0,5 de la escala McFarland, la cual corresponde a un inóculo de aproximadamente 10⁶ UFC/mL.

Para tal técnica se utilizaron microplacas de 96 pocillos, en forma de "U". En cada pocillo, inicialmente se agregó 100 μL de medio de cultivo líquido Sabouraud Dextrosa, posteriormente 50 μL de cada producto test en diferentes concentraciones: CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIM×2, CIM×4 e CIM×8, siendo dispensado en sentido vertical el antifúngico estándar (anfotericina B) y en sentido horizontal el aceite esencial, originando diferentes combinaciones entre los dos productos probados.

Por último se agregó 10 µL de las suspensiones fúngicas, para lo cual se utilizaron las cepas ATCC 13803, CT 01 y CT 05. Las placas fueron incubadas a 35°-37°C por 24–48h donde se observó el crecimiento fúngico. El ensayo fue realizado por duplicado.

El índice CIF se calculó por medio de la suma de CIF^A + CIF^B, A; representa el aceite esencial y B, antifúngico estándar. El CIF^A se

calculó utilizando la relación CIM^A combinado/ CIM^A solo, mientras tanto que CIF^B = CIM^B combinado/CIM^B solo.

Este índice se interpretó de las siguientes formas de sinergismo: sinergismo (<0,5) efecto aditivo (0,5-1,0) indiferencia (>1 e <4) o antagonismo (>4,0) (Correa-Royero et al., 2010; Lewis, Diekema, Messer, Pfaller y Klepser 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En estudios realizados previamente se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) y fungicida mínima (CFM) del aceite esencial de *E. caryophyllata*: 512 μg/mL y 1024 μg/mL, respectivamente. Además, se determinó que el eugenol es el principal constituyente del AE en cuestión, lo cual concuerda con lo encontrado en la literatura (Mendes et al. 2012).

En varios estudios, se demostró que la CIM del eugenol, principal fitoconstituyente, es similar al del aceite esencial de *E. caryophyllata*, con lo cual se puede atribuir que la actividad antimicrobiana de dicho aceite es debido al eugenol y también que el fitocomplejo es tan eficaz como el compuesto aislado, que es más caro y difícil de obtenerse (Pinto et al. 2009; Nzeako, Al-Kharousi, y Al-Mahrooqui 2006; S. Burt 2004). Con el objetivo de continuar elucidando el efecto antifúngico de *E. caryophyllata*, se procedió al estudio de la interferencia de dicho AE sobre la micromorfología de *C. tropicalis*

Las señales visibles de acción del AE sobre los hongos, pueden ser observadas por medio de las alteraciones morfológicas a nivel macroscópico y/o microscópico (Kalemba y Kunicka 2003; Mitchell et al. 2010). En la figura 1 se visualizan las alteraciones morfológicas producidas en la cepa CT 01 luego del tratamiento con las concentraciones CIM y CIMx2 del AE y de la anfotericina B en com-

paración con el grupo control. Además, se observó una inhibición de la formación de pseudohifas, alteraciones en la morfología de blastoconidios y formación de vacuolas en las células y pérdida de contenido citoplasmático.

La formación de hifas y pseudohifas se presentan como factores de virulencia expresos por hongos de género *Candida*, que representan una barrera para la fagocitosis impidiendo su eliminación del tejido epitelial. Los cambios en la morfología están asociados a la patogenicidad del microorganismo, además, los factores ambientales influyen en el estado fisiológico de las levaduras comensales, que se vuelve agente causal de las infecciones (Romani, Bistoni, y Puccetti 2003; Whiteway y Oberholzer 2004).

El AE produjo alteraciones en la morfología de las células fúngicas análogas a las producidas por la anfotericina B, que fue utilizado como un control positivo, ya que esta es utilizada en el tratamiento de candidiasis sistémicas. De esta manera, se puede atribuir que este AE posee un moderado potencial antifúngico, ya que fue capaz de inhibir la formación de hifas y pseudohifas.

Con el objetivo de elucidar si el efecto del aceite esencial del clavo de olor es fungistático o fungicida, dependiente o no de la concentración y o/tiempo, se realizó la técnica de *time-kill*, muy utilizada en la evaluación de nuevos antimicrobianos (Pfaller, Sheehan y Rex 2004).

El AE del clavo de olor mostró efecto fungicida (reducción de 99,9%) sobre la cepa CT 01 a concentraciones de 1024 y 2048 μg/mL, después 4 y 2 horas, respectivamente, como se ve en la figura 2. Sobre la cepa ATCC 13803 (figura 3), el efecto fungicida del AE en las mismas concentraciones se mostró apenas después de 24 horas.

La anfotericina B que fue utilizada en la concentración de 2 µg/mL, correspondiente a la CIM, mostró actividad fungistática sobre

las dos cepas, expresando que su actividad fungicida es dependiente de la concentración (Ernst et al. 1997; Klepser et al. 1997).

De esta manera, se puede decir que este AE presenta actividad dependiente de su concentración, o sea, cuando se aumenta su concentración, mejora el efecto, pasando de fungistático a fungicida. La actividad fungicida es clínicamente más importante de que la fungistática, pese a que no depende del sistema inmunológico para resolver la infección. Se debe resaltar que pacientes inmunodeprimidos necesitan hacer uso profiláctico de drogas fungistáticas, lo cual aumenta la frecuencia del consumo de drogas con resistencia innata o adquirida en casos clínicos (Monk y Goffeau 2008).

Además, cabe resaltar que Márquez, 2010 evaluó la citotoxicidad de la fracción hexánica del clavo de olor sobre líneas celulares normales OK, LLC-PK1 y CHANG en concentraciones de 1000, 100, 10 μg/mL, en donde se encontró un alto porcentaje de viabilidad de las células normales, por encima de 60%. Estos resultados nos estimularon a seguír investigando el efecto del aceite esencial de clavo de olor.

La sinergia entre los agentes antifúngicos ha sido muy utilizada en la clínica médica, siendo evaluado en laboratorio por la técnica de *checkerboard*, que tiene la ventaja de ser fácil de ejecutar y estandarizar (White et al. 1996; Lewis et al. 2002; Hemaiswarya, Kruthiventi y Doble 2008)

Tras a la evaluación del sinergismo entre anfotericina B y el AE de *E. caryophyllata* sobre las cepas clínicas CT 01 y CT 05 y la cepa estándar ATCC 13803 de *C. tropicalis* se observó la disminución de los valores de CIM para ambos productos testeados: una reduc-

ción de 87,5% y 50% en los valores de CIM del AE de Clavo de olor y anfotericina B, respectivamente.

Como se expresa en la tabla 1, el valor de índice de CIF (ICIF) fue de 0,6; lo cual indican un efecto aditivo de la asociación del AE y la anfotericina B sobre cepas de *C. tropicalis*.

La utilización de combinados de productos naturales y antigúngicos en la clínica es cada vez mayor, lo cual se ve reflejado en el aumento de las publicaciones en los últimos años en el área de investigación con fitofármacos (Wagner y Ulrich-Merzenich 2009; Amber et al. 2010; de Lira Mota et al. 2012; de Oliveira Pereira, Mendes y de Oliveira Lima 2013).

La combinación de compuestos derivados de plantas y antibióticos ya fueron probados contra diferentes agentes infecciosos (Hemaiswarya, Kruthiventi y Doble 2008; Amber et al. 2010; Coutinho, Costa, Lima, Falcão-Silva y Siqueira 2009), destacándose la levadura del género *Candida* (Han 2007; Shin y Pyun 2004; Giordani et al. 2004; Saad et al. 2010; Silva et al. 2012).

Nuestros resultados concuerdan con los estudios de Shin y Pyun 2004 y Silva et al. 2011, que describieron el efecto aditivo de la asociación de aceites esenciales y antifúngicos utilizados en la clínica sobre cepas de *C. tropicalis*.

Este tipo de asociación puede ampliar los espectros de acción y eficacia de cada droga, permitiendo así la utilización de concentraciones menores de cada droga, reduciendo los posibles efectos adversos y/o tóxicos (Cuenca-Estrella 2004; Lewis, Viale y Kontoyiannis 2012).

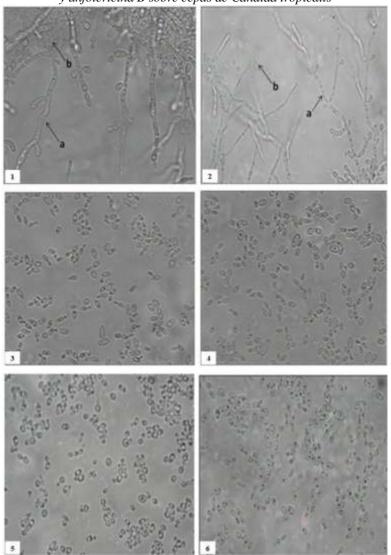


Figura 1: Aspecto microscópico de la *C. tropicalis* cepa CT 01, utilizando la técnica de microcultivo. 1, 2: control; 3: expuesto a anfotericina B – CIM; 4: expuesto a anfotericina B – CIMx2; 5: expuesto al AE de *E. caryophyllata* – CIM; 6: expuesto al AE de *E. caryophyllata* – CIMx2. a: pseudohifas; b: blastoconidios. Aumento de 400x.

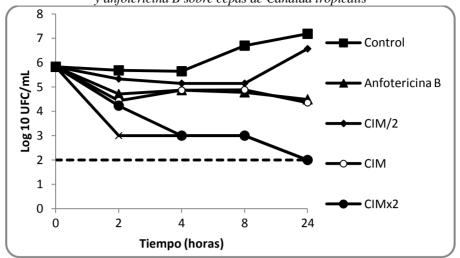


Figura 2: Viabilidad de las estructuras fúngicas de C. tropicalis CT01 en Log10UFC/mL

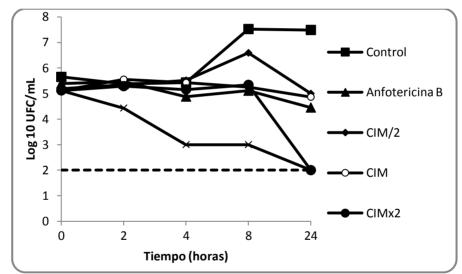


Figura 3: Viabilidad de estructuras fúngicas de C. tropicalis ATCC 13803 en Log10UFC/mL

Tabla 1. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM - μg/mL) e Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (ICIF) después de la combinación del aceite esencial de *E. caryophyllata* con Anfotericina B sobre cepas de *C. tropicalis* CT01, CT05 y ATCC 13803.

Cepas	CII	M associadas (μg/mL)	•	ICIF ^b	
-	AE	Anfotericina B	AE	Anfotericina B	
ATCC 13803	64	1	0,1	0,5	0,6
CT 01	64	1	0,1	0,5	0,6
CT 05	64	1	0,1	0,5	0,6

^aConcentración Inhibitoria Fraccional: ^bÍndice CIF

CONCLUSIONES

En base a nuestros resultados, podemos concluir que el aceite esencial de clavo de olor produce importantes alteraciones micromorfológicas sobre las cepas de *C. tropicalis*, y que su actividad antifúngica es del tipo fungicida dependiente de la concentración y tiempo, además que su asociación con el antifúngico de elección clínica, en este caso la anfotericina B, expresa un efecto aditivo. De esta forma, este aceite esencial se presenta como un prometedor producto antifúngico en el tratamiento de la candidiasis, aunque es necesario dar continuidad a los ensayos para asegurar un futuro uso *in vivo*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Almirante, B., Rodríguez, D., Park, B. J., Cuenca-Estrella, M., Planes, A. M., Almela, M., Pahissa, A. (2005). Epidemiology and predictors of mortality in cases of Candida bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1829–1835. doi:10.1128/JCM.43.4.1829-1835.2005

Altun, T., Hunt, A. Ö., & Usta, F. (2006). Effects of Clove Oil and Eugenol on Anaesthesia and Some Hematological Parameters of European Eel Anguilla anguilla, L., 1758. *Journal of Applied Animal Research*, 30(2), 171–176. doi:10.1080/09712119.2006.9706612

Amber, K., Aijaz, A., Immaculata, X., Luqman, K. a, & Nikhat, M. (2010). Anticandidal effect of Ocimum sanctum essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 17(12), 921–5. doi:10.1016/j.phymed.2010.02.012

Antunes, A. G. V., Pasqualotto, A. C., Diaz, M. C., d'Azevedo, P. A., & Severo, L. C. (2004). Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 46(5), 239–241. doi:/S0036-46652004000500001

Bansod, S., & Rai, M. (2008). Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic Aspergillus fumigatus and A. niger. World Journal of Medical Sciences,

- Steviana Vol. 6. 2014. Moura et al. Asociación in vitro del aceite esencial Eugenia caryophyllata Thunb. y anfotericina B sobre cepas de Candida tropicalis
 - 3(2), 81–88. Retrieved from http://idosi.org/wjms/3(2)08/7.pdf
 - Burt. (2004).Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. International Journal ofFood Microbiology. 94(3). 223-53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
 - Burt, S. a, & Reinders, R. D. (2003).

 Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O157:H7. Letters in Applied Microbiology, 36(3), 162–7. Retrieved from
 - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/125 81376
 - Cai, L., & Wu, C. D. (1996). Compounds from Syzygium aromaticum possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products*, 59(10), 987–990. doi:10.1021/np960451q
 - Castro, R. D., & Lima, E. de O. (2010). Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de. *Revista de Odontologia Da UNESP*, 39(3), 179–184.
 - Chaieb, K., & Hajlaoui, H. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, Eugenia caryophyllata (Syzigium aromaticum L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy* ..., 506(December 2006), 501–506. doi:10.1002/ptr
- Chami, N., Chami, F., Bennis, S., Trouillas, J., & Remmal, a. (2004). Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 8(3), 217–26. doi:/S1413-86702004000300005
- Cheng, M.-F., Yang, Y.-L., Yao, T.-J., Lin, C.-Y., Liu, J.-S., Tang, R.-B., ... Lo, H.-J. (2005). Risk factors for fatal candidemia

- caused by Candida albicans and non-albicans Candida species. *BMC Infectious Diseases*, *5*, 22. doi:10.1186/1471-2334-5-22
- Colombo, A., Nucci, M., Park, B., Nouér, S., Arthington-Skaggs, B., da Matta, D., ... Morgan, J. (2006). Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical* ..., 44(8), 2816–2823. doi:10.1128/JCM.00773-06
- Correa-Royero, J., Tangarife, V., Durán, C., Stashenko, E., & Mesa-Arango, A. (2010). In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against Candida krusei and Aspergillus fumigatus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(5), 734–741. doi:10.1590/S0102-695X2010005000021
- Coutinho, H. D. M., Costa, J. G. M., Lima, E. O., Falcão-Silva, V. S., & Siqueira, J. P. (2009). Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillinresistant Staphylococcus aureus by Turnera ulmifolia L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9, 13, doi:10.1186/1472-6882-9-13
- Coutinho, H. D. M., Costa, J. G. M., Lima, E. O., Falcão-Silva, V. S., & Siqueira-Júnior, J. P. (2009). Potentiating effect of Mentha arvensis and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *In Vivo (Athens, Greece)*, 23(2), 287–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/194 14416
- Cuenca-Estrella, M. (2004). Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? *Journal of Antimicrobial* ..., 54(5), 854–69. doi:10.1093/jac/dkh434

- Steviana Vol. 6. 2014. Moura et al. Asociación in vitro del aceite esencial Eugenia caryophyllata Thunb. y anfotericina B sobre cepas de Candida tropicalis
 - Daniel, A. N., Sartoretto, S. M., Schmidt, G., Caparroz-assef, S. M., Bersani-amado, C. A., Cuman, R. K. N., & Merr, E. L. (2009). Artigo Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(November 2008), 212–217.
 - De Lira Mota, K. S., de Oliveira Pereira, F., de Oliveira, W. A., Lima, I. O., & de Oliveira Lima, E. (2012). Antifungal activity of Thymus vulgaris L. essential oil and its constituent phytochemicals against Rhizopus oryzae: interaction with ergosterol. *Molecules* (*Basel, Switzerland*), 17(12), 14418–33. doi:10.3390/molecules171214418
 - De Oliveira Pereira, F., Mendes, J. M., & de Oliveira Lima, E. (2013). Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against Trichophyton rubrum. *Medical Mycology*, 51(5), 507–13. doi:10.3109/13693786.2012.742966
 - Ernst, M. E., Klepser, M. E., Wolfe, E. J., & Pfaller, M. a. (1997). Antifungal dynamics LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against Candida *Microbiology* Diagnostic Infectious Disease. 26(3-4). 125-31. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/907 8447
 - Frutuoso, A. E., Teotonio, N., Leda, T., Lemos, G. De, Coelho, E. L., Maria, D., & Teixeira, A. (2013). REBRAPA. *Revista Brasileira de Pesquisa Em Alimentos*, 4(2), 69–81.
 - Gayoso, C. W., Lima, E. O., Oliveira, V. T., Pereira, F. O., Souza, E. L., Lima, I. O., & Navarro, D. F. (2005). Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to Eugenia cariophyllata essential oil and eugenol.

- *Fitoterapia*, 76(2), 247–249. doi:10.1016/j.fitote.2004.12.005
- Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikaïl, C., Abou, L., & Portugal, H. (2004). Antifungal effect of various essential oils against Candida albicans. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from Thymus vulgaris. *Phytotherapy Research*, *18*(12), 990–5. doi:10.1002/ptr.1594
- Godoy, P., Tiraboschi, I. N., Severo, L. C., Bustamante, B., Calvo, B., Almeida, L. P. De, ... Colombo, A. L. (2003). Species distribution and antifungal susceptibility profile of Candida spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(3), 401–5. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/128 86424
- Han, Y. (2007). Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to Candida albicans. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 14(11), 733–738. doi:10.1016/j.phymed.2007.08.004
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 15(8), 639–52. doi:10.1016/j.phymed.2008.06.008
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Schmidt, E., Stoyanova, A. S., Denkova, Z., Nikolova, R., & Geissler, M. (2007). Purity, Antimicrobial Activities and Olfactoric Evaluations of Geraniol/Nerol and Various of Their Derivatives. *Journal of Essential Oil Research*, 19(3), 288–291. doi:10.1080/10412905.2007.9699283
- Kalemba, D., & Kunicka, a. (2003). Antibacterial and antifungal properties of

- Steviana Vol. 6. 2014. Moura et al. Asociación in vitro del aceite esencial Eugenia caryophyllata Thunb. y anfotericina B sobre cepas de Candida tropicalis
 - essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, *10*(10), 813–29. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/126 78685
 - Klepser, M. E., Ernst, E. J., Ernst, M. E., Messer, S. a, & Pfaller, M. a. (1998). Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(6), 1387–91. Retrieved from
 - http://www.pubmedcentral.nih.gov/articler ender.fcgi?artid=105609&tool=pmcentrez &rendertype=abstract
 - Klepser, M. E., Wolfe, E. J., Jones, R. N., & Nightingale, C. H. (1997). Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of Fluconazole and Amphotericin B Tested against Candida albicans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(6), 1392–1395.
 - Kouidhi, B., Zmantar, T., & Bakhrouf, A. (2010). Anticariogenic and cytotoxic activity of clove essential oil (Eugenia caryophyllata) against a large number of oral pathogens. *Annals of Microbiology*, 60(4), 599–604. doi:10.1007/s13213-010-0092-6
 - Kurokawa, M., Hozumi, T., Basnet, P., Nakano, M., Kadota, S., Namba, T., ... Shiraki, K. (1998). Purification and Characterization of Eugeniin as an Antiherpesvirus Compound from Geum japonicum and Syzygium aromaticum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284(2), 728–735. Retrieved from http://jpet.aspetjournals.org/cgi/content/long/284/2/728
 - Lee, K.-G., & Shibamoto, T. (2001). Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [Syzygium aromaticum (L.) Merr. et Perry]. *Food*

- *Chemistry*, 74(4), 443–448. doi:10.1016/S0308-8146(01)00161-3
- Lewis, R. E., Diekema, D. J., Messer, S. a, Pfaller, M. a, & Klepser, M. E. (2002). chequerboard Comparison of Etest. dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against species. Journal Candida TheAntimicrobial Chemotherapy, 49(2), 345-Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/118 15578
- Lewis, R. E., Viale, P., & Kontoyiannis, D. P. (2012). The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to Candida. *Virulence*, *3*(4), 368–76. doi:10.4161/viru.20746
- Lima, I. de O., Oliveira, R. de A. G., Lima, E. de O., Farias, N. M. P., & Souza, E. L. De. (2006). Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(2), 197–201.
- Lima, I. O., Pereira, F. de O., Oliveira, W. A. de, Lima, E. de O., Menezes, E. A., Cunha, F. A., & Diniz, M. de F. F. M. (2013). Antifungal activity and mode of action of carvacrol against Candida albicans strains. *Journal of Essential Oil Research*, 25(2), 138–142. doi:10.1080/10412905.2012.754728
- Márquez, B. P. (2010). Componentes químicos con actividad bactericida, fungicida y citotóxica de plantas de la familia Myrtaceae y Lauraceae. Universidad Autónomas de Nuevo León. Retrieved from http://eprints.uanl.mx/2710/1/tesis_doctor ado_BPM.pdf
- Mendes, J. M., Sarmento Guerra, F. Q., Oliveira Pereira, F. de, Pereira de Sousa, J., Nogueira Trajano, V., & Oliveira Lima, E. de. (2012). Actividad antifúngica del

- aceite esencial de Eugenia caryophyllata sobre cepas de Candida tropicalis de aislados clínicos. ... *Latinoamericano Y Del ...*, *11*(3), 208–217. Retrieved from http://www.indi.usach.cl/ojs/index.php/bla cpma/article/view/621
- Milind, P., Article, R., & Deepa, K. (2011). Available online through CLOVE: A CHAMPION SPICE. International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy, 2(1), 47–54.
- Mitchell, T. C., Stamford, T. L. M., Souza, E. L. de, Lima, E. de O., & Carmo, E. S. (2010). Origanum vulgare L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic Aspergilli. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 30(3), 755–760. doi:10.1590/S0101-20612010000300029
- Monk, B. C., & Goffeau, A. (2008). Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5887), 367–369. doi:10.1126/science.1159746
- Mukherjee, P. K., Sheehan, D. J., Christopher, A., Ghannoum, M. A., & Hitchcock, C. A. (2005). Combination Treatment of Invasive Fungal Infections Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1). doi:10.1128/CMR.18.1.163
- Nascimento, P. F. C., Nascimento, A. C., Rodrigues, C. S., Antoniolli, Â. R., Santos, P. O., Barbosa Júnior, A. M., & Trindade, R. C. (2007). Divulgação Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17(1), 108–113.
- Negri, M., Silva, S., Henriques, M., & Oliveira, R. (2012a). Insights into Candida tropicalis nosocomial infections and virulence factors. *European Journal of Clinical Microbiology* & *Infectious*

- *Diseases*, 31(7), 1399–1412. doi:10.1007/s10096-011-1455-z
- Negri, M., Silva, S., Henriques, M., & Oliveira, R. (2012b). Insights into Candida tropicalis nosocomial infections and virulence factors. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(7), 1399–1412. doi:10.1007/s10096-011-1455-z
- Nishi, I., Sunada, A., Toyokawa, M., Asari, S., & Iwatani, Y. (2009). In vitro antifungal combination effects micafungin with fluconazole. voriconazole. amphotericin B. flucytosine against clinical isolates of Candida species. Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy, 15(1), 1-5. doi:10.1007/s10156-008-0653-9
- Nucci, M., & Colombo, A. L. (2007a). Candidemia due to Candida tropicalis: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(1), 77–82. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.11.009
- Nucci, M., & Colombo, A. L. (2007b). Candidemia due to Candida tropicalis: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(1), 77–82. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.11.009
- Nucci, M., Silveira, M. I., Spector, N., Silveira, F., Velasco, E., Martins, C. A., ... Pulcheri, W. (1998). Fungemia in cancer patients in Brazil: Predominance of non-albicans species. *Mycopathologia*, 141(2), 65–68. doi:10.1023/A:1006951619245
- Nzeako, B. C., Al-Kharousi, Z. S. N., & Al-Mahrooqui, Z. (2006). Antimicrobial

- activities of clove and thyme extracts. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, *6*(1), 33–9. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articler ender.fcgi?artid=3074903&tool=pmcentre z&rendertype=abstract
- Oliveira, W. A. de, Pereira, F. de O., Luna, G. C. D. G. de, Lima, I. O., Wanderley, P. A., Lima, R. B. de, & Lima, E. de O. (2011). Antifungal activity of Cymbopogon winterianus jowitt ex bor against Candida albicans. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 433–441. doi:10.1590/S1517-83822011000200004
- Ostrosky-Zeichner, L., Marr, K. a, Rex, J. H., and Cohen, S. H. (2003). Amphotericin B: time for a new "gold standard". *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 37(3), 415–25. doi:10.1086/376634
- Pappas, P., Rex, J., and Lee, J. (2003). A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clinical Infectious* ..., 0006, 0–9. Retrieved from http://cid.oxfordjournals.org/content/37/5/634.short
- Park, M., Gwak, K., Yang, I., Choi, W., Jo, H., Chang, J., ... Choi, I. (2007). Antifungal Activities of the Essential Oils in Syzygium aromaticum (L.) Merr. Et Perry and Leptospermum petersonii Baile y and their Constituents against Various Dermatophytes. *The Journal of Microbiology*, 45(5), 460–465.
- Pereira, F. de O., Wanderley, P. A., Viana, F. A. C., Lima, R. B. de, Sousa, F. B. de, Santos, S. G. dos, and Lima, E. de O. (2011). Effects of Cymbopogon winterianus Jowitt ex Bor essential oil on the growth and morphogenesis of Trichophyton mentagrophytes. *Brazilian*

- Journal of Pharmaceutical Sciences, 47(1), 145–153. doi:10.1590/S1984-82502011000100018
- Pfaller, M. A., Jones, R. N., Doern, G. V, Sader, H. S., Messer, S. A., and Houston, A. (2000). Bloodstream Infections Due to Candida Species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998, 44(3), 747–751.
- Pfaller, M. A., Sheehan, D. J., and Rex, J. H. (2004). Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization, 17(2), 268–280. doi:10.1128/CMR.17.2.268
- Pinto, E., Vale-Siva, L., Cavaleiro, C., and Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from Syzygium aromaticum on Candida, Aspergillus and dermatophyte species. Journal of Medical Microbiology, 58(The composition and antifungal activity of clove essential oil (EO), obtained from Syzygium aromaticum, were studied. Clove oil was obtained commercially and analysed by GC and GC- MS. The EO analysed showed a high content of eugenol (85.3 MICs. deter), 1454-1462. %). doi:10.1099/jmm.0.010538-0
- Roling, E. E., Klepser, M. E., Wasson, A., Lewis, R. E., Ernst, E. J., and Pfaller, M. A. (2002). Antifungal activities of fluconazole, caspofungin (MK0991), and anidulafungin (LY 303366) alone and in combination against Candida spp. and Crytococcus neoformans via time-kill methods, 43, 13–17.
- Romani, L., Bistoni, F., and Puccetti, P. (2003). Adaptation of Candida albicans to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Current Opinion in*

- Steviana Vol. 6. 2014. Moura et al. Asociación in vitro del aceite esencial Eugenia caryophyllata Thunb. y anfotericina B sobre cepas de Candida tropicalis
 - *Microbiology*, 6(4), 338–343. doi:10.1016/S1369-5274(03)00081-X
 - Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L., and Mallamaci, R. (2008). The inhibition of Candida species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 15(8), 635–8. doi:10.1016/j.phymed.2008.05.001
 - Saad, A., Fadli, M., Bouaziz, M., Benharref, A., Mezrioui, N., and Hassani, L. (2010). Phytomedicine Anticandidal activity of the essential oils of Thymus maroccanus and Thymus broussonetii and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *European Journal of Integrative Medicine*, 17(13), 1057–1060. doi:10.1016/j.phymed.2010.03.020
 - Schmid, R. (1972). A Resolution of the Eugenia-Syzygium Controversy (Myrtaceae). *American Journal of Botany*, 59(4), 423. doi:10.2307/2441553
 - Seol, D.-W., Lee, J., Im, S.-Y., and Park, I.-S. (2007). Clove oil as an anaesthetic for common octopus (Octopus minor, Sasaki). *Aquaculture Research*, 38(1), 45–49. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01622.x
 - Shin, S., and Pyun, M.-S. (2004). Anti-Candida effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. *Phytotherapy Research: PTR*, 18(10), 827–830. doi:10.1002/ptr.1573
 - Sidrim, J. J. C., and Rocha, M. F. G. (2004). *Micologia médica à luz de autores contemporâneos* (1st ed., p. 408). GUANABARA. Retrieved from http://books.google.com.py/books?id=5hT sGwAACAAJ
 - Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonça, D. I., and Domingues, F. C. (2011). Antifungal activity of Coriandrum sativum essential oil, its mode of action

- against Candida species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 19(1), 42–47. doi:10.1016/j.phymed.2011.06.033
- S., Negri, M., Henriques, M., Williams, D. W., and Azeredo, J. (2012). Candida glabrata, Candida parapsilosis tropicalis: Candida biology, and epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. Federation European Microbiological Societies, 36, 288-305. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x
- Singh, J., Baghotia, A., and Goel, S. P. (2012). Eugenia caryophyllata Thunberg (Family Myrtaceae): A Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(4), 1469–1475.
- Tan, T., Tan, A., Tee, N., and Ng, L. (2008). A retrospective analysis of antifungal susceptibilities of Candida bloodstream isolates from Singapore hospitals. *Ann Acad Med Singapore*, *37*(10), 835–40. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/190 37517
- Trajano, V. N., Lima, E. de O., Souza, E. L. de, and Travassos, A. E. R. (2009). Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 29(3), 542–545. doi:10.1590/S0101-20612009000300014
- Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., and Apiwathnasorn, C. (2005). Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Research: PTR*, 19(4), 303–9. doi:10.1002/ptr.1637
- Wagner, H. (2005). Natural products chemistry and phytomedicine in the 21st

- Steviana Vol. 6. 2014. Moura et al. Asociación in vitro del aceite esencial Eugenia caryophyllata Thunb. y anfotericina B sobre cepas de Candida tropicalis
 - century: New developments and challenges. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1), 1–6. doi:10.1351/pac200577010001
 - Wagner, H. (2011). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*, 82(1), 34–7. doi:10.1016/j.fitote.2010.11.016
 - Wagner, H., and Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2), 97–110. doi:10.1016/j.phymed.2008.12.018
 - White, R. L., Burgess, D. S., Manduru, M., and Bosso, J. a. (1996). Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(8), 1914–8. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articler ender.fcgi?artid=163439&tool=pmcentrez &rendertype=abstract
 - Whiteway, M., and Oberholzer, U. (2004). Candida morphogenesis and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 7(4), 350–7.

- doi:10.1016/j.mib.2004.06.005
- Wingard, J. R. (1995). Importance of Candida species other than C. albicans as pathogens in oncology patients. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 20(1), 115–125. Retrieved from
 - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/772 7637
- Yang, Y.-C., Lee, S.-H., Lee, W.-J., Choi, D.-H., and Ahn, Y.-J. (2003). Ovicidal and adulticidal effects of Eugenia caryophyllata bud and leaf oil compounds on Pediculus capitis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(17), 4884–4888. doi:10.1021/jf034225f
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E., and Pokorný, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *108*(9), 776–793. doi:10.1002/ejlt.200600127
- Zaugg, C., and Zepelin, M. B. (2001). Secreted Aspartic Proteinase Family of Candida tropicalis. *Infection and* ..., 69(1), 405–412. doi:10.1128/IAI.69.1.405

Caracterización biológica del Arroyo San Lorenzo en el tramo del Campus Universitario-UNA

Gilberto Antonio Benítez Rodas¹, Héctor David Nakayama², Juliana Moura Arrúa³, Griselda Franco Cardozo⁴, Rocío Rosmary Acosta Brítez⁵, Liza María Ramírez Garay⁶

E mail del autor: antoniocemit@hotmail.com

Caracterización biológica del Arroyo San Lorenzo en el tramo del Campus Universitario-UNA. El Paraguay se caracteriza por presentar una gran cantidad de recursos hídricos. Muchos de ellos atraviesan zonas urbanas densamente pobladas, por lo cual quedan expuestos a contaminación proveniente de diferentes actividades de origen antropogénico. Uno de los principales problemas relacionados con estos recursos hídricos es la falta de información o trabajos de investigaciones que hayan sido publicados acerca de las poblaciones de microorganismos presentes en dichos ecosistemas. Entre estos recursos hídricos expuestos se encuentra el arroyo San Lorenzo; aqua por lo tanto, esta investigación tuvo como objetivo caracterizar al arroyo San Lorenzo en el tramo del Campus Universitario de la Universidad Nacional de Asunción desde el punto de vista biológico (fitoplancton, zooplancton, hongos y parásitos). Al finalizar la investigación se identificaron 38 géneros de algas, 2 sub-grupos de zooplancton, 16 géneros de hongos, 2 géneros de parásitos. La mayoría de los géneros son bioindicadores de mala calidad del agua. Palabras clave: Cianobacterias, Hongos, Parásitos, Arroyo San Lorenzo, Campus Universitario

Biological Characterization of San Lorenzo Creek in a Section located near the Campus of the National University of Asuncion. Paraguay is characterized by possessing a large amount of water resources, many of which pass through densely populated urban areas, which exposes them to pollution from different anthropogenic activities. One of the main problems related to these water resources is the lack of information or research papers that have not been published about the populations of microorganisms in these ecosystems. The San Lorenzo Creek is counted among these exposed water resources, hence this research aimed to characterize the of San Lorenzo Creek in a section of the campus of the National University of Asuncion from a biological viewpoint (phytoplankton, zooplankton, fungi and parasites). Upon completion of the research we identified 38 genera of algae, 2 sub-groups of zooplankton, 16 genera of fungi, and 2 genera of parasites. Most genera are bioindicators of poor water quality. Keywords: Cyanobacteria, fundi, parasites, San Lorenzo Creek, University Campus,

INTRODUCCIÓN

En la actualidad en Paraguay, que es un país que se caracteriza por presentar una gran cantidad de recursos hídricos existen muy pocos trabajos de investigaciones relacionados con la biodiversidad biológica en cuanto a fitoplancton, zooplancton, hongos y parásitos que cumplen funciones muy importantes dentro del sistema acuático y que además hayan sido publicados en revistas a nivel nacional e internacional.

El conocimiento de la biodiversidad en los ambientes acuáticos, así como el estudio de las condiciones fisicoquímicas del agua es muy relevante y necesario (Vila and Pardo

¹Microbiólogo y Docente Investigador del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas dependiente de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica (DGICT-UNA).

²Bioquímico y Docente Investigador Exclusivo de la Universidad Nacional de Asunción.

³Bioquímica y Docente Investigador del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas.

⁴Bióloga y Docente Técnico del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas

⁵Bióloga y estudiante de la maestría en Biotecnología del CEMIT-DGICT-UNA

⁶Bioquímica y estudiante de la maestría en Biotecnología del CEMIT-DGICT-UNA

2003; Romo 1989), porque sirven de base (datos e informaciones) como antecedentes para posteriores trabajos de investigaciones o monitoreos de la calidad de agua de un determinado sistema acuático, sobre todo en los cursos de aguas que sufren un gran estrés como el arroyo San Lorenzo por el creciente impacto o contaminación de origen antropogénico.

Teniendo estos antecedentes es muy importante empezar a realizar estudios con el objetivo de crear una base de datos de los géneros y especies de algas, zooplancton, hongos y parásitos presentes en los diversos ríos, lagos, arroyos y esteros que se encuentran ubicados sobre todo en la región oriental del Paraguay, donde se encuentra la mayor densidad poblacional del país de manera a tener datos para poder comparar en el futuro con otros trabajos.

La ciudad de San Lorenzo se encuentra situada en el Departamento Central del Paraguay y está a 9 kilómetros de la Capital. Forma parte del conglomerado urbano llamado Área Metropolitana de Asunción o Gran Asunción y limita al norte con Luque, al sur con Ñemby, al este con Capiatá y al oeste con Fernando de la Mora.

Esta ciudad también es conocida como la "Ciudad Universitaria" debido a que se encuentra dentro de sus límites, la sede central y el campus de la Universidad Nacional de Asunción (UNA).

En esta ciudad comercial e industrial también se encuentra un arroyo que lleva el mismo nombre "San Lorenzo" que tiene su naciente en el Barrio Barcequillo y que desemboca en el arroyo Yukyry y que a su vez, este constituye uno de los principales afluentes del Lago Ypacaraí que es el centro turístico y

comercial más importante en la temporada de verano del Departamento Central del Paraguay.

Debido a que este arroyo es utilizado principalmente para la eliminación de los desechos domésticos e industriales, existen una gran cantidad de trabajos de investigación de los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos, para el control de la calidad del agua del mismo pero que muchos de los cuales no fueron publicados en revistas científicas.

Sin embargo, desde el punto de vista del fitoplancton, zooplancton, fúngico y a nivel de parásitos no existen suficientes informaciones acerca de la población existente en éste sistema acuático. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo de investigación fue caracterizar dicha población en un tramo, de tal manera a crear un banco de datos inicial accesible para futuros trabajos tendientes a completar todo el arroyo y poder comparar con otros variados cursos hídricos existentes en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Puntos de Muestreos

Se seleccionaron cuatro puntos de muestreos teniendo en cuenta la accesibilidad al arroyo. Se denominó P1 al punto de muestreo ubicado en el puente de la avda. Mcal. López, P2 a la entrada de la Ciclo Vía ubicada sobre la avenida España, P3 a la entrada ubicada sobre la calle Sargento Silva y P4 al ubicado sobre el puente de la avda. Eusebio Ayala (Figura 1). Todos los puntos fueron georeferenciados (Cuadro 1).

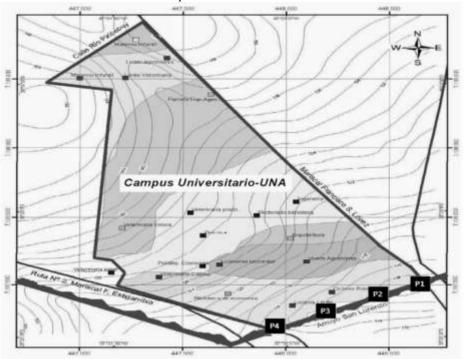


Figura 1. Mapa con los diferentes puntos de muestreos () en el Arroyo San Lorenzo (Gentileza Lic. Claudia Ávalos)

Cuadro 1. Coordenadas UTM de los puntos de muestreo estudiados durante las cuatro campañas de muestreo. P1: Puente Avda. Mcal. López; P2: Puente Ciclovía- Avda. España; P3: Puente Ciclovía- c/ Sargento Silva; P4: Puente Avda. Eusebio Ayala

PUNTOS	ELEVACIÓN	COORDENADAS
P1	125 m.	21J0447943 UTM 7197189
P2	119 m.	21J0448171 UTM 7197313
Р3	131 m.	21J0448440 UTM 7197433
P4	116 m.	21J0448690 UTM 7197491

Campaña de muestreos

Se realizaron cuatro campañas de muestreos, la primera el 22 de noviembre del 2012, la segunda el 16 de enero de 2013, la tercera el 28 de mayo y la cuarta el 06 de noviembre del mismo año. La primera y la segunda correspondieron a inicio y final del verano, la segunda a finales de otoño e inicio de invierno, y la cuarta a finales de la primavera. Por lo tanto, se realizaron los muestreos en diferentes estaciones del año de manera a poder observar si las diferentes estaciones afectan en forma cualitativa a la biodiversidad presente en el arroyo.

Las muestras fueron colectadas de los cuatro puntos del arroyo San Lorenzo por duplicado, para luego realizar un pool en el laboratorio, de manera a analizar e identificar la mayor cantidad posible de especies.

Parámetros Analizados

Fitoplancton

Una vez recepcionadas las muestras (filtradas con una red de 45 um x 20 litros) en el

laboratorio, se mezclaron vigorosamente cada frasco de 250 mL para luego depositar 25 mL en los tubos de Utermöhl y se deja sedimentar por 24 h. para su posterior observación bajo microscopio invertido Motic AE 31 con un aumento de 400x. Para la identificación de los géneros y especies se utilizaron diferentes claves taxonómicas (Bourrelly 1966; Da Silva 2000; De Infante 1988; El Moor-Loureiro 1997; Komárek and Fott 1983; Philipose 1967; Santos 1992; Sato 1997; Streble and Krauter 1987).

Zooplancton

Las muestras de 100 ml (filtradas con una red de 45 um x 20 litros) se mezclaron en forma vigorosa y una sub-muestra de 10 ml fue tomada con una jeringa de gran calibre y puesta en una placa cuadrada de Petri cuadriculada. Con el uso de un microscopio invertido Nikon 205914 con un aumento de 100x, se identificaron hasta especie siempre que fuera posible (El Moor-Loureiro 1997).

Hongos

Se utilizó el método de dilución en placas descrito en Standard Methods APHA (1998). De la muestra de 100 mL se mezcló en forma vigorosa y se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ y 10⁻² en sub-muestras de 10 mL. Posteriormente se sembró 100 µL de cada dilución en placas de Petri de 90 mm con medio agar papa dextrosa suplementado con antibiótico, se incubó a temperatura ambiente y 5 a 7 días después se evaluaron las características de las colonias fúngicas. Fueron preparadas láminas para visualización el Microscopio binocular CXL 9135002 y en algunos casos fueron purificadas las colonias fúngicas y entonces observada bajo microscopio.

Parásitos

Se tomaron muestras de sedimento del arroyo mediante una pala tipo Petersen y se colocaron dentro de una bolsa de plástico con formol al 10% (APHA, AWWA, and WPCF 1998). Como pre-tratamiento, cada muestra fue filtrada previamente mediante el uso de gazas, el filtrado fue colocado en tubos de centrifuga de 15 mL. A continuación se procedió al lavado con agua destilada, mediante centrífuga DSC 16 RV marca Presvac, a velocidad de 1500 rpm durante 5 minutos. Se realizó esta acción hasta obtención de sobrenadante de aspecto claro. El sedimento recuperado fue separado en dos fracciones y mantenido en refrigeración.

Se aplicaron dos métodos de análisis cualitativos para la búsqueda de parásitos:

Técnica de Concentración por centrifugación y Flotación con Sulfato de Zinc al 33%

La técnica descrita es una adaptación del método propuesto por Standard Methods APHA (1998) para la determinación de parásitos en aguas. Este método es efectivo para la concentración de quistes de protozoarios y huevos de helmintos y algunos céstodes.

Técnica de Sedimentación por centrifugación con Formol-Éter

La técnica descrita es una adaptación de la técnica utilizada para análisis clínicos. Este método es efectivo para concentrar quistes de protozoarios, huevos y larvas de helmintos, recomendados para detectar huevos de trematodos, acantocéfalos y algunos huevos de céstodes que no son aislados por el método de centrifugación con sulfato de zinc.

Se realizaron muestras por cuadruplicado para cada método de análisis y fueron observados por microscopia con aumento de 10X y

40X con solución fisiológica y con solución de lugol.

Análisis de Datos

Para el procesamiento de los datos obtenidos de los diferentes grupos de microorganismos analizados en éste trabajo de investigación se utilizaron los programas Microsoft Excel 2010 y Sigma Plot 11.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fitoplancton

Durante los cuatro muestreos se identificaron 14 géneros de Bacillariophytas, 13 géneros de Chlorophytas, 6 géneros de Cianobacterias, 4 géneros de Euglenophytas y 1 género de Cryptophytas (Cuadros 2-6).

En las cuatro campañas de muestreo se registraron las mismas divisiones de algas, sin embargo al hacer un análisis de presencia o ausencia de géneros (frecuencia) en los diferentes muestreos, sí pudo observarse una variación importante en especial en el caso de las Chlorophytas y Bacillariophytas, no así en el caso de las Cianobacterias, Euglenophytas y Cryptophytas (Figura 2).

En cuanto a la contribución relativa de las diferentes taxas durante el primer muestreo la división con mayor abundancia de géneros y especies fue la Bacillariophyta con un 58,8%, seguida de las Cianobacterias con un 29,4%, luego en igual porcentajes las Euglenophytas y Chlorophytas con un 5,9% y por último ausencia de las Cryptophytas.

Sin embargo en el segundo muestreo la división con mayor abundancia de géneros y especies estuvo dada por las Chlorophytas con un 51,9%, seguida por las Bacillariophytas con un 29,6%, luego las Cianobacterias con un 11,1%, a continuación las Euglenophytas con un 7,4% y ausencia de las Cryptophytas.

En el tercer muestreo al igual que el anterior se registró una mayor abundancia de las Chlorophytas con un 35,3%, seguido por las Bacillariophytas con un 23,5%, con un leve aumento de las Cianobacterias con un 17,6% y un aumento importante de las Euglenophytas con un 17,6%. Durante este muestreo se registró la presencia de la división Cryptophytas con 5,9%.

Al igual que en el segundo y tercer muestreo, en el cuarto se caracterizó de nuevo por una mayor biodiversidad de las Chlorophytas con un 30,4%, seguidas de las Bacillariophytas con un 30,4%, Euglenophytas y Cianobacterias con un 17,4% cada una, y en el caso de las Cryptophytas con un 4,3%.

A pesar de que el arroyo San Lorenzo se encuentra expuesto a una gran cantidad de contaminantes tanto de origen industrial como doméstico, principalmente de las redes cloacales, se ha registrado una abundante biodiversidad de géneros de algas. Sin embargo al hacer un análisis individual de los géneros lo preocupante radica en la biodiversidad de Cianobacterias presentes en el arroyo, en el cual se han identificado especies como Aphanocapsa delicatissima, Cylindrospermopsis raciborskii, Microcystis aeruginosa, Microcystis flo-aquae, y géneros como Aphanocapsa sp, Chroococcus sp, Oscillatoria sp y Pseudanabaena sp. Esto es debido a que el arroyo San Lorenzo es uno de los principales afluentes del Arroyo Yukyry que finalmente desemboca en el Lago Ypacaraí y que por lo tanto podría contribuir a empeorar la situación del Lago que afínales del año anterior presentó una importante floración por diversas especies de Cianobacterias y muchas de las cuales coincide con las identificadas en el arroyo y que además estaría aportando nutrientes como el Nitrógeno (N) y fósforo (P), y que podría contribuir con las floraciones de las algas verde-azuladas (Henry 1990; Alonso et al. 2008; Conti, Rodríguez, and Angelaccio

2005; De León 2005; Fabre et al. 2010; Pizzolon 1996).

Zooplancton

También la presencia de Euglenophytas es un bioindicador de que el arroyo presenta abundante concentración de materia orgánica (Begun 2006) y que al descomponerse se convierte en una importante fuente de nutrientes principalmente de N y P para las Cianobacterias (Sánchez 2011; Fabre et al. 2010; Henry 1990) como ya se ha mencionado en el párrafo anterior .

Desde la primera hasta la tercera campaña de muestreo no se registraron géneros pertenecientes al grupo de zooplancton, mientras que en la cuarta campaña se registraron dos grupos, uno de los Cladóceros (*Daphnia sp.*) y el otro de los Copépodos (Figura 3). En el caso de este último se pudieron identificar dos sub-grupos, uno perteneciente al estadio denominado Nauplius, y un adulto del sub-grupo Cyclopoida.

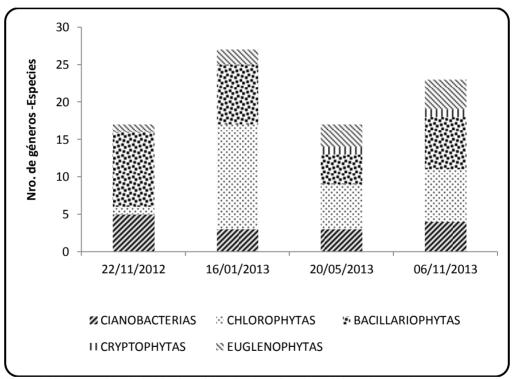


Figura 2. Comparación de la biodiversidad de algas fitoplanctónicas durante las cuatro campañas

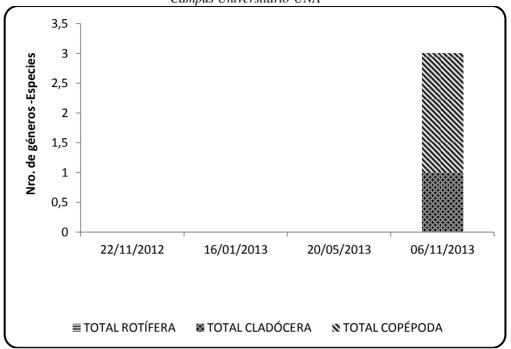


Figura 3. Comparación de la biodiversidad de zooplancton durante las cuatro campañas

La prácticamente nula presencia de zooplancton no es rara de esperar en un ecosistema que presenta una elevada concentración de contaminantes de diversos orígenes que afecta directamente a dicha población (Gagneten and Ceresoli 2004). Sin embargo, es evidente que a pesar de la ausencia de microorganismos consumidores primarios desde el primero al tercer muestreo, en el último se pudo identificar la presencia de Cladóceros, que es un grupo muy importante como bioindicador de aguas con posibilidad de recuperación o tendientes a un equilibrio (Gaete and Paredes 1996). Esta presencia pudo deberse a las últimas lluvias registradas previas al cuarto muestreo que favoreció la aparición éste grupo del zooplancton por la posible dilución de los contaminantes.

Hongos

Se registraron un total de 16 géneros de hongos durante los cuatro muestreos, observándose una mayor biodiversidad de los mismos durante el primer muestreo, y permaneciendo casi constante en relación a los géneros fúngicos identificados desde el segundo al cuarto muestreo (Cuadro 7).

La gran mayoría de los hongos identificados a nivel morfológico corresponde al grupo de los hifomicetes, de acuerdo con la clave de Hoog and Guarro (1995) y son hialinos.

Los hifomicetes en general son hongos de ambientes terrestres que posee adaptaciones para el medio acuático, siendo sus esporas y/o hifas introducidos en el ambiente acuático por el flujo de las aguas, lluvias y viento (Wurzbacher, Bärlocher, and Grossart 2010). Esto justifica la presencia constante de los géneros fúngicos filamentosos tales como Aspergillus sp., Penicillium sp., Cladosporium sp. y Paecilomyces sp., (Figura 4).

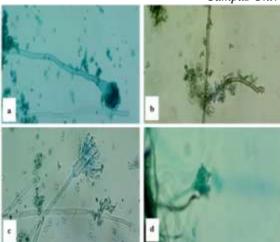


Figura 4. Características microscópicas (400x) de Aspergillus spp. (a), Cladosporium spp. (b), Penicillium spp. (c) y Paecilomyces spp. (d) (Foto: Juliana Moura)

Las levaduras *Rhodotorula spp.* y *Candida spp.* también estuvieron presentes en todos los puntos y periodos, además se observaron otras especies de levaduras que no se pudieron identificar. *Candida* spp. es una levadura cuyo hábitat normal es el intestino humano y el de otros animales de sangre caliente, lo que puede reflejar niveles de contaminación fecal, sirviendo así como bioindicadores de polución acuática (Alvarez 1993; Ceballos et al. 1995).

Algunos hongos como Aspergillus spp., Candida spp., Sporothrix schenckii pueden ser agentes causales de enfermedades en humanos, en especial en pacientes inmunocomprometidos, por lo que el agua no podría considerarse para uso primario ni secundario (Saúl and Bonifaz 2011; Sifuentes-Osornio, Corzo-León, and Ponce-de-León 2012; Silva et al. 2012).

Se esperaba aislar una mayor diversidad de hongos y esto puede ser atribuido a tres razones: (1) la técnica no es tan sensible, siendo necesario la búsqueda de otras técnicas para identificación de hongos en agua, (2) a la presencia masiva de bacterias que pueden estar inhibiendo o retardando el crecimiento fúngico, (3) y por último, la contaminación del arroyo San Lorenzo que está modificando la capacidad de crecimiento de la población fúngica normal (Echenique, Rubinstein, and Mroginski 2004).

Parásitos

Con la técnica de flotación con Sulfato de Zinc al 33% en el primero y segundo muestreo no se registraron parásitos ni huevos; mientras que con la técnica de Sedimentación por centrifugación con Formol-Éter en el P4 se identificaron huevos y larvas de *Uncinaria sp.* (Costamagna *et al.* 2005).

En el tercer muestreo con la técnica de Sedimentación se identificaron la forma parasitaria en forma de huevo de *Uncinaria sp.* en todos los puntos de muestreo; mientras que en P2 se hallaron huevos de *Ascaris lumbricoides*. En los puntos P1, P3 y P4 se registraron larvas infectantes de *Uncinaria sp.* (Pierangeli et al. 2003; Beaver 1964)

En el cuarto muestro de nuevo con la técnica de Sedimentación se identificaron en todos los puntos de muestreos al igual que en el tercer muestreo la presencia de huevos de *Uncinaria sp.*; mientras que solo en P2 se hallaron huevos de *Ascaris lumbricoides* (Canese et al. 2003).

A través de estas técnicas pudieron identificarse dos géneros de parásitos, *Ascaris lumbricoides* y *Uncinaria sp.*, bajo las formas de huevos y larvas, que coinciden con las formas infectantes (Córdoba et al. 2002) (Figura 5). Debido a que el curso de agua del Arroyo San Lorenzo desemboca finalmente en el Lago Ypacaraí, se recomienda hacer un seguimiento a lo largo del arroyo hasta la desembocadura en el mismo (Campos-Pinilla, Cárdenas-Guzmán, and Adriana Guerrero-Cañizares 2008; Giménez and Woroniecki 2011). Los métodos de concentración por sedimentación

y flotación son considerados los más adecuados para la búsqueda de formas parasitarias (Córdoba et al. 2002).

CONCLUSIONES

Se han identificado 38 géneros de algas, Bacillariophytas (14), Chlorophytas (13), Cianobacterias (6), Euglenophytas (4) y Cryptohpytas (1); 2 sub-grupos de zooplancton, 16 géneros de hongos, 2 géneros de parásitos (*Uncinaria sp. y Ascaris lumbricoides*).

La mayoría de los géneros corresponden a microorganismos bioindicadores de la mala calidad del agua.

Se ha generado una base de datos inicial de la biodiversidad de géneros y especies presentes en el arroyo San Lorenzo durante el período de un año a partir de noviembre del 2012.

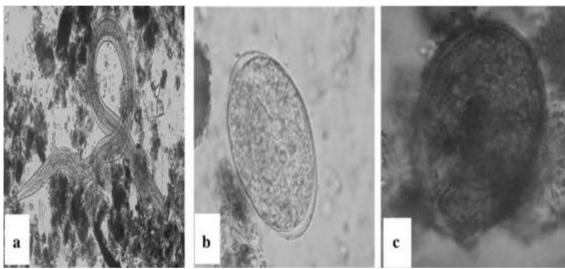


Figura 5. Características microscópicas de Parásitos (400x) identificadas en el tercer muestreo. a) Larva de *Uncinaria sp.* b) Huevo de *Uncinaria sp.* c) Huevo de *Ascaris lumbricoides* (Foto: Héctor Nakayama)

Cuadro 2. Biodiversidad de Cianobacterias en los diferentes puntos de muestreos durante las cuatro campañas. 1: presencia; 0: ausencia

TAXA	MUESTREOS-FECHAS			
CIANOBACTERIAS	22/11/2012	16/01/2013	28/05/2013	06/11/2013
Aphanocapsa delicatissima	1	0	0	0
Aphanocapsa sp.	1	0	0	0
Chroococcus sp.	1	0	0	0
Cylindrospermopsis raciborskii	0	0	1	1
Microcystis aeruginosa	0	1	1	1
Microcystis flos-aquae	1	1	1	1
Oscillatoria sp.	0	1	0	1
Pseudanabaena sp.	1	0	0	0

Cuadro 3. Biodiversidad de Chlorophytas en los diferentes puntos de muestreos durante las cuatro campañas. 1: presencia; 0: ausencia

TAXA		MUESTREO	S-FECHAS	
CHLOROPHYTAS	22/11/2012	16/01/2013	28/05/2013	06/11/2013
Actinastrum sp.	0	0	1	1
Chloratella sp.	0	1	1	0
Closterium moniliferum	1	1	0	0
Closterium sp.	0	1	0	1
Coelastrum reticulatum	0	0	0	1
Cosmarium sp.	0	1	0	0
Crucigenia rectangularis	0	0	1	0
Elakatothrix sp.	0	1	0	0
Micrasteria sp.	0	1	0	0
Monoraphidium contortum	0	1	1	1
Monoraphidium sp .	0	0	0	1
Pediastrum sp.	0	1	0	0
Scendesmus obliquus	0	1	0	1
Scendesmus quadricauda	0	1	1	1
Scenedesmus sp.	0	1	0	0
Staurastrum sp.	0	1	1	0
Staurastrum tetracerum	0	1	0	0
Tetraedon sp.	0	1	0	0

Cuadro 4. Biodiversidad de Euglenophytas en los diferentes puntos de muestreos durante las cuatro campañas. 1: presencia; 0: ausencia

TAXA		MUESTREO	S-FECHAS	
EUGLENOPHYTAS	22/11/2012	16/01/2013	28/05/2013	06/11/2013
Euglena sp.	0	1	1	1
Phacus oscillans	1	0	0	0
Phacus sp.	0	1	1	1
Strombomonas sp.	0	0	0	1
Trachelomonas sp.	0	0	1	1

Cuadro 5. Biodiversidad de Bacillariophytas en los diferentes puntos de muestreos durante las cuatro campañas. 1: presencia; 0: ausencia

TAXA	MUESTREOS-FECHAS			
BACILLARIOPHYTAS	22/11/2012	16/01/2013	28/05/2013	06/11/2013
Amphipleura pellucida	0	1	0	0
Aulacoseira granulata	1	0	1	1
Cyclotella sp.	0	1	0	1
Cymatopleura sp.	1	0	0	0
Cymbella sp.	0	1	0	0
Fragilaria capucina	1	0	0	0
Gomphonema sp.	1	0	0	0
Gyrosigma attenuatum	1	0	0	0
Navicula sp.	1	1	1	1
Pinnularia appendiculata	0	0	1	0
Pinnularia gibba	1	0	0	0
Pinnularia sp.	0	1	0	0
Stauroneis anceps	1	0	0	0
Stauroneis sp.	0	1	1	1
Surirella angustata	1	0	0	0
Surirella sp.	0	1	0	1
Synedra ulna	1	1	0	1
Tabellaria sp.	0	0	0	1

Cuadro 6. Biodiversidad de Cryptophytas en los diferentes puntos de muestreos durante las cuatro campañas. 1: presencia; 0: ausencia

TAXA		MUESTREO	S-FECHAS	
CRYPTOPHYTAS	22/11/2012	16/01/2013	28/05/2013	06/11/2013
Cryptomonas sp.	0	0	1	1

Cuadro 7. Biodiversidad de especies de hongos encontrados en los diferentes puntos de muestreos durante las cuatro campañas. 1: presencia; 0: ausencia

Hongos	MUESTREOS-FECHAS			
	22/11/2012	16/01/2013	28/05/2013	06/11/2013
Aureobasidium spp.	0	0	0	1
Aspergillus spp.	1	1	1	1
Acremonium spp.	1	0	0	0
Aspergillus flavus	0	0	0	1
Aspegillus niger	0	1	1	1
Cladosporium spp.	1	1	1	1
Penicillium spp.	1	1	1	1
Paecylomyces spp.	1	1	1	1
Curvularia spp.	1	1	0	0
Geotrichium spp.	1	0	0	0
Rhizoctonia spp.	1	1	0	0
Trichoderma spp.	1	1	0	1
Sporothrix schenckii	0	1	0	0
Trichotecium spp.	0	0	0	1
Rhodotorula spp.	1	1	1	1
Candida spp.	1	1	1	1

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Ing. Forestal César Cardozo, director general de la DGICT por todo el apoyo brindado para realizar este trabajo de investigación con fondos del Rectorado de la Universidad Nacional de Asunción.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alonso, C., L. De la Fuente, D. Del Pozo, L. Bueno, A. Garcia, M. Ramos, M. Althofer, and J. García. 2008. "Problemas de las cianobacterias en aguas de recreo y aguas de consumo." *Centro de Estudios Hidrográficos del CEDEX. España*:63-69.

Alvarez, C. I. V. . 1993. "Caracterización micológica de aguas "crudas" y filtradas en la Planta de Tratamiento de Tres Ríos, Costa Rica." *Revista de Biologia Tropical* no. 41 (3):417-422.

APHA, AWWA, and WPCF. 1998. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF). Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 20 ed. Madrid -España: Díaz de Santos S. A.

Beaver, P. 1964. "Lucha contra los helmintos transmitidos por el suelo." *Organización Mundial de la Salud.*

Begun, A. A. 2006. "The summer-autumn phytoplankton in the Golden Horn Bay (the Sea of Japan) under conditions of anthropogenic pollution." *International Journal on Algae* no. 8 (3):255-273.

Bourrelly, P. 1966. *Les Algues D'eau Douce*. Vol. 1-3. Paris-Francia: Éditions N. Boubée & Cie.

Campos-Pinilla, C., M. Cárdenas-Guzmán, and A. Adriana Guerrero-Cañizares. 2008. "Comportamiento de los indicadores de contaminación fecal en diferente tipo de aguas de la sabana de Bogotá (Colombia)." *Universitas Scientiarum* no. 13 (2):103-108.

- Canese, A., R. Dominguez, C. Otto, C. Ocampos, and E. Mendonca. 2003. "Huevos infectivos de Toxocara en arenas de plazas y parques de Asunción, Paraguay." *Arch Pediatr Urug* no. 74 (1):51-56.
- Ceballos, B.S.O., E.O. Lima, A. Konig, and M.T. Martins. 1995. "Spatial and temporal distribution of fecal coliforms, coliphages, moulds and yeast in freshwater at the semi-arido tropic Northeast region in Brazil (Paraíba State)." *Revista de Microbiologia* no. 26 (2):90-100.
- Conti, A, M. Rodríguez, and C. Angelaccio. 2005. "Ocurrencia de Cyanobacterias y sus Toxinas (Microcistinas) en Aguas del Río de la Plata: Evaluación Rápida usando el ensayo ELISA." XX Congreso Nacional del Agua y III Simposio de Recursos Hídricos del Cono Sur. 9 al 14 de Mayo 2005. Mendoza, Argentina.
- Córdoba, A., M. L. Ciarmela, B. Pezzani, M. I. Gamboa, M. Marta de Luca, M. Minvielle, and J. A. Basualdo. 2002. "Presencia de parásitos intestinales en paseos públicos urbanos en La Plata Argentina." *Parasitol Latinoam* no. 57:25-29.
- Costamagna, S., E. Visciarelli, L. D. Lucchi, and J. A. Basualdo. 2005. "Parásitos en aguas del arroyo Naposta, aguas de recreación y de consumo en la ciudad de Bahia Blanca (Provincia de Buenos Aires, Argentina)." *Parasitol Latinoam* no. 60:122 126.
- Da Silva, S. 2000. *Inventário Taxonômico das Desmídias (Zygnemaphyceae) dos Rios na Área de Abrangência da Usina Hidreléctrica de Salto Caxias*, Botânica do Setor de Ciências Biológicas, Universidad Federal do Paraná, Curitiba-Brasil.
- De Infante, A. G. 1988. *El Plancton de las Aguas Continentales*. Caracas-Venezuela:

- The General of th Organization of American States.
- De León, L. 2005. "Floraciones de Cianobacterias (Algas verde-azules) características, causas, efectos y recomendaciones." *Insituto de Biología, Facultad de Ciencias. Uruguay*.
- Echenique, V., C. Rubinstein, and L. Mroginski. 2004. "Biotecnología y mejoramiento vegetal II."
- El Moor-Loureiro, L. 1997. *Manual de Identificação de Cladóceros Límnicos do Brasil*. Brasilia-Brasil: Editora Universa UCB.
- Fabre, A., C. Carballo, E. Hernández, P. Piriz, L. Bergamino, L. Mello, S. González, G. Pérez, J. León, L. Aubriot, S. Bonilla, and C. Kruk. 2010. "El nitrógeno y la relación zona eufótica/zona de mezcla explican la presencia de cianobacterias en pequeños lagos subtropicales, artificiales de Uruguay." *Panamjas* no. 5 (1):112-125.
- Gaete, H., and K. Paredes. 1996. "Toxicidad de mezclas de contaminantes químicos sobre el cladócero *Daphnia magna*." *Rev. Int. Contam. Ambient*. no. 12 (1):23-28.
- Gagneten, A. M., and N Ceresoli. 2004. "Efectos del efluente de curtiembre sobre la abundancia y riqueza de especies del zooplancton en el arroyo las prusianas (Santa Fe, Argentina)." *Interciencia* no. 29:702-708.
- Giménez, P., and W. Woroniecki. 2011. "Dispositivo Retentor de Residuos Sólidos para El Arroyo San Lorenzo." *UNA*.
- Henry, R. 1990. "Amônia ou fosfato como agente estimulador do crescimiento do fitoplâncton na represa de Jurumirim (Rio Paranapanema, SP)." *Rev. Brasil. Biol.* no. 50 (4):883-892.
- Hoog, G.S., and J. Guarro. 1995. *Atlas of Clinical Fungi*. España: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands, Universitat Rovira i Virgilli.

- Steviana, Vol. 6. 2014. Benítez et al. Caracterización biológica del Arroyo San Lorenzo en el tramo del Campus Universitario-UNA
- Komárek, J., and B. Fott. 1983. *Das Phytoplankton des SüBwassers*. Alemania: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchandlung.
- Philipose, M. T. 1967. *Chlorococcales*. New Delhi-India: Indian Council of Agricultural Research.
- Pierangeli, N. , A. L. Giayetto, A. M. Manacorda, Barbieri L. M., Soriano S.V., A. Veronesi, Pezzani B.C., Minvielle M. C., and Basualdo J. A. 2003. "
 Estacionalidad de parásitos intestinales en suelos periurbanos de la ciudad de Neuquén, Patagonia, Argentina." *Tropical Medicine* no. 8 (3):259-263.
- Pizzolon, L. 1996. "Importancia de las cianobacterias como factor de toxicidad en las aguas continentales." *Interciencia* no. 21 (6):239-245.
- Romo, S. G. 1989. "Estudio del fitoplancton de un lago somero y oligotrófico: Loch Rusky (Escocia)." *Anales Jard. Bot. Madrid* no. 46 (1):127-138.
- Sánchez, María Luisa Peleato. 2011. Las cianobacterias: cooperación versus competencia, Real Academia de Ciencias Exactas, Fisicas, Quimicas y Naturales de Zaragoza, Universidad de Zaragoza, Zaragoza-España.
- Santos, Diaz de. 1992. Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Madrid España: Diaz de Santos, S. A.

- Sato, A. 1997. Atlas Didáctico de Identificação do Zooplâncton de Sete Reservatórios Paranaenses. Curitiba-Brasil: Instituto Ambiental do Paraná.
- Saúl, A., and A. Bonifaz. 2011. "Clasificación de la esporotricosis. Una propuesta con base en el comportamiento inmunológico." *Dermatología Revista Mexicana* no. 55:200-208.
- Sifuentes-Osornio, J., D. E. Corzo-León, and L. A. Ponce-de-León. 2012. "Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America." *Current fungal infection reports* no. 6 (1):23-34.
- Silva, S., M. Negri, M. Henriques, R. Oliveira, D. W. Williams, and J. Azeredo. "Candida 2012. glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance." **FEMS** Microbiology Reviews no. 36:288-305. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x.
- Streble, H., and D Krauter. 1987. *Atlas de los Microorganismos de Agua Dulce*. Barcelona-España: Ediciones Omega S.A.
- Vila, I., and R. Pardo. 2003. "Respuesta de la estructura fitoplanctónica a las perturbaciones antrópicas de un lago templado." *Limnetica* no. 22:93-102.
- Wurzbacher, C.M., F. Bärlocher, and H.P. Grossart. 2010. "Fungi in lake ecosystems." *Aquatic Microbial Ecology* no. 59 (125-149).

Caracterización físico-química del aceite esencial de *Origanum syria*cum L. extraído a macro escala en distintos tiempos utilizando el método de destilación por arrastre de vapor

Miguel Martínez¹, Claudia Mancuello¹, Claudia Pereira¹, Fidelina González¹, Bonifacia Benítez¹, Francisco Ferreira², César Sena³

E mail del autor: miguelangelquimi@hotmail.com

Extracción y caracterización físico-química del aceite esencial de *Origanum syriacum* L. extraído en diferentes tiempos. Se estudió la composición química del aceite esencial de *Origanum syriacum* L. —nueva variedad introducida en Paraguay— extraído a las 2, 4 y 6 horas del proceso respectivamente, por el método de destilación por arrastre de vapor de agua, a partir de hojas previamente desecadas. Se llevaron a cabo la identificación botánica y el análisis morfoanatómico de la especie vegetal en estudio con el propósito de comprobar su autenticidad, paso fundamental para el inicio de la investigación. La caracterización química del aceite esencial se realizó por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS); la cual reveló que el aceite está constituido mayoritariamente por carvacrol en porcentajes de 19,2; 11,9 y 19,5% correspondientes a las 2, 4 y 6 horas de extracción, además de la variedad de otros compuestos en menor proporción, apareciendo algunos particulares en los diferentes periodos de extracción. Se determinaron además la densidad, el índice de refracción, el pH, la solubilidad y el espectro UV como parámetros adicionales de caracterización. El rendimiento del aceite esencial fue del 1,71% al final del proceso de extracción, expresado en base seca.

Palabras Claves: Origanum syriacum, Aceite esencial, Carvacrol, destilación por arrastre de vapor de agua

Extraction and physicochemical characterization of *Origanum syriacum* L. essential oil extracted at different times through steam distillation. This research studied the chemical composition of the essential oil of *Origanum syriacum* L. —a new variety introduced in Paraguay— extracted at 2, 4 and 6 hours of processing respectively, by the method of steam distillation from dried leaves. Botanical identification and morpho-anatomical analysis of the plant species under study were conducted in order to check its authenticity, an essential step in the initiation of the investigation. Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) revealed that the essential oil is mainly constituted by carvacrol in percentages of 19.2, 11.9 and 19.5% corresponding to the 2, 4 and 6 hours of extraction respectively; as well as a variety of other compounds in lower amounts, a few particular ones appearing in the different extraction periods. The density, refractive index, pH, solubility, and UV spectra were also determined as additional characterization parameters. The essential oil yield was 1.71% on a dry base.

Keywords: Origanum syriacum, esential oil, carvacrol, steam destilation

INTRODUCCIÓN

Los principales tipos de orégano de importancia económica en el mundo son: el

¹ Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales – Departamento de Biología – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad Nacional de Asunción.

² Laboratorio de Análisis Instrumental – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad Nacional de Asunción.

³Agroindustria Kokué Poty S.A

orégano turco (*Origanum onites* L.); griego (*Origanum vulgare ssp.*); español (*Coridohymus capitatus* L.) y el orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Shauer) (Aranda 2009). El orégano es una hierba introducida en Paraguay. Fue encontrada en forma silvestre en el desierto de Sinai y Egipto (Chishti, Kaloo and Sultan, 2013). El *Origanum syriacum* L. es una variedad introducida en Paraguay desde la ciudad de Tarija de la Replública Pluricultural de Bolivia. La Agroindustria Kokué Poty S.A. es la segunda en cultivarla en nuestro país y la que posee mayor extensión de cultivo abarcando actualmente casi 4 hectáreas (Figura 1).



Figura 1: Cultivo de *Origanum syriacum* L. en Colonia Independencia Departamento de Guairá-Paraguay

El orégano como el *Origanum vulgare fue* utilizado desde tiempos arcaicos por sus propiedades tónicas y amargas (USAID 2008; Fundación Integra 2014). En la "Fitoterapia" Vademécum de prescripción (1992), se indica su acción farmacológica a nivel interno como tónico general, digestivo, espasmolítico, carminativo, expectorante, antiséptico de las vías respiratorias y emenago-

go; a nivel externo actúa como analgésico, cicatrizante y antiséptico (USAID 2008).

Uno de los usos más comunes del orégano (*Origanum vulgare*) es como condimento
en el preparado de platos típicos de cada
país, sin embargo, en los últimos años se han
dado nuevas aplicaciones en diferentes
ámbitos, como antimicrobiano y antioxidante en los alimentos (Zheng 2001). Esto se
debe a que de sus hojas se extrae aceite
esencial, cuyos componentes químicos principales son carvacrol y timol (Figura 2), que
confieren al orégano sus características antisépticas, tónicas, diuréticas, entre otras (Alvarez 1999).

Timol carvacrol

Figura 2: Estructura química del timol y del carvacrol (IK=1296)

En la actualidad, el aceite esencial de orégano (Origanum syriacum L.) es producido en Paraguay por la Agroindustria Kokué Poty S.A, siendo la mencionada empresa la primera en producirla dentro del territorio nacional. La Agroindustria Kokué Poty S.A ha realizado una alianza estratégica con la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción para realizar todos los ensayos correspondientes al control de calidad y toxicidad de aceites esenciales extraídos de especies vegetales aromáticas, principalmente orégano de la especie Origanum syriacum L., ya que hay buenas perspectivas de exportarlo al mercado de la República de China como materia prima para preparados farmacéuti-

cos (cápsulas blandas). Ya que el aceite esencial posee actividad antifúngica, antibacteriana, es buen antihistamínico y muy eficaz contra problemas digestivos y respiratorios, apuntando además a otros mercados internacionales, ya que éstos lo cotizan en altos precios (Unión Europea-Perú 2004).

La Agroindustria Kokué Poty, por medio del cultivo de *Origanum syriacum* L. genera fuente de trabajo para cierto número de habitantes (250 personas equivalente a 50 familias aproximadamente.) de Colonia Independencia del Departamento del Guairá y comercializa el producto final en el mercado local, compitiendo fuertemente con otros productores que producen otra variedade de orégano como el *Origanum vulgare* (USAID 2008).

El orégano es una especia con importante demanda a nivel mundial y del MERCO-SUR a nivel regional (USAID 2008). Los volúmenes producidos en los países productores, no llegan a cubrir la demanda de importadores mayoristas, industria agroalimentaria y consumidor detallista (USAID 2008). En tal sentido, existe una oportunidad de mercado para un producto no tradicional. Los precios de los alimentos están en constante crecimiento y el del orégano en especial va completando una curva de crecimiento sostenida, lo que redondea la oportunidad de mercado existente (USAID 2008).

En Paraguay no se han reportado datos recientes de la producción por hectárea del orégano para demostrar la sustentabilidad de este recurso, ni mucho menos la capacidad productora de aceites esenciales, lo que le daría un potencial valor agregado. Por todo lo mencionado con anterioridad se planteó el presente trabajo con el objetivo de caracterizar el aceite esencial *Origanum vulgare var. Maru* de la compañía Mayor Cué del distrito

Colonia Independencia del Departamento del Guairá a 200 km. de la capital de República del Paraguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales área Química Orgánica de los Productos Naturales del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción

Material de estudio

Equipos

Espectrofotómetro UV-Vis modelo SHIMADZU serie 160 A. Cromatógrafo gaseoso acoplado a espectrometría de masas de la marca SHIMADZU modelo 2010. Microscopio óptico marca OLYMPUS serie BH2. Cámara digital MOTICAM 352. Refractómetro BAUSCH y LOMB, pHmetro METROHM serie 69, Equipo de destilación por arrastre de vapor marca CHIYUNG modelo ST2-2X3

Reactivos químicos

Acetona grado Cromatografía Gaseosa (GC) y hexano grado pro-análisis, ambos de la línea Merck.

Colecta del espécimen vegetal en estudio La especie vegetal estudiada fue colectada en la compañía Mayor Cue del Distrito Colonia Independencia del Departamento del Guairá con coordenadas geográficas latitud 25°51'0,59"S y longitud 56°9'36,39"O, durante la estación de verano, en fecha 07 de marzo del año 2014.

Preparación de especímenes "voucher" como material de herbario

El secado, envenenado y montaje del ejemplar fue realizado según metodología convencional para tratamiento de especímenes. El espécimen testigo (MM, 8) fue depositado en el Herbario FACEN, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción.

Identificación taxonómica y descripción del espécimen vegetal

La identificación del material vegetal, realizado por un botánico (Bonifacia Benítez de Bertoni), es un paso indispensable antes del estudio fitoquímico, farmacológico y/o toxicológico, para garantizar la autenticidad de la especie utilizada en la investigación (Hostettmann K. et. al. 2008).

Para la determinación taxonómica y la resolución de la problemática nomenclatural se utilizaron la Base de Datos del Missouri Botanical Garden, Tropicos (2014) y The Plant List (2013)

El material testigo de la especie vegetal en estudio quedó depositado como muestra (MMN°:08) permanente en el Herbario FA-CEN del Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción.

Caracterización morfológica de la especie vegetal

La morfo-anatomía vegetal constituye un campo de estudio de gran importancia para el reconocimiento preciso de las especies vegetales, desde el punto de vista del proceso de desarrollo de tejidos y órganos. La caracterización botánica es el primer paso para la verificación de la autenticidad del espécimen vegetal con el que se trabaja, en este sentido es muy importante disponer de patrones micrográficos como referencia (World Health Organization 1998), en todo trabajo relacionado a productos naturales de origen vegetal. Con referencia a lo mencionado por la OMS, es relevante la caracterización morfológica de la especie *Origanum syriacum* L., para lo cual se siguió la metodología convencional de caracterización morfológica, con observación directa y al microscopio estereoscópico (Argüeso 1986).

Caracterización anatómica foliar y caulinar

El material fue hidratado con agua destilada por 4 horas. Se realizaron cortes transversales a mano alzada de hojas, se diafanizaron con disolución de hipoclorito de sodio al 2,5% y posteriormente se aplicó tinción directa con disolución de safranina al 1%. Las láminas fueron montadas con la técnica gelatina-glicerina (Argüesso op. cit.) y depositadas en el Herbario FACEN (CP, 12). Las microfotografías fueron tomadas con cámara digital MOTICAM 352 incorporada al microscopio óptico y editadas con el software Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group, 2006).

Preparación del material vegetal para la extracción del aceite esencial

El material vegetal utilizado en este trabajo fue secado a temperatura ambiente, con escasa aireación y bajo sombra, para evitar la acción del oxígeno, la luz, la temperatura y microorganismos; factores que podrían transformar los compuestos originales en

artefactos (Hostettmann et al. 2008). Las hojas secas fueron utilizadas en el proceso de extracción del aceite esencial

Extracción y características físicas del aceite esencial

Hojas del material vegetal previamente desecadas (35 kg), fueron sometidas a destilación por arrastre de vapor de agua durante un periodo de seis horas, muestreando el aceite obtenido con frecuencia de dos horas (M_1 = 2 horas.; M_2 = 4 horas y M_3 = 6 (horas). El residuo acuoso del aceite se eliminó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y el producto final se almacenó en recipientes de color ámbar para protegerlo de la luz, además, fue refrigerado a 4°C hasta el momento del ensayo analítico.

Al aceite esencial se le determinó los siguientes parámetros físicos: color, olor, densidad, índice de refracción, solubilidad en éter de petróleo, diclorometano, hexano, acetato de etilo, etanol, metanol, agua y tween (Murillo, 2004). Adicionalmente se calculó el rendimiento y el espectro ultravioleta (UV), utilizando hexano como disolvente.

Análisis de la composición química del aceite esencial por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

El aceite esencial de *Origanum syriacum* L. (50 μ L) se disolvió en 1mL de acetona grado GC, de esta solución resultante (extracto final), se inyectó un volumen de (1 μ L) en el cromatógrafo de gases acoplado a masas.

Parámetros analíticos del GC-MS: Temperatura del horno (190°C), Rampa de temperatura (80°C por 2 min.; de 80 a 160°C a

8°C.min⁻¹. y a 160 °C por 4 min.; Rastreo m/z de 50 a 280 uma; Inyector: 200°C; Detector: 240°C; Interface: 220°C; Volumen de inyección: 1μL; Tiempo muerto: 3 min.; Modo de inyección: splitless; Columna: SPB-5 y flujo en columna 0,56 mL.min⁻¹.

Los compuestos fueron identificados por comparación de los espectros de masas de cada componente resultante en la GC-MS, con los estándares de las bases de datos NIST 2012.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación y descripción taxonómica de del especimen vegetal Origamun syriacum L.

Herbácea, perenne. Tallo erecto, ramificado, con densa pubescencia. Hojas simples, opuestas, densamente pubescentes tanto en el haz como en el envés, con 4 a 5 nervaduras que parten desde la base de la hoja, con peciolos cortos, de formas elípticas a oblongas, 1,5 x 0,8 cm. Inflorescencia en verticilastro, terminal, con brácteas y bractéolas. Flores hermafroditas, cigomorfas. Perianto pentámero, cáliz formado por sépalos soldados, pubescente en el dorso, corola con 5 pétalos soldados, bilabiada, blanca y muy aromática. Androceo didínamo, con estambres pegados al tubo de la corola. Fruto núcula (Figura 3).

Caracterización anatómica de Origanum cyriacum L.

Caracterización anatómica foliar

La epidermis es uniestratificada, con estomas anomociticos en la epidermis abaxial, caracterizando a la hoja como hipostomática. La nervadura central es más prominente

hacia el envés, el haz vascular es colateral (Figura 4A).

El mesófilo (Figura 4B) es bifacial con simetría dorsiventral, constituido por dos tipos de parénquima, en empalizada y esponjoso. El primero está localizado hacia la cara adaxial, compuesta de una a dos capas de células alargadas. El parénquima esponjoso se localiza hacia la cara abaxial, compuesta por tres a cuatro capas de células con formas irregulares y grandes espacios intercelulares.

Están presentes en ambas caras de las hojas dos tipos de tricomas, eglandulares y glandulares. Los tricomas glandulares son uniseriados con pie corto y cabeza secretora unicelular oval (Figura 4C). Los tricomas eglandulares son uniseriados, erectos, largos, pluricelulares, papilosos (Figura 4D). Estos tipos de pelos fueron observados también en *Origanum vulgare* L. (Corrêa et. al. 2009) y coinciden con lo mencionado por Metcalfe & Chalk (1988).

Caracterización anatómica caulinar

El tallo en sección transversal es subcuadrangular, con ángulos redondeados y lados convexos (Figura 5A). La epidermis es uniestratificada, con dos tipos de tricomas, eglandulares y glandulares. Los tricomas eglandulares, uniseriados, erectos, largos, pluricelulares, papilosos (Figura 5D); y tricomas glandulares con pie corto, uniseriado y cabeza oval.

Por debajo de la epidermis, se encuentra la corteza, constituida por bandas continuas de colénquima, seguido de parénquima. En la parte central del tallo, rodeado por los haces vasculares se encuentra la médula compuesta por células parenquimáticas (Figuras 5B).



Figura 3: Planta de *Origanum syriacum* L.

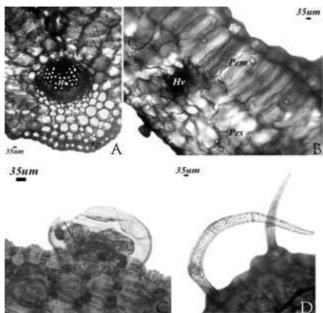


Figura 4: A. Nervadura Central. B. Mesofilo. C. Tricoma glandular. D. Tricoma eglandular de *Origanum Syriacum* L. Referencias: Ep. epidermis, Hv. haz vascular, P. parenquima, Pem. parenquima en empalizada, Pes. parenquima esponjoso.

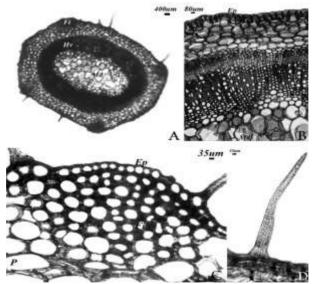


Figura 5: A, B y C. Vista del tallo en sección transversal.. D. Tricoma eglandular. Referencias: Ep. epidermis, Hv. haz vascular, Fi. fibras esclerenquimáticas, P. parénquima.

Características físicas del aceite esencial del Origanum syriacum L.

Las propiedades físicas de los aceites esenciales están relacionadas con la diversidad de sus constituyentes, convirtiéndose en un instrumento rápido de identificación y evaluación del grado de pureza o del origen del producto, puesto que se trata de su huella digital (Murillo 2004).

Los valores obtenidos experimentalmente para los parámetros físicos: Color, olor, densidad, índice de refracción y pH se resumen en las Tablas 1, 2 y 3 correspondientes a la esencia extraida a las 2, 4 y 6 horas respectivamente:

Color. Aunque la gran mayoría de los aceites esenciales de origen vegetal son incoloros, algunos presentan coloraciones modificables por el oxígeno del aire y la luz (Murillo E., 2004); lo que se observó en el caso del aceite esencial de Origanum syriacum L., cuyo color amarillo pálido se modificó gradualmente por los mencionados factores, lo que a su vez insinúa la presencia de compuestos alifáticos cíclicos con pocas insaturaciones como por ejemplo el transhidrato de sabineno (5); cis-hidrato de sabineno (11); Oxido Ledeno-(II) (13) o el (-)-Terpinen-4-ol (6) o bien compuestos aromáticos monoanulares como el 2-Isopropil-1metoxi-4-metilbenceno (7) o el carvacrol(IK=1296) (8) (Murillo 2004).

Densidad. Las densidades de los aceites esenciales generalmente oscilan entre 0,8 y 1,2 g.mL⁻¹ (Calderón 1963). Los valores experimentales de 0,874; 0,888 y 0,877 g.mL⁻¹ correspondientes al aceite muestreado a las 2, 4 y 6 horas de estracción respectivamente, indicarían un elevado contenido de compuestos de baja masa molecular o de constituyentes tipo fenólicos como ejem-

plos: carvacrol (8); 2-Isopropil-1-metoxi-4-metilbenceno (7) y el beta-Cimeno (3), capaces de asociarse a través de puentes de hidrógeno, que aumentarían la masa en un volumen pequeño (Murillo 2004).

Índice de refracción. La gran mayoría de las esencias que provienen de especímenes vegetales, poseen valores de índices de refracción comprendidos entre 1,40 y 1,61 a 20 °C (Calderón 1963). Los valores obtenidos experimentalmente para la esencia en estudio se encuentran dentro de los rangos normales (Murillo 2004).

pH. Los valores de pH obtenidos informaron que la esencia presenta carácter ácido y dan indicios de la presencia de compuestos del tipo fenol (carvacrol (8), lo que concuerda con lo planteado en la densidad.

Tabla 1. Aceite esencial extraido a las 2 horas

Características	Valoración
Olor	característico
Color	amarillo pálido
pН	3,54
Densidad	0.874 g.mL^{-1}
Índice de refracción	1,4750 a 26 ℃
Rendimiento	0,583%

Tabla 2. Aceite esencial extraido a las 4 horas

Características	Valoración
Olor	característico,
Color	amarillo pálido
pН	3,78
Densidad	0.888 g.mL^{-1}
Índice de refracción	1,4835 a 26 ℃
Rendimiento	0,720%

Tabla 3. Aceite esencial extraido a las 6 horas

Características	Valoración
Olor	característico,
Color	amarillo pálido
pH	3,87
Densidad	0.877 g.mL^{-1}
Índice de refracción	1,4755 a 26 ℃
Rendimiento	1,71 %

Solubilidad. Los resultados se expresan en las Tablas 1, 2 y 3 que corresponden a la esencia extraida a las 2, 4 y 6 horas del proceso respectivamente. Como es de esperarse, el aceite resulta soluble en solventes de naturaleza orgánica e insoluble en agua; sin embargo, el agua adquiere el olor y sabor de la esencia al mezclarse con ésta, lo que se explica por la presencia de ciertos compuestos dentro de la esencia capaces de formar puentes de hidrógeno con el agua o bien moléculas lo suficientemente pequeñas para solubilizarse en el agua.

Tabla 4. Aceite esencial extraido a las 2 horas

Solvente	Solubilidad
Éter de petroleo	S
Cloroformo	S
Diclorometano	S
Acetato de etilo	S
Etanol	S
Metanol	S
Agua	IS
Tween	S

Tabla 5. Aceite esencial extraido a las 4 horas

Solvente	Solubilidad		
Éter de petroleo	S		
Cloroformo	S		
Diclorometano	S		
Acetato de etilo	S		
Etanol	S		
Metanol	IS		
Agua	S		
Tween	S		

Tabla 6. Aceite esencial extraido a las 6 horas

Solvente	Solubilidad
Éter de petroleo	S
Cloroformo	S
Diclorometano	S
Acetato de etilo	S
Etanol	S
Metanol	IS
Agua	S
Tween	S

Referencias: S: soluble: IS: insoluble.

Rendimiento: A partir de 35 kg de *Origanum syriacum* L. seco, se obtuvieron volúmenes de 186, 248 y 186 mL de aceite esencial correspondientes a las 2 (t₁), 4(t₂) y 6(t₃) horas de extracción (Figura 6). Para t₁ el rendimiento fue del 0,531% (31,1% de proceso global), para t₂ el 0,708% (41,4% del proceso global) y para t₃ el 0,474% (27,7% del proceso global).

La sumatoria de los mencionados valores de porcentaje generó el 1,71% de rendimiento correspondiente al proceso global, que correspondería a un volumen de 600 mL de acite esencial obtenido al término del proceso de destilación. Como puede persibirse el mayor porcentaje de aceite esencial se obtuvo a las 4 horas de extracción (Figura 7), lo que significa que al cumplirse ese tiempo, ya se obtuvo el 72,5% de la totalidad de la esencia contenida en 35 kg del espécimen vegetal en estudio.

Características espectroscópicas UV

El espectro UV del aceite esencial extraido a las 2 horas del proceso de extracción y disuelto en etanol absoluto mostró bandas a 273 nm, (A: 0,465) y 209 nm (A: 1,732), la esencia extraida a las 4 horas presentó bandas a 274 nm (A: 0,891) y 218 nm (A:

2,343) y la esencia muestreada a las 6 horas motró bandas a 273 nm (A: 0,710) y 215 nm (A: 2,112). Las bandas de absorción de 215 y 218 nm indican la presencia de compuestos insaturados como por ejemplo el germacreno D (10); gamma-Terpineno o el beta-

bisaboleno (12) y las de 273 y 274 nm la presencia de compuestos aromáticos como por ejemplos: carvacrol (IK=1296) (8); 2-Isopropil-1-metoxi-4-metilbenceno (7) y el beta-Cimeno (3) (Fuertes C., 2001)

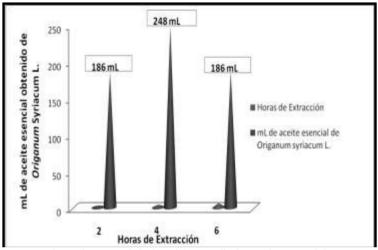


Figura 6: mililitros (mL) de aceite esencial obtenidos en distintos tiempos del proceso de extracción

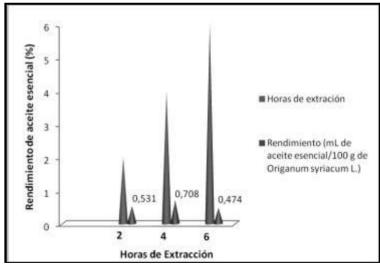


Figura 7: mLde aceite esencial obtenido por cada 100 gramos de *Origanum syriacum* L. seco en distintos tiempos del proceso de extracción

Caracterización química del aceite esencial del Origanum syriacum L.

En las tablas 7(A y B), 8 (A, B y C) y 9 (A, B y C) se muestran los componentes químicos del aceite esencial de *Origanum syriacum* L. que corresponden a las 2, 4 y 6 horas del proceso de extracción respectivamente, así como los porcentajes correspondientes a cada compuesto.

El ensayo analítico realizado por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) reveló que el componente mayoritario de la esencia es el compuesto fenólico 2-hidroxi-p-cimeno [carvacrol (8)] en los tres tiempos del proceso de extracción (t_1 : 19,2%; t_2 : 11,9% y t_3 : 19,5%), con un promedio del 16,9%. La ausencia de timol (Figura 2) testada a través del método analítico GC-MS, indica que la especie vegetal Origanum syriacum L. es del quimiotipo eminentemente carvacrol, como lo menciona USAID 2008, La predominancia de carvacrol y la ausencia de timol en la especie vegetal mencionada, se podría explicar en el hecho de que cada compuesto precisa de enzimas específicas que dirigen su biosíntesis (D'Antuono et al., 2000; Deighton et al., 1993), lo que permite decir, que en este caso la especie vegetal Origanum syriacum L., carece de las enzimas involucradas en la biosíntesis del timol. El carvacrol (IK=1296) (8) es un fenol isomérico del timol (Figura 2) Otros componentes mayoritarios después del carvacrol (IK=1296) (8) son: (-)-2terpinen-4-ol **(6)** (monoterpeno); isopropil-1-metoxi-4-metilbenceno **(7)**; gamma terpineno (4) (monoterpeno); cariofileno (9) (sesquiterpeno) y (+)-sabineno (1) (monoterpeno bicíclico), cuyos porcentajes promedios obtenidos de los tres tiempos son 13,6; 10,9; 9,78; 8,93; y 6,97% respectivamente. La sumatoria de los porcentajes de los componentes mayoritarios recién mencionados contribuye al 67,1% de la composición total de la esencia correspondiendo un 32,9% a los restantes compuestos presentes en menor proporción. En el t2 el aceite esencial contiene el 80% de los mismos componentes que el aceite esencial del t₁, haciendo salvedad de que en el t_{2 v} t₃ no volvieron a aparecer el óxido de ledeno (II) (13) y (+)-2careno (18), lo que significa que éstos compuestos poseen mayor volatilidad que los demás componentes y que su separación completa del espécimen vegetal podría ser sufieciente en dos horas de extracción, sin embargo en t2 aparecieron nuevos componentes como el epóxido isoaromadendreno, (+)-4-careno (23), 3-careno (24) y el alfabisaboleno (21), que no aparecieron en el t_1 . En cuanto al contenido químico del aceite esencial del t₃ se puede mencionar que el 68,2% de los compuestos coinciden con el contenido químico de la esencia del t2. El alfa-bisaboleno (21) y el 3-careno (24) se encontaron ausentes en la esencia del t3, sin embargo en el contenido químico de ésta última aparecieron nuevos compuestos como el elixeno, (-)-alfa-terpineol (26), tras-retinal (28) y copaeno (29), lo que significa que éstos últimos compuestos necesitarían probablemente de 6 horas para separarlos completamente del espécimen vegetal en estudio.

CONCLUSIONES

La morfología y anatomía corresponden a la especie vegetal *Origanum syriacum* L. El aceite esencial obtenido a partir de la mencionada especie, utilizando el método de destilación por arrastre de vapor de agua presentó rendimientos del 0,531, 0,708 y

0,474% correspondientes a las 2, 4 y 6 horas del proceso de extracción, porcentajes que sumados generó un porcentaje del 1.71% correspondiente al proceso de extracción global. Los valores obtenidos de parámetros físicos indican que el aceite esencial presenta elevada pureza y el contenido químico determinado por el método GC-MS reveló que la esencia pertenece al quimiotipocarvacrol (IK=1296) (\overline{x} =16.9%.), seguido de otros compuestos como el (-)-terpinen-4-ol $(\overline{x}=13,6\%.)$;2-isopropil-1-metoxi-4 benceno (\overline{x} = 10,9%.); gamma terpineno (\overline{x} = 9.78%.): cariofileno (\overline{x} =8.93%) v (+)sabineno (\bar{x} = 6,97%), máximos al UV de 209, 215, 218 y 274 nm que indican la presencia de compuestos insaturados (53,4%) y aromáticos (37,8%). Se estableció un lazo importante de colaboración entre el sector público y el privado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍCAS

- Alvarez C. A. 1999. Determinación y cuantificación de la capacidad antimicrobiana y antioxidante de las fracciones polares del orégano (*Origanum vulgare L.*). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Aranda J. et. al. 2009. Caracterización del aceite esencial de orégano liso (*Poliomintha longiflora* Gray) de la localidad Infiernillo en el municipio de Higueras, N.L., Mexico. Revista Salud Pública y Nutrición, Volumen 10, número 8.
- Arcila-Lozano C., Loarca-Piña, G., Lecona-Uribe, S., y González de Mejía, E. 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111.

- Argüeso A., D'A. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur.
- Bendahou, M.; Muselli, A.; Grignon-Dubois, M.; Benyoucef, M.; Desjobert, J.-M.; Bernardini, A.-F.; Costa, J., Antimicrobial activity and chemical composition of Origanum glandulosum Desf. Essential
- Calderón, E. 1963. Guía para análisis de plantas y notas prácticas sobre fitoquímica. Universidad Nacional: Bogotá.
- Chishti S., Kaloo, Z., and Sultan, P. 2013.

 Medicinal importance of Genus

 Origanum A review. International

 Journal of Advanced Research, Volume
 1, Issue 8, 75-84. En: Journal homepage:

 http://www.journalijar.com. 1.07.2014
 8:40.
- Corrêa R., Pereira J., Soares E., De Oliveira C., De Castro E., Da Silva R. 2009. Características anatômicas foliares de plantas de orégano (*Origanum vulgare* L.) submetidas a diferentes fontes e níveis de adubação orgânica. *Maringa*, v. 31 (3), 439 444 pp.
- D'Antuono L., Galletti G. y Bocchini, P. 2000. Variability of Essential Oil Content and Composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a North Mediterranean Area (Liguria Region, Northern Italy), Annalsof Botany, 86(3), 471-478.
- Deighton N. et. al. 1993. Identification by EPR spectroscopy of Carvacrol and Thymol as the major sources of free radicals in the oxidation of plant essential oils, J. Sci. Food Agric., 63(2), 221-225.
- Fuertes C. et. al. 2001. Estudio comparativo del aceite esencial de Minthostachys mollis (Kunth) Griseb "Muña" de tres regiones peruanas por cromatografía de gases

- Steviana, Vol. 6. 2014. Martínez et al. Caracterización físico-química del aceite esencial de Origanum syriacum L. extraído a macro escala en distintos tiempos utilizando el método de destilación por arrastre de vapor
 - y espectrometría de masas. Ciencia e Investigación, Volumen IV (I)
- Fundación Integra. 2014. «Orégano: Características». *Región de Murcia Digital*. Accedido octubre 10.
 - http://www.regmurcia.com/servlet/s.S 1?sit=a,0,c,382,m,1678&r=ReP-22473-

DETALLE_REPORTAJESPADRE.

Fundación Integra. 2014. «Orégano: Presentación». *Región de Murcia Digital*. Accedido octubre 10. http://www.regmurcia.com/servlet/s.S 1?sit=a,0,c,382,m,1678&r=ReP-22473-

DETALLE_REPORTAJESPADRE.

- Hostettmann, K. 2008. Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos. Bogotá-Colombia: Convenio Andrés Bello.
- Leffingwell, J., Alford, E., Leffinwell, D., et al. 2013. Identification of the Volatile Constituents of Cyprian Latakia Tobacco by Dynamic and Static Headspace Analyses.
- Metcalfe, C. and Chalk, L. 1988. Anatomy of the dicotyledons. 2 ed. Oxford: Clarendon.
- Motic China Group. 2006. Motic Images Plus versión 2.0. Software de computadora para microscopia digital.

- Murillo E. et. al. 2004. Caracterización Físico-Química del aceite esencial de albahaca. II. Revista Colombiana de Química, Volumen 23, Número 2. Pag. 139-148.
- Proyecto de Cooperación UE-Perú en materia de Asistencia Técnica relativa al comercio. 2004. Estudio de Factibilidade la Producción de Orégano orgánico y sus derivados en Tacna. Perú.
- The Plant List. 2013. Version 1.1. Published on the Internet; http://www.theplantlist.org/(accessed 1st January).
- Tropicos (2014). En: www.mobot.org/Name/100234908
- USAID y Paraguay Vende. 2008. Asistencia Técnica en el Agronegocio del Orégano. Task Order N. 346. Dirigida a Empresas del Sector Privado Paraguayo asistidas por el Programa Paraguay Vende, Contract No. EEM I 346 07 00008 00. Asunción: United States Agency for International Development.
- World Health Organization. 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva-Suiza.
- Zheng W. and Shiow Y. W. 2001. Antioxidant Activity and Penolic Compounds in Selected Herbs. J. Agric. Food Chem. 49, 5165-5170.

Tabla 7A. Composición química del aceite esencial de Origanum syriacum L. muestreado a las 2 horas del proceso de extracción

Nombre del com- puesto químico	Estructura quí- mica	Cantidad relativa (%)	Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa (%)
(+)-Sabineno (1)	\$	6,78	(-)-Terpinen-4-ol (6)	*	10,3
alfa-Terpineno (2)		5,61	2-Isopropil-1-metoxi-4-metilbenceno (7)		16,0
beta-Cimeno (3)		2,58	Carvacrol (Isotimol) (8)	но	19,2
gamma-Terpineno (4)		13,9	Cariofileno (9)	4	8,23
Biciclo [3.1.0] hexan- 2-ol, 2-metil-5-(1- metiletil)-, (1.alfa., 2. beta., 5. alfa.) (trans- hidrato de Sabine- no)(5)	HO	6,16	Germacreno D (10)		2,0

Tabla 7B. Composición química del aceite esencial de Origanum syriacum L. muestreado a las 2 horas del proceso de extracción

Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa	Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa
		(%)			(%)
Biciclo [3.1.0] hexan-2- ol, 2-metil-5-(1- metiletil)-, (1.alfa., 2. alfa., 5. alfa.) (cis- hidrato de sabineno (11)	→ COH	2,32	Terpineno 4-acetato (16)		0,71
Beta-Bisaboleno (12)		2,71	(-)-Spatulenol (17)	OH OH	0,21
Oxido Ledeno-(II) (13)		0,14	(+)-2-Careno (18)	X	0,08
Z,Z,Z-1,5,9,9-tetrametil- 1,4,7-Cicloundecatrieno (14)		0,29	Germacreno B (19)		2,46
[1aR- (1a. alfa., 4a. beta., 7. alfa., 7a. beta., 7b. alfa.)-4-metileno-1,1,7-trimetil-decahidro-1H-Cicloprop[e]azuleno (15)	4	0,12	Delta-Cadineno (20)		0,19

Tabla 8A. Composición química del aceite esencial de Origanum syriacum L. muestreado a las 4 horas del proceso de extracción

Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa (%)	Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa (%)
(+)-Sabineno (1)	\rightarrow	6,67	Biciclo [3.1.0] hexan-2- ol, 2-metil-5-(1- metiletil)-, (1.alfa., 2. alfa., 5. alfa.) (cis-hidrato de sabineno (11)		15,5
alfa-Terpineno (2)		5,25	(-)-Terpinen-4-ol (6)	но	15,4
beta-Cimeno (3)		2,46	2-Isopropil-1-metoxi-4- metilbenceno (7)		6,69
gamma-Terpineno (4)	1	8,02	Carvacrol (Isotimol) (8)	но	11,9
Z,Z,Z-1,5,9,9-tetrametil- 1,4,7-Cicloundecatrieno (14)		0,48	Cariofileno (9)	7	9,86

Tabla 8B. Composición química del aceite esencial de Origanum syriacum L. muestreado a las 4 horas del proceso de extracción

Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa (%)	Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa (%)
Delta-Cadineno (20)		0,57	Epóxido isoaromaden- dreno (22)		0,44
Germacreno B (19)		3,42	(-)-Spatulenol (17)	SH	0,70
Terpineno 4-acetato (16)	\	2,12	(+)-4-Careno (23)		1,72
Beta-Bisaboleno (12)	}	4,87	Germacreno D (10)		2,68
Alfa-Bisaboleno (21)	3	0,11	3-Careno (24)		0,29

Tabla 8C. Composición química del aceite esencial de Origanum syriacum L. muestreado a las 4 horas del proceso de extracción

Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa (%)	Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa (%)
Metoximesitileno (25)	6	0,84			

Tabla 9A. Composición química del aceite esencial de Origanum syriacum L. muestreado a las 6 horas del proceso de extracción

Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa (%)	Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa (%)
(+)-Sabineno (1)	\\	7,47	gamma-Terpineno (4)		7,42
Epóxido isoaromadendreno (22)		0,18	Biciclo [3.1.0] hexan-2- ol, 2-metil-5-(1- metiletil)-, (1.alfa., 2. beta., 5. alfa.) (5)	но	10,5
beta-Cimeno (3)		1,80	Biciclo [3.1.0] hexan-2- ol, 2-metil-5-(1- metiletil)-, (1.alfa., 2. alfa., 5. alfa.) (11)		0,35

Tabla 9B. Composición química del aceite esencial de Origanum syriacum L. muestreado a las 6 horas del proceso de extracción

Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa (%)	Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa (%)
2-Isopropil-1-metoxi-4-metilbenceno (7)	P	9,93	Carvacrol (Isotimol) (8)	HO	19,5
Cariofileno (9)	7	8,69	Germacreno D (10)		2,32
Z,Z,Z-1,5,9,9-tetrametil- 1,4,7-Cicloundecatrieno (14)		0,41	Beta-Bisaboleno (12)		3,0
(-)-alfa-terpineol (26)	\\\\\\\	2,68	Terpineno 4-acetato (16)		0,99
(-)-Spatulenol (17)	OH	0,32	Elixeno (27)		2,73

Tabla 9C. Composición química del aceite esencial de Origanum syriacum L. muestreado a las 6 horas del proceso de extracción

Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa (%)	Nombre del compuesto químico	Estructura química	Cantidad relativa (%)
(+)-4-Careno (23)		6,21	[1aR- (1a. alfa., 4a. beta., 7. alfa., 7a. beta., 7b. alfa.)-4-metileno-1,1,7-trimetil-decahidro-1H-Cicloprop[e]azuleno (15)	4	0,16
trans-Retinal (28)	Xululu (0,07	(-)-Terpinen-4-ol (6)	***	15,1
Copaeno (29)	8	0,08	Delta-Cadineno (20)		0,23

El género Pleurotus (Pleurotaceae-Basidiomycota) en Paraguay

Alma Flecha Rivas, Barbara De Madrignac, Michelle Campi

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Asunción. Dirección de Investigación Email del autor: flecharivas@gmail.com

El género *Pleurotus* (Pleurotaceae-Basidiomycota) en Paraguay. El presente trabajo describe tres especies del género *Pleurotus* y dos variedades, siendo nuevo registro para el Departamento Central *Pleurotus albidus* y nueva cita para el país *Pleorutus djamour* var. *cyathiformis*, *Pleurotus djamor* var. roseus y *Pleurotus cystidiosus*. Se describen los rasgos macroscópicos distintivos de cada especie, las estructuras microscópicas y la posición taxonómica.

Palabras claves: Agaricales, nuevo registro, Departamento Central

The Genus *Pleurotus* (Pleurotaceae-Basidiomycota) in Paraguay. The present paper describes three species of *Pleurotus* and two varieties, being new record for the central department *Pleurotus albidus* and new citation for the country *Pleorutus djamour* var. *cyathiformis*, *Pleurotus djamor* var. *roseus* and *Pleurotus cystidiosus*. The distinguishing features of each species, the macroscopic and microscopic structures, and their taxonomic position are described.

Keys words: Agaricales, new record, Departamento Central

INTRODUCCIÓN

La posición sistemática del género Pleurotus (Fr.) P. Kummer ha sido ampliamente discutida. Singer (1951) ubica al género Pleurotus en la familia Polyporaceae. Corner (1981) agrupa a los géneros Pleurotus, Lentinus Fr. y Panus Fr. según su sistema hifal. Pegler (1983) asevera que los géneros Lentinus y Pleurotus son afines pero independientes entre sí. Finalmente según estudios filogenéticos realizados por Hibbett and Donoghue (1995) separan a Lentinus, Panus, Pleurotus y Neolentinus Redhead & Ginns en géneros independientes, ubicándose Pleurotus en el orden Agaricales, familia Pleurotaceae (Hibbett et al. 2007). El género presenta especies lignícolas encargadas de descomponer lignocelulosa de manera eficiente, son ampliamente cultivados y posee varias especies que se desarrollan y consumen en todo el mundo (Hernandéz et al. 2005; Gayosso 2001; Zadrazil 1978). Las características distintivas

del género son el píleo flabeliforme a demediado que se une al sustrato por un estípite corto, sólido y grueso que puede ser lateral, a veces excéntrico, central o incluso ausente. Las laminillas son decurrentes, apretadas o ampliamente separadas. El margen es liso o crenado e involuto. El sistema hifal es monomítico o dimítico, las hifas son hialinas y con o sin septos. La esporada es blanca, crema o lila pálido. Pueden crecer de manera solitaria o cespitosa (Pegler 1983). El conocimiento del género Pleurotus en Paraguay es escaso, Spegazzini (1883, 1888, 1922) cita por primera vez para el país en el departamento Central a ocho especies, aunque muchas de ellas han sido actualmente transferidas a otros géneros o son especies que no se han vuelto a describir. Este contribuye con el registro de tres especies del género ya que hasta la fecha en Paraguay no existe registro de las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron obtenidas en un área urbana del departamento Central. Las colecciones se realizaron en los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2013. De cada área se obtuvieron coordenadas geográficas con un GPS Garmin etrex. Los ejemplares fueron fotografiados, descriptos macroscópicamente in situ según Wright and Albertó (2002) v posteriormente deshidratados. Las micrografías fueron montadas en KOH al 5%, Reactivo de Melzer, Floxina y Rojo Congo. Se utilizó microscopio óptico con objetivos de 40X y 100X con aceite de inmersión para la identificación de estructuras. El material colectado fue depositado en el Herbario FACEN. Se utilizó la base de datos del Index Fungorum para nombrar correctamente a las especies y sus sinónimos.

RESULTADOS

Pleurotus djamour var. *cyathiformis* Corner, *Beihefte zur Nova Hedwigia* 69: 123 (1981) (Figura 1, 2)

Basidiomas cespitosos, pleurotoides. Píleo 5-15 cm de diámetro, demediado a infundibuliforme. Color blanco en el centro y se va oscureciéndose hacia el margen, tornándose amarillento con la madurez. Superficie tormentosa en el centro y glabra hacia el margen. Escamas caedizas. Margen entero, ondulado e involuto, hasta 1mm de grosor, en ejemplares maduros plano-convexo de bordes irregulares. Laminillas blancas, anchas, decurrentes, próximas con bordes lisos amarillentos. Lamélulas presentes. Estípite 2-4 x 0,2-0,7

cm, excéntrico a lateral, curvado, cilíndrico, macizo ensanchándose hacia la base. **Contexto** delgado, húmedo cuando fresco y de consistencia flexible, en seco papiráceo a coriáceo. Carne blanca y flexible de olor suave y agradable. **Esporada** no observada.

Basidiosporas 8-10 x 3,5-4 µm, Q: 2-2,57 μm, Qx: 2,32 μm, N: 1, n: 10, cilíndricas con apículo en vista lateral, hialinas en KOH, inamiloides, de paredes delgadas, congófilas. Basidios 20-30 x 4-8 µm estrechamente claviformes, tetrasporados con esterigmas de hasta 4 µm longitud. Queilocistidios y Pleurocistidios no observados. Subhimenio bien diferenciado con células globosas. Trama himenoforal irregular, hifas de 3-5 µm de diám. Pileipellis en un cutis, hifas con fíbulas de paredes delgadas. Hifas del contexto entrelazadas de paredes simples, hialinas en KOH. Estípitepellis formada por hifas hialinas, septadas de paredes delgadas dispuestas en forma paralela.

Hábitat y Distribución: Gregarios, creciendo sobre troncos muertos, en zona urbana. Registrado anteriormente para Misiones, Argentina (Lechner & Wright, 2004). El presente es el primer registro para Paraguay.

Material estudiado: PARAGUAY, Departamento Central, Ciudad de Asunción (25°17'35''S 57°34'48''W). 29/10/2013, *leg*. Flecha, A., De Madrignac, B & Campi, M. (FACEN, 55).

Observaciones: *P. djamor* se caracteriza por presentar el contexto dimítico (Lechner et al, 2004). *P. djamor var. cyathiforme* se diferencia de las restantes variedades de la misma especie por la forma y coloración de su píleo (Lechner et al. 2004).

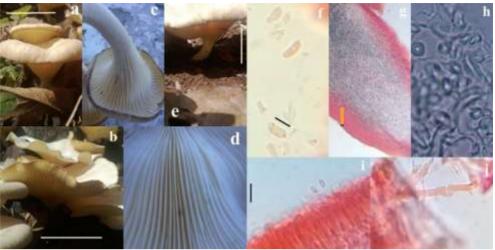


Figura 1. *Pleurotus djamor* var. *cyathyformis:* a-b: Basidioma; c-d: Himenóforo; e: Estípite, f: Basidiosporas; g: Trama; h: Subhimenio; i: Basidio; j: Hifas con fíbulas. Escala: a, b, c, d y e = 15 cm, f, g, h, i y j = 5μ m.

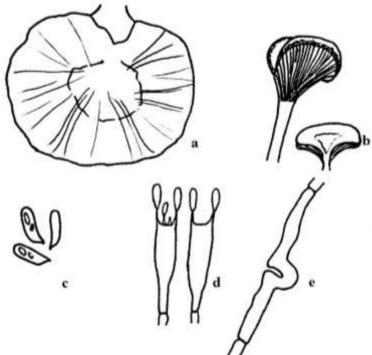


Figura 2: *Pleurotus djamor var. cyathiformis.* a-b: Basidioma; c: Basidiosporas; d: Basidios; e: Pileipellis, hifa fibulada.

Pleurotus djamor var. roseus Corner, *Beihe-fle zur Nova Hedwigia* 69: 123 (1981). (Figura 3, Figura 4)

Basidiomas gregarios, saprófito, de hábito pleurotoide. Píleo 2-10 x 2–5 cm flabeliforme, demediado. Color rosa-salmón cuando fresco, volviéndose castaño pálido cuando seco. Superficie lisa. Margen crenado, liso, concoloro al píleo. Laminillas decurrentes, subdistantes a distantes, de color rosa pálido en fresco, ocres cuando seco. Lamélulas presentes. Estípite 2–4 x 1–1,5 cm, central, macizo, fibroso, concoloro al píleo, coriáceo cuando seco. Contexto carnoso, carne blanca, húmeda de olor suave y agradable. Esporada no observada.

Basidiosporas (12)8-10 x 3-4 μm, Q=2-3 μm, Q=2,35 μm, N:1, n:15, oblongas, hialinas, lisas de paredes delgadas. **Basidios** 15-20 x 6-10 μm, tetraspóricos y claviformes. **Pleurocistidios** no observados. **Queilocistidios** 20-32 x 6-8 langeriformes a fusiformes. **Trama himenoforal** completamente irregular con hifas generativas hialinas de paredes delgadas e hifas esqueletales hialinas con paredes gruesas. Fíbulas presentes. **Subhimenio** bien desarrollado con elementos irregulares de

aspecto romboide. **Pileipellis** con hifas generativas y esqueletales ampliamente ramificadas. Sistema hifal dímitico.

Hábitat y distribución: Saprófito, gregario, creciendo sobre tronco en descomposición Conocido anteriormente para Argentina (Lechner et al. 2004) y Brasil (De Meijer 2008). El presente es el primer registro para Paraguay.

Material examinado: PARAGUAY, Departamento Alto Paraná, refugio Biológico Tati Yupi, 25°25′00″S 54°38′00″O. 26/02/2014. *Leg.* De Madrignac, B. & Gullón, M. (FACEN, 47).

Observaciones: *P. djamor* var. *roseus* se caracteriza por presentar el basidioma de coloración salmón a rosa pálido. En cuanto al subhimenio, ambas variedades, *P. djamor* var. *roseus* y *P. djamor* var. *cyathyformis* lo presentan bien desarrollado pero se diferencian por las formas de las células romboides y redondeadas respectivamente (Lechner, *et al.*, 2004). Otra variedad de la misma especie es *P. djamor* var. *djamor* que presenta una coloración del píleo marrón con una superficie lisa y glabra (Lechner et al. 2004), la cual no ha sido registrada para Paraguay.



Figura 3. *Pleurotus djamor* var. *roseus*: a-b: Basidioma; c: Himenóforo; d: Basidios; e: Basidiosporas; f: Queilocistidios. Escala: a, b y c= 10 cm; d, e y f= 5 μm

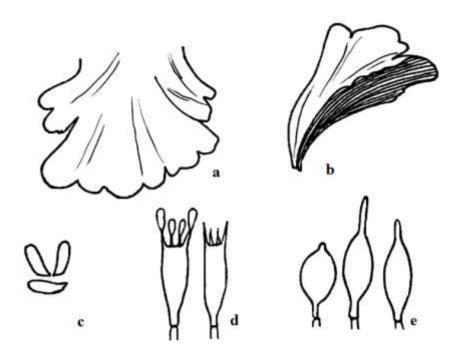


Figura 4: *Pleurotus djamor* var. *roseus* a-b: Basidioma; c: Basidosporas; d: Basidios; e: Queilocistidios

Pleurotus albidus (Berk.) Pegler, Kew Bulletin, Additional. Serie 10: 219 (1983)

<u>■ Lentinus albidus Berk., London Journal of Botany 2: 633 (1843) (Figura 5, 6)</u>

Basidiomas cespitosos. Píleo 3-15 cm de diámetro, convexo con depresión central, infundibuliforme, demediado a circular de color blanco-amarillento. Superficie con escamas caedizas. Margen involuto, entero y en algunos ejemplares lobular, carnoso de 0,1 cm de grosor. Carne delgada y blanca. Olor: fúngico suave. Laminillas decurrentes subdistantes, de 0,1–0,2 cm de distancia interlaminar, muy amarillas al secarse. Con lamélulas. Estípite de 3–7 x 0.5–1.5 cm, excéntrico a lateral, cilíndrico, macizo, fibroso de color blanco con algunas escamas castañas.

Basidiosporas de 7-9 x 3-4 µm, O: 1,5-2,5 μm, Qx: 1,8 μm, N= 1, n=10; cilíndricas a elíptico-elongadas, hialinas en KOH, lisas, paredes simples con apículo lateral, inamiloides. **Basidios** de 25-30 x 4-5 µm, claviformes tetrasporados, hialinos, paredes simples con grandes esterigmas de 1-5 µm. Pleurocistidios no observados. Queilocistidios de 25-35 x 4-5 µm. capitados, cilíndricos, de pared delgada. Subhimenio poco diferenciado de 10–15 µm. **Trama himenoforal** irregular con hifas hialinas de 3-5 µm de paredes delgadas, sin septos, ramificadas, inamiloides. Fíbulas presentes. Pileipellis en cutis, con hifas de 4-5 µm de paredes simples, con septos y fíbulas. Contexto dimítico. Hifas generativas de 2–3 um muy ramificadas de paredes simples, sin septos, inamiloides. Hifas esqueletales de 3–5 um.

Hábitat y Distribución: Gregarios, creciendo sobre tronco de árbol caído. Conocido anteriormente para Paraguay, departamento Paraguarí (Spegazzini 1883), Argentina (Lechner et al. 2004), Brasil (Pegler 1988), México (Moreno-Fuentes et al. 2006) India (Kumari et al. 2012).

Material examinado: PARAGUAY, Departamento Central (25°14'42,7"S 57°34'28,2"W), 21/11/13, *leg*. Flecha, A., De Madrignac, B. & Campi (FACEN-048).

Observaciones: Pleurotus albidus se caracteriza por presentar una coloración amari-

llenta de las láminas al secarse, en tanto que las demás especies examinadas no presentan cambios en la coloración en las láminas. En *P. albidus* existe una discrepancia en cuanto a la presencia o ausencia de estructuras vegetativas como los queilocistidios y pleurocistidios; Según Wright and Albertó (2002), posee pleurocistidios y queilocistidios, en tanto que, Wright et al (2008) aseguran que los queilocistidios se encuentran ausentes y no menciona la presencia de pleurocistidios. En el material examinado, se encontraron queilocistidios los cuales coincidían en forma y medida con los de Wright and Albertó (2002).

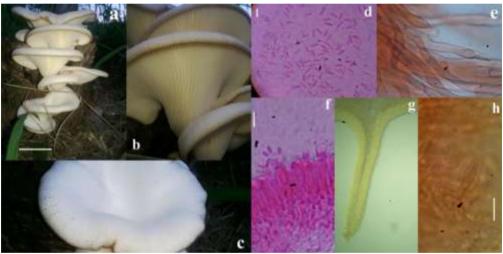


Figura 5. *Pleurotus albidus* a, b, c: Basidioma; d: Basidiosporas; e: Pileipellis: Hifas con fíbulas; f: Basidio; g: Trama himenoforal; h: Pileocistidios. Escala: a, b y c: 15 cm, d, e, f y h: 5 µm.

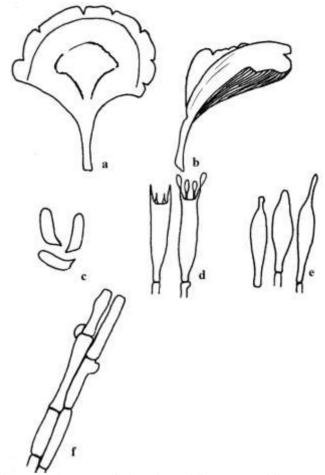


Figura 6: *Pleurotus albidus* a-b: Basidioma; c: Basidiosporas; d: Basidios; e: Queilocistidios; f: Pileipellis, Hifas fibuladas.

Pleurotus cystidiosus O. K. Miller, *Mycologia* 61: 889 (1969). (Figura 7, Lámina 8).

Basidioma pleurotoide, solitario. Píleo 3–6,5 cm al principio enrollado a plano-convexo con una leve depresión central, seco. Color crema con escamas marrones en la superficie. Superficie con escamas marrones que se extienden del margen al centro del píleo. Margen entero e involuto, lobulado. Laminillas decurrentes, distantes blancas amarillentas con borde entero. Con lamélulas. Estípite 2-3 x 0,3-0,5 cm, excéntrico, cilíndrico de base

estrecha, seco de color blanco brillante con pubescencia, micelio basal tomentoso abundante y rizomorfos. **Contexto** carnoso. Carne blanca, flexible tornándose coriácea cuando seco y toma una coloración amarillenta. Olor fúngico suave y agradable. **Esporada** no observada.

Basidiosporas 8-11 x 4 μ m de diámetro, Q= 2- 2,75 μ m, Qx = 2,38 μ m, N: 1, n= 15 oblongo-elipsoidales, hialinas, lisas inamiloides. **Basidios** 25-30 μ m, hialinos, claviformes, tetraspóricos. **Pleurocistidios** 30-57 μ m hialinos claviformes, ventricosos. **Queilocis**

tidios no observados. Subhimenio levemente visible con elementos angulares hialinos en KOH. Trama himenoforal irregular con hifas generativas de 5-8 μm, hialinas, sin septos e hifas de paredes gruesas de 5 μm de diámetro. Fíbulas presentes. Pileipellis con hifas paralelas de 6-10 μm de diám. Pileocistidios de 40x10 μm fusiformes, cilíndricos y langeriformes. Fíbulas presentes. Contexto monomítico formado por hifas hialinas de paredes finas.

Hábitat y Distribución: Saprófito, solitario, sobre troncos en putrefacción, cercano al bosque de pinos. Registrado anteriormente para Buenos Aires, Argentina (Lechner et al. 2004), para la región de Paraná, Brasil (Rait-

herhuber 1991). El presente es la primera cita para Paraguay.

Material examinado: PARAGUAY, Departamento Central, Facultad de Ciencias Veterinarias (25°14'42,7"S 57°34'28,2"W). 3/04/14, *leg.* Flecha, A. (FACEN, 49).

Observaciones: está especie es solitaria y se caracteriza por presentar abundantes pileocistidos. Lechner et al (2004) remarcan la presencia de pleurocistidios y ausencia de queilocistidios, sin embargo, en su descripción original Miller (1969) destaca la presencia tanto de pleurocistidos como queilocistidios. En el material examinado no se observaron queilocistidio.

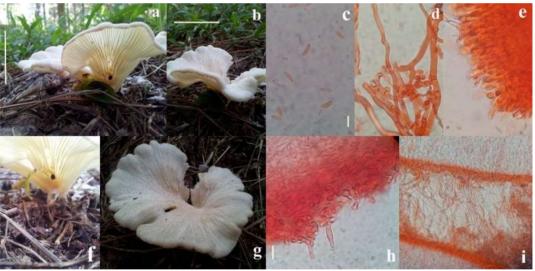


Figura 7. *Pleurotus cystidiosus*. a, b, f y g: Basidioma; c: Basidiosporas; d: Hifas con fíbulas (Pileipellis); e: Pileipellis; h: Pileocistidios; I: Trama himenoforal. Escala: a, b, f y g = 15 cm; c, d, e, h y $i = 5 \mu m$.

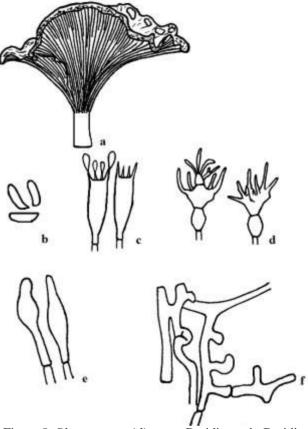


Figura 8: *Pleurotus cystidiosus* a: Basidioma; b: Basidiosporas; C: Basidios; d: Pleurocistidios; e: Pileocistidos; e: Pileipellis, hifas fibuladas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Corner, E. J. H. 1981. The agaric genera *Lentinus*, *Panus* and *Pleurotus* whit particular reference to Malaysian species. Beihefle zur Nova Hedwigia 69: 1-169.

De Meijer, A. 2008. Macrofungos Notáveis das Florestas de Pinheiro do Paraná. Embrapa Florestas. Colombo, Paraná Brasil. 147-148 pp.

Gayosso, M. 2001. Caracterización de los componentes de un extracto de primordios de *Pleurotus ostreatus* que induce sus fruc-

tificación Tesis Maestría en Ciencias Biotecnológica. Universidad de Colima.

Hernández, D.; Andren, L. y Mata, G. 2005. Caracterización bioquímica de seis sepas de Pleurotus. Rev. Mexicana de Micologia 21:72–76.

Hibbett, D. Binder, M. Bischoff, J. Blackwell, M. Cannon, P. Eriksson, O. Huhndorf, S. James, T. Kirk, P. Cking, R. Lumbsch, H. T. Lutzoni, F. Matheny, P. B. Mclaughlin, D. Powell, M. J. Redhead, S. Schoch, C. L. Spatafora, J.W. joost a. Stalpers, J. A. Vilgalys, R Aime, M. C. Aptroot, A. Bauer, R. Begerow, D. gerald

- 1. Benny, G. L. Castlebury, L. A. Crous, P.W. Dai, Y. C. Gams, W. Geiser, D. M. Griffith, G. Gueidan, C. Hawksworth, D. L. Hestmark, G. Hosaka, K. Humber, R. A. Hyde, K. D. Ironside, J. E. Koljalg, U. Kurtzman, C. P. Larsson, K. Robert Lichtwardt, R. Longcore, J. miadlikowska, J. Miller, A. Moncalvo, J. M. Mozley-Standridge, S. Oberwinkler, F. Parmasto, E. Reeb, V. Rogers, J. D. Roux, C. Ryvarden, R. Sampaio, J. P. Schüßler, A. Sugiyama, J. Thorn, R. G. Tibell, L. Untereiner, W. A. Walker, C. Wang, Z. Weir, A. Weiss, M. White, M. Winka, K. Yao, Y. Zhang, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. Mycological research 3: 551-554.
- Hibbett, D.S., Donoghue, M.J. (1995). Evolutionary diversity of polypore fungi: a molecular phylogenetic perspective. American Journal of Botany 82 (6): 78-79.
- Kumari, B., Upadahyay, R. C. and Sapan, S. 2012. Mycological observation on Genus Pleurotus from India. Global Journal of Environmental Research 6(3): 80-83.
- Lechner, B., Wright, J. and Albertó, E. 2004. The genus *Pleurotus* in Argentina. Mycología 96(4): 845 – 848.
- Miller, O. K. 1969. A new species of *Pleurotus* whit a coremioid imperfect stage. Mycologia 61: 887-893.
- Moreno-Fuente, A. y Bautista-Nava, E. 2006. El hongo patón Pleurotus albidus, en

- Hidalgo. Su primer registro en México. Revista mexicana de Micología 22: 41-47.
- Pegler, D. N. 1983 The genus *Lentinus*: a world monograph. Kew Bulletin Additional Series 10: 281.
- ______1988. Agaricales of Brazil described by M. J. Berkeley. Kew Bulletin 43(3): 453-473.
- Singer, R. 1951. The Agaricales in modern taxonomy. Lilloa 22: 1-832.
- Spegazzini, C. 1883. Fungi Guaranitici. Pugillus I. Anales de la Sociedad Científica Argentina 16(5):247.
- 1888. Fungi Guarinitici. Pugillus II. Anales de la Sociedad Científica Argentina 26(1): 5-74.
- Anales del Museo Nacional de Historia Natural Buenos Aires 31: 355-450.
- Wright, J. Albertó, E. 2002. Hongos. "Guía de la Región Pampeana, Tomo I. Hongos con laminillas. Editorial L.O.L.A. Buenos Aires. Argentina. 279 pp.
- Wright, L. Lechner, B & Popoff, O. 2008. Hongos. Atlas pictórico del Parque Nacional Iguazú. Editorial L.O.L.A. Buenos Aires. Argentina. 227 pp.

www.indexfungorum.org

Zadrazil, F. 1978. Cultivation of *Pleurotus* ostreatus en S.T. Chang, W.A. Hayes (Eds): The Biology and cultivation of Edible Mushrooms. London Academic Press. 521-557 pp.

Análisis de los remanentes de comunidades vegetales de las cuencas del Rio Salado y del Arroyo Pirayú, en el área de influencia del Lago Ypacarai

Bonifacia Benítez¹, María Vera¹, Siemens Bertoni²

²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción E mail del autor: bbenbert@facen.una.py; benitez_una@hotmail.com

Análisis de los remanentes de comunidades vegetales de las cuencas del Rio Salado y del Arroyo Pirayú, en el área de influencia del Lago Ypacarai. El Lago Ypacaraí está ubicado al este de Asunción (57 y 58° S; 25 y 26° W). Se encuentra en una planicie de cota inferior a los 100 m. s. n. m., al sur de la Cordillera de los Altos (450 m); está formado por la confluencia de los ríos Yagua-resa u, Pirayú y Ypucu. El objetivo de este trabajo fue evaluar el estado actual de los remanentes de comunidades vegetales existentes en la cuenca de un efluente y afluente del Lago Ypacarai. La metodología aplicada fue identificar y analizar los remanentes de comunidades vegetales; se colectó, procesó y determinó material de herbario, se caracterizó cada comunidad vegetal y se analizó la estructura horizontal de la vegetación (abundancia, dominancia e Índice de Valor de Importancia Familiar). Las comunidades vegetales identificadas fueron: Bosque en galería de altura media, Bosque ribereño de altura media, Bosque alto ribereño, Sabana Palmar de Copernicia alba y poblaciones de especies acuáticas entre las que se mencionan a Eichhornia crassipes (camalotales), Typha spp (totorales), Cyperus giganteus (pirizales) y Thalia geniculata (peguajosales), acompañadas de poaceas y cyperaceas acuáticas; además de asociaciones de Erythrina crista-galli (ceibo) y Sapium haematospermum (kurupika'y).

Palabras claves: Lago Ypacarai, Abundancia y dominancia, Ecología

Analysis of the current state of the remnants of plant communities from basins of the Salado river and the Pirayú stream in the catchment area of the Ypacarai lake. The main purpose of this research was to identify and analyze the remnants of plant communities in the basin of an effluent and affluent of the Ypacarai lake. The methodology had the following steps: study site selection, sampling design, collection and processing of herbarium material, taxonomic determination, characterization of the community, analysis of data such as abundance and dominance, and determination of the Importance Value Index of the families. In addition, a comparative analysis with previous studies was performed. The studies revealed the presence of the following communities: medium-height gallery forest, medium-height riparian forest, high riparian forest, palmar savannah composed of *Copernicia alba*, and populations of aquatic species among which: *Eichhornia crassipes* (camalotales), *Typha* spp (totorales), *Cyperus giganteus* (pirizales), *Thalia geniculata* (peguajosales) are mentioned, accompanied by aquatic Poaceae and Cyperaceae; in addition to associations between *Erythrina crista-galli* (ceibo) and *Sapium haematospermum* (kurupika'y). **Key Words:** Ypacarai Lake, Abundance and dominance, Ecology

INTRODUCCIÓN

El Lago Ypacaraí, está ubicado al este de Asunción cuyas coordenadas geográficas son las siguientes: 57 y 58° S; 25 y 26° W. Se encuentra en una planicie de cota inferior a los 100 m s. n. m., al sur de la Cordillera de los Altos con 450 m sobre el nivel del mar; está formado por la confluencia de los ríos Yaguaresa y, Pirayú y Ypucu.

La formación geológica está constituida por el conglomerado de base y las areniscas arcósicas y sacaroides; los sedimentos del lecho son limos orgánicos, el valle está cubierto por sedimentos cuaternarios que forman una planicie aluvial con sedimentos predominantemente arenosos (Ritterbusch, 1988). Según el mismo autor su cuenca es de origen tectónico, producida por las fallas principales del sistema, por perturbaciones escalonadas de

¹ Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción

rumbo Noreste-Suroeste, abarca un área de aproximadamente 880 km² y sirve de medio de transporte para los desagües de las comunidades, industrias y el material alóctono de la erosión.

Según Josse et al (2007), los ecosistemas acuáticos como cualquier otro tipo de ecosistema, son vulnerables a las acciones antropogénicas. De acuerdo a esto el Convenio de Diversidad Biológica (CDB), sugiere que el enfoque ecosistémico es el que se debe utilizar para la planificación, la conservación y el uso sostenible de los recursos naturales: el mismo autor refiere, que es importante aportar el conocimiento de la cobertura vegetal natural actual y potencial, para facilitar de esta forma procesos de restauración ecológica y una interpretación adecuada sobre la potencialidad natural vegetal de cada territorio; además, menciona la importancia de implementar programas de monitoreo y evaluación de la integridad ecológica.

Por su parte, Altieri & Nicholls (2000) manifiestan que el manejo ecosistémico de un sitio vulnerable es el que mejor resultado aporta, en especial cuando se trata de ecosistemas frágiles. En todo ecosistema se dan una variedad de procesos de renovación y servicios ecológicos; cuando estos se pierden, los costos pueden ser significativos (Altieri & Nicholls, 2000), tal es la situación observada en el Lago Ypacarai, donde los procesos ecológicos naturales, se vieron interrumpidos por factores externos como la degradación de la cobertura vegetal, el incremento de la contaminación y otros factores antropogénicos son como la ganaderia y la agricultura en pequeña escala que son una constante en la zona del Lago Ypacaraí. En el lago existe una desembocadura por donde los Arroyos Pirayú, Yagua Resa-ú, Ypucú y otros pequeños cursos aportan sus aguas al lago Ypacarai, y luego éste desagua por el Rio Salado, hacia el rio Paraguay, con una velocidad que indudablemente hace pensar en la existencia de una corriente constante parecida a la de un río; es decir, es posible que en un principio existiera continuidad entre la entrada y la salida, como un río con todos sus elementos (González Romero, 1980).

Numerosos son los estudios llevados a cabo en el área de influencia del lago, en especial lo referente a la vegetación, en este sentido se mencionan los trabajos realizados por el Instituto de Ciencias Básicas-Universidad Nacional de Asunción (1985), donde se citan algunas especies vegetales propias de la zona. Por su parte Mereles, (1991), describe las unidades de vegetación existentes en la zona, en la que menciona el bosque en galería, matorrales, praderas y sabanas hidromórficas con sus correspondientes elementos. Más adelante, Recalde et al (1991, 1993), hace referencia a los siguientes tipos de vegetación encontrados en la Cuenca alta del Rio Salado: Panicetum, Crysophylletum, Ipomoetum, además de Cedreletum, Celtetum y Acacetum; el mismo autor hace referencia a formaciones de sabana arbolada, bosque alto residual, bosque residual de altura media, bosque ribereño y matorral periódicamente inundable encontrados en la zona.

Según el Instituto de Ciencias Básicas-Universidad Nacional de Asunción (1985). para el lago Ypacarai, la clasificación de lago, laguna o río, se refiere a un ecosistema acuático abierto (río) o cerrado (lago, laguna). El mismo autor refiere que el Lago Ypacarai es un ecosistema abierto porque tiene entrada (Yapipú) y salida (Río Salado); por eso tiene la característica de un río; además menciona que tiene las propiedades de un ecosistema cerrado (laguna; poca profundidad y muy poca corriente). Finalmente este autor expresa que este ecosistema posee dos características combinadas, como un híbrido, que permite deducir de que el Lago Ypacarai no es lago, según la clasificación limnológica, sino más

bien un embalse natural con características de una laguna.

La vegetación es uno de los elementos más relevantes de la mayoría de los ecosistemas, es el sustento de la cadena trófica para mantener el equilibrio de los mismos; en este sentido las comunidades vegetales de las cuencas adyacentes al Lago Ypacaraí, ya sea afluente o efluente han tenido una cobertura vegetal que mantenía el equilibrio de este sistema, de lo que actualmente solo existen remanentes de comunidades vegetales.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el estado actual de los remanentes de comunidades vegetales existentes, y que la información generada pueda ser utilizada, en los delineamientos que se realizaren en el futuro, así como para la toma de decisiones en la búsqueda de soluciones a los problemas socioambientales generados en torno al lago. La vegetación en la zona es un área que precisa de la restauración de sus componentes, de manera que ésta pueda ser una de las soluciones que coadyuven a la recuperación del Lago Ypacaraí.

El conocimiento sobre la diversidad florística aun existente facilitará el mejoramiento de las condiciones ecológicas del sistema, de la cual el hombre es el principal beneficiario, ya que conociendo sus elementos será posible la restauración o la conservación sustentable.

La identificación y el análisis de los remanentes de comunidades naturales en las cuencas del Rio Salado y el Arroyo Pirayu, en la zona de influencia del Lago Ypacarai, proporcionará informaciones valiosas para la toma de decisiones en los procesos de restauración a llevarse a cabo en la zona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de sitios de estudio

El sitio de estudio, abarca las unidades de vegetación que se encuentran en la ribera del Río Salado y del Arroyo Pirayú y otros cauces hídricos de la cuenca del lago Ypacarai. Fueron localizados puntos de muestreo a lo largo de los cauces.

Las comunidades muestreadas fueron los bosques en galería, bosques ribereños, sabanas palmares de *Copernicia alba* y comunidades acuáticas, que son los que aún permanecen. Para los fines de este trabajo se define al bosque ribereño como aquellas comunidades bióticas y el ambiente en orillas de quebradas o caños, ríos, lagunas, lagos y algunos humedales según Naiman et al (2005), en Diaz P. et al (2010); bosques en galería son las unidades de vegetación que se desarrollan bajo la influencia de los cursos de agua.

Las coordenadas de los ocho puntos de muestreo se mencionan en la Tabla 1. La localización en el mapa de los puntos de muestreo se observa en la Fig. 1.

Steviana, Vol. 6. 2014. Benítez et al. Análisis de los remanentes de comunidades vegetales de las cuencas del Rio Salado y del Arroyo Pirayú, en el área de influencia del Lago Ypacarai

Tabla 1. Unidades de Vegetación y coordenadas de los sitios de muestreo

Unidades de Vegetación	Nombres de sitios	Coordenadas
Bosque en galería de altura media	Parcela Arroyo Pirayú 1	25°23'22''S 57°16'5,8''WO
	Parcela Arroyo Pirayú 2	25°23'12,2''S 57°16'11,2''WO
Sabana palmar de Copernicia alba	Parcela Palmar 1	25°12'25''S 57°22'48,5''WO
	Parcela Palmar 2	25°12'29,2''S 57°24'48''WO
Bosque alto en galería	Parcela Río Salado 1	25°14'19,5''S 57°19'56,7''WO
Bosque en galería de altura media	Parcela Río Salado 2	25°14'45,9''S 57°19'41,7''WO
Bosque ribereño de altura media	Parcela Patiño 1	25°20'6,5''S 57°20'28,3''WO
Bosque alto ribereño	Parcela Patiño 2	25°20'0,8''S 57°20'30,1WO



Figura 1. Mapa de localización de los puntos de muestreo

Las Parcelas fueron de 2 x 50 m, siguiendo la metodología propuesta por Gentry (1986) en Sayre et al (2000). Se consideraron para el muestreo a las Angiospermas.

Colectas, procesamiento de material de herbario y determinación taxonómica

Se colectaron y procesaron todas las especies encontradas fértiles (con flor y/o fruto). Las muestras fueron depositadas en el Herbario FACEN del Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales. Se registró además las especies estériles in situ.

Se identificaron las especies en el campo y las que no fueron identificadas en los sitios de colecta han sido determinadas a través de claves de identificación taxonómica y comparación de las muestras colectadas con material de herbario. Las identificaciones y las nomenclaturas fueron corroboradas en Tropicos (2013), Flora del Conosur (2013) y Flora de Paraguay

Se elaboró el listado de especies presentes en las comunidades con los siguientes datos para cada una: Familia botánica, nombre científico, nombre común, hábito, usos, hábitat y referencia.

Caracterización cuantitativa de la comunidad y análisis de datos

Se describieron y caracterizaron las comunidades vegetales teniendo en cuenta la fisonomía de las mismas, se determinó la abundancia, la dominancia y el Índice de valor de Importancia Familiar.

Abundancia:

Es el número de individuos por área y por especie en relación con el número total de individuos.

La abundancia absoluta es el nº de individuos por especie con respecto al nº total de individuos encontrados en el área de estudio.

La abundancia relativa es la proporción de individuos de cada especie en el total de los individuos del área (Lamprecht, 1990) Abundancia relativa (Ab %)= ni/N x 100 ni=número de individuos de la iésima especie N=número de individuos totales en la muestra

Dominancia:

Es el grado de cobertura de las especies o del espacio ocupado por ellas Se determina como la suma de las proyecciones horizontales de las copas de los árboles en el suelo. Debido a que la estructura vertical de los bosques naturales tropicales y sub tropicales es compleja, para la determinación de las proyecciones de las copas de los árboles se utiliza las áreas básales, debido a que existe una correlación lineal alta entre el diámetro de la copa y el fuste (Lamprecht, 1990).

Es la sumatoria de las áreas basales de los individuos de una especie sobre un área dada.

Dominancia absoluta = La suma de las Áreas basales de los individuos de una especie/La suma de las Áreas basales de todas las especies

Dominancia relativa = (Dominancia absoluta de una especie/Dominancia absoluta de todas las especies) x 100

Índice de valor de Importancia Familiar:

Se elaboró una lista de los individuos inventariados para cada categoría con su densidad promedio. Para los individuos con DAP > 2,5 cm se calculó la abundancia y el Índice de Valor de Importancia Familiar (IVIF) según Mori et al (1983), usando el software EXCEL, citado en Díaz P. et al (2010) mediante la siguiente fórmula:

IVIF $i = \Sigma DvRFi + DRFi$

IVIFi = Índice de Valor de Importancia Familiar

DvRFi (Diversidad Relativa Familiar) = $(N^{\circ}$ de especies de la familia i/ N° de especies totales) \times 100

DRFi (Densidad Relativa Familiar) = $(N^{\circ}$ de individuos de la familia i/ N° de individuos totales) × 100 (Alvis, 2009)

RESULTADOS

Listado florístico

Del relevamiento florístico realizado, se registró que un total de 100 especies, de las cuales el 49% pertenecen al bosque, 42 % pertenecen al humedal y el 8% al palmar de *Copernicia alba*. En la Tabla 2 del Anexo A se registran el listado de familias, especies, nombre común, hábito, hábitat y material de referencia.

Clasificación de las unidades de vegetación

Las figuras de las diferentes comunidades se encuentran en el Anexo B.

Las unidades muestreadas, corresponden a Bosque en galería de altura media, Fig. 2 y 3 (Parcela Arroyo Pirayú 1, Parcela Arroyo Pirayú 2); Sabana palmar de *Copernicia alba*, Fig. 4 (Parcela Palmar 1, Palmar 2); Bosque alto en galería, Fig. 5 (Parcela Río Salado 1); Bosque en galería de altura media, Fig. 6 (Parcela Río Salado 2); Bosque ribereño de altura media, Fig. 7 (Parcela Patiño 1); Bosque alto ribereño, Fig. 8 (Parcela Patiño 2).

Caracterización de las comunidades remanentes

La caracterización cuantitativa de las comunidades se menciona en el Anexo C.

Bosque en galería de altura media (Parcela Arroyo Pirayú 1)

En este tipo de bosque con una altura promedio de 10 m, las especies que predominan son aquellas resistentes a inundaciones periódicas, que caracterizan al área; en ella se mencionan *Actinostemon concolor*, con una abundancia relativa del 58% en la parcela y dominancia relativa de 42%, seguido en orden de importancia por *Terminalia sp* con una abundancia y dominancia relativa de 10,26 % y 10,82 % respectivamente. Tabla 3

Las que presentan un mayor Valor de Índice de importancia familiar son: Euphorbiaceae, Combretaceae, Annonaceae. Tabla 4.

Bosque en galería de altura media (Parcela Arroyo Pirayú 2)

Bosque de 15 m, con predominancia de *Actinostemon concolor y Terminalia sp*, seguido de *Acrocomia aculeata*, *Eugenia sp*, *Guarea sp*, *Peltophorum dubium*, *Sorocea saxícola y Terminalia triflora*. Las dos especies más abundantes, *Actinostemosn concolor* y *Terminalia sp* tienen 57,89 % y 10,53% respectivamente, presentan además, valores de dominancia relativa mayores en referencia a las otras especies, 51,518 % y 20,408 % respectivamente. Tabla 5

Las dos parcelas relevadas a orillas del cauce del Arroyo Pirayú corresponden a la misma comunidad, se observó que en ambas parcelas predominan individuos pertenecientes a la especie *Actinostemon concolor*, lo que ha dado como resultado, que las mismas tengan el Índice de Valor de Importancia Familiar similares. El mayor Índice de Valor de Importancia Familiar (IVIF) corresponde a las familias Euphorbiaceae y Combretaceae. Tabla 6

Sabana palmar de Copernicia alba (Parcela Palmar 1, Palmar 2)

Tanto la parcela del palmar 1 y 2, corresponden a una misma formación, constituye la comunidad de sabana palmar de *Copernicia alba* homogénea, sin la presencia de otras especies arbóreas, con un tapiz graminoso muy denso en toda su extensión, compartiendo con especies arbustivas de *Acacia aroma* y *Sesbania sp*; en las que medran otras especies herbáceas tales como: *Paspalum rufum*, *Oxalis sp*, *Cyperus sp*, *Euphorbia repens*, *Plantago major*, *Phyllantus sp*. Tabla 7 y 9.

En estas dos parcelas, la familia Arecaceae presenta el Indice de Valor de Importancia Familiar equivalente a 200. Tabla 8 y 10.

La parcela Palmar 1, es una población que está constituida por individuos cuya altura va hasta 14 m, mientras que la parcela Palmar 2 está representada por una población compuesta de individuos más jóvenes, cuyas alturas llegan hasta los 5 m.

Bosque alto en galería (Parcela Río Salado 1)

Bosque con altura que va hasta los 25 m, en el que predominan especies tales como Seguiera paraguariensis, Achatocarpus praecox, Albizia niopoides y Cassearia sylvestris, que son las de mayor abundancia relativa, 15,79% para el primero y 10,53% para las otras tres especies mencionadas. Es importante señalar, que las especies de mayor dominancia relativa son las siguientes: Chloroleucon tenuiflorum, Seguiera paraguariensis, Albizia niopoides y Acrocomia aculeata, con 39,16%; 25,10%;17,46% y 7,93% respectivamente. Tabla 11.

Las que poseen un mayor Índice de Valor de Importancia Familiar son: Fabaceae, Phytolacaceae, Achatocarpaceae y Flacourtiaceae. Tabla 12

Bosque en galería de altura media (Parcela Río Salado 2)

En esta formación de 15 m de altura, se ha registrado la predominancia de Ocotea dyospirifolia, Guarea kunthziana y Eugenia sp, con otras especies acompañantes como Chrysophyllum marginatum, Guarea sp. v Rollinia emarginata entre otras. La abundancia relativa de las especies citadas son 22,73%; 18,18% y 13, 64% respectivamente. Se observa además, entre los individuos más escasamente representadas a Achatocarpus praecox, Cassearia sylvestris, Celtis ehrenbergiana y Chloroleucon tenuiflorum. Las especies con mayor dominancia relativa son: Ocotea diospyrifolia y Chloroleucon tenuiflorum con 60,06% y 26,58%. Tabla 13

Las familias con mayor Índice de Valor de Importancia Familiar son: Meliaceae, Lauraceae y Myrtaceae. Tabla 14

Bosque ribereño de altura media (Parcela Patiño 1)

En esta formación, se han registrado alturas que llegan hasta los 18 m, donde predominan *Plinia rivularis, Achatocarpus sp* y *Ocotea sp*, con abundancias relativas de: 22,73% para la primera y 18,18% para las otras dos. Sin embargo, las de mayor dominancia relativa son en el orden siguiente: *Achatocarpus sp*, *Ocotea sp* y *Plinia rivularis* con 23,02%; 18,19% y 14,07% respectivamente. Son especies acompañantes de este grupo: *Acrocomia aculeata*, *Chrysophyllum marginatum* y *Tabernaemontana catharinensis*, entre otras especies menos relevantes. Tabla 15.

El grupo con mayor Índice de Valor de Importancia Familiar es la Myrtaceae, ésta familia se caracteriza por formar comunidades casi puras en regiones sub tropicales, de bosques de altura media. Tabla 16

Bosque alto ribereño (Parcela Patiño 2)

Es la comunidad arbórea más alta entre todas las evaluadas, donde predominan especies tales como: *Plinia rivularis* y *Achatocarpus praecox*, con abundancias relativas de 40,74% y 11,11%; acompañado de *Eugenia sp, Seguiera paraguariensis* y *Sideroxylon obtusifolium*, entre otras de menor abundancia. Cabe resaltar que *Plinia rivularis*, *Albizia niopoides* y *Handroanthus heptaphyllus* son especies con mayor dominancia: con 16,49% para la primera y 16,17% para las dos especies siguientes. Tabla 17

El Índice de Valor de Importancia Familiar dió un valor de 64,81% para la Familia Myrtaceae. Tabla 18

Vegetación acuática (a lo largo del Río Salado)

Los humedales son ecosistemas sumamente dinámicos, caracterizados por la presencia de agua y con límites difíciles de definir (Mereles, 2004).

La caracterización de estas formaciones vegetales está en función a las características de los ambientes acuáticos en los cuales se desarrollan. Entre estos se distinguen básicamente, dos grandes grupos: los ambientes acuáticos, los ambientes palustres o inundables (Mereles, 2004)

Los humedales de los ambientes acuáticos, son la formación vegetal predominante en los puntos de muestreo, se caracteriza por la abundancia de plantas acuáticas y palustres, entre ellas *Eichhornia crassipes* (camalote), especie sudamericana distribuida por las regiones subtropicales y tropicales del mundo.

De acuerdo a la dominancia de las especies observadas se diferenciaron las siguientes tipos de asociaciones vegetales, entre ellas: los totorales, formación vegetal en la que predominan individuos del género Typha (totora), pirizales, formación en la que predominan individuos de *Cyperus giganteus* (piri guasú) y peguajosales, en los que la especie dominante es *Thalia geniculata* (peguajó), acompañada de poaceas y cyperaceas acuáticas, formando densas poblaciones.

Además se mencionan las asociaciones frecuentes desarrolladas sobre suelos arenosos inundables, que en general se ubican en las riberas inundables de cursos de agua y lagunas; las especies más frecuentemente observadas fueron: *Erythrina crista-galli* (ceibo) y *Sapium haematospermum* (kurupika'y).

Otras especies observadas que se pueden mencionar son: Polygonum punctatum (ka'a tai), Polygonum hispidum (ka'a tai guasu), ambas hierbas medicinales utilizadas en la medicina popular, Cyperus giganteus (piri guasú), Pontederia cordata, Hydrocotyle ranunculoides, Rhabdadenia madida, Pistia stratiotes, Eleocharis montana, Cissus palmata, Cayaponia bonariensi, Mikania cordifolia; arbustos Sesbania virgata, Ipomoea carnea, Byttneria scabra, Solanum glaucophyllum, Mimosa pellita, Hibiscus striatus, además de algunos árboles aislados de las especies Sapium haematospermum (kurupika'y) v Erythrina crista-galli (ceibo), Acrocomia aculeata (mbocajá); entre otras especies. Fig. 9, 10, 11 v 12

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos, nos permiten clasificar las unidades de vegetación en cuatro tipos bien diferenciados: los bosques ribereños, los bosques en galería, las sabanas palmares y la vegetación acuática. A continuación se describen cada una de ellas:

Bosques en galería

Son los que acompañan el curso de agua y dependen directamente del mismo, se desarro-

llan sobre los márgenes, y pueden estar sujetas a inundaciones periódicas; presentan 2 estratos de vegetación. En los márgenes del arroyo Pirayú el dosel superior va desde los 8 hasta 15m de altura y el estrato inferior va desde 1,7 hasta 7m. de altura; mientras que en las parcelas del Río Salado, se observa que el estrato superior va de 12 a 25m y el inferior desde 3 a 11 m.

Bosques ribereños

Son los que se desarrollan influenciados por el agua, es decir bosques de tierra firme que llegan hasta los márgenes de los cursos de agua, pueden estar sujetos a inundaciones periódicas. En este caso se observa este tipo de bosques en los bordes del lago Ypacarai, que por los elementos registrados como: *Handroanthus heptaphyllus, Peltophorum dubium y Copaifera langsdorffii*, se lo define como Bosque ribereño. Se distinguen en ellos, 3 estratos, el estrato alto de 20 a 33 m., el intermedio de 10 a 20 m y el estrato bajo de 2 a 9 m.

Sabanas palmares de Copernicia alba (karanda'y)

Son unidades de vegetación en las que el suelo está cubierto por vegetación herbácea dominante, acompañada de algunas especies arbustivas y un estrato superior constituido homogéneamente por poblaciones de palmas de *Copernicia alba*, que van desde una altura de 2 a 14 m.

Vegetación acuática

Se observó la predominancia de comunidades de especies acuáticas entre las que se mencionan a: *Eichhornia crassipes* y *E. azu*rea (camalotales), *Typha spp* (totorales), *Cy*perus giganteus (pirizales), *Thalia geniculata* (peguajosales) acompañadas de poaceas y cyperaceas acuáticas, formando densas poblaciones. Además se observaron asociaciones de *Erythrina crista-galli* (ceibo) y *Sapium haematospermum* (kurupika'y), especies que se ubican en las riberas inundables de cursos de agua y lagunas.

De acuerdo a Mereles (2004), las unidades mencionadas en los párrafos anteriores se engloban dentro de los ecosistemas denominados Humedales, cuyos límites son difíciles de definir. Sin embargo, considerando principalmente los elementos florísticos registrados se propone considerarlos como unidades de vegetación diferentes.

En el estudio de la composición florística, se registraron 100 especies vegetales, perteneciendo el 49% de las especies registradas al bosque, 42% al humedal y el 8% al palmar.

El análisis de la estructura horizontal de las parcelas estudiadas, pone de manifiesto que para los bosques de galería de las cuencas del lago Ypacarai, las familias con mayor número de especies son: Euphorbiaceae y Combretaceae, para los Bosques en galería del Arroyo Pirayú, Lauraceae, Meliaceae, Fabaceae y Phytolaccaceae para los Bosques en galería del Río Salado.

Para los bosques ribereños del lago, las familias predominantes son: Myrtaceae, Achatocarpaceae, Sapotaceae.

En cuanto a las parcelas instaladas en la formación sabana palmar de *Copernicia alba*, se observa que en la parcela 1, la población está constituida por individuos de hasta 14 m, mientras que la parcela 2, la población está compuesta de individuos más jóvenes de hasta 5 m.

Es relevante mencionar, que la vegetación ribereña es de suma importancia en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas de las cuencas, por lo que la restauración es un camino posible para la recuperación de los hábitats degradados; en este sentido la Ley

3239/07, expresa en el artículo 23 que "las márgenes bajo dominio privado adyacentes a los cauces hídricos estarán sujetas, en toda su extensión, a las siguientes restricciones:

- b) Una zona de protección de fuentes de agua de un ancho de cien metros a ambas márgenes, en la que se condicionará el uso del suelo y las actividades que allí se realicen, conforme a lo que establezcan las normas jurídicas ambientales. La zona de policía no incluirá a la zona de uso público y estará adyacente a ésta.
- c) A los efectos del inciso "b", los propietarios ribereños cuyos inmuebles hubieran tenido o hubieran debido tener bosques protectores deberán restablecerlos o reforestar la superficie necesaria para recuperarlos y conservarlos".

El Rio Salado es un efluente importante del Lago Ypacarai, por lo que se considera como un factor de relevancia dentro del ecosistema acuático, tanto el efluente como los afluentes entre ellos el Arroyo Pirayú, deben de tener la cubierta vegetal necesaria para cumplir adecuadamente con el rol dentro de la comunidad natural; tanto en los márgenes del Rio Salado así como en los márgenes del Arroyo Pirayú, en ambos casos solo quedan algunas muestras de comunidades vegetales que forman la cobertura de las cuencas de ambos cursos de agua. Cabe acotar, que el Lago Ypacaraí se encuentra en un estado de fuerte contaminación por las actividades antropogénicas, uno de las causantes de ese estado es la degradación de los ecosistemas naturales que impactan sobre el mismo, entre ellos la degradación de la vegetación de los afluentes y del efluente.

En trabajos de investigación anteriores se han identificado 105 especies (Recalde de Bordón et al, 1991), en contraste con las 100 especies registradas en este estudio, muchas de ellas son similares a las registradas en este trabajo. Comparando los resultados obtenidos por Recalde et al (1993) en la cuenca del Río Salado, se observa que las comunidades boscosas identificadas en ese entonces albergaban en su composición especies como: Cedrela fissilis, Gleditsia amorphoides, Cordia americana, Syagrus romanzoffiana, Tabebuia nodosa, ausentes en el relevamiento realizado en este trabajo.

En el trabajo realizado por Mereles et al (1991), se mencionan especies como: Enterolobium contortisiliquum, Apuleia leiocarpa, Cordia trichotoma, Calycophyllum multiflorum, Protium heptaphyllum, Cedrela fissilis, Maclura tinctoria, Dyatenopteryx sorbifolia, Cordia americana, Gleditsia amorphoides. Las citadas especies no fueron encontradas en el relevamiento realizado.

Los matorrales citados por Mereles et al (1991), ya no han sido localizados en los sitios muestreados en zonas aledañas a la cuenca del lago Ypacarai, del Río Salado y del arroyo Pirayú. La ausencia de las especies y la formación vegetal citada anteriormente, podrían deberse a la degradación y/o extracción a los que son sometidos los ecosistemas que rodean a la cuenca del lago.

CONCLUSIONES

Se clasificaron las unidades de vegetación en cuatro tipos bien diferenciados: los bosques ribereños, los bosques en galería, las sabanas palmares y vegetación acuática.

En el estudio de la composición florística, se registraron 100 especies, perteneciendo el 49% de las especies registradas al bosque, 42% al humedal y el 8% al palmar.

Se observó la ausencia de ciertas especies maderables, tales como: Apuleia leiocarpa, Cordia trichotoma, Calycophyllum multiflorum, Cedrela fissilis, Dyatenopteryx sorbifolia, Cordia americana, entre otras especies de menor importancia, que fueron encontradas en

la década de los años 90, la ausencia de estas especies en los registros actuales podrían deberse a la degradación y/o extracción a los que son sometidos los ecosistemas que rodean a la cuenca del lago..

Las especies con mayor abundancia y dominancia para la Parcela de Pirayu 1 y Pirayu 2 son: *Actinostemon concolor* y *Terminalia sp*

Se observó además en las parcelas Palmar 1 y 2 poblaciones puras de *Copernicia alba*.

En la Parcela Rio Salado 1, predominan en abundancia Seguiera paraguariensis, Achatocarpus praecox, Albizia niopoides y Cassearia sylvestris; y las de mayor dominancia son: Chloroleucon tenuiflorum, Seguiera paraguariensis, Albizia niopoides y Acrocomia aculeata. Mientras que en la Parcela Rio Salado 2, son de mayor abundancia Ocotea dyospirifolia, Guarea kunthziana y Eugenia sp y las de mayor dominancia: Ocotea diospyrifolia y Chloroleucon tenuiflorum.

En la Parcela Patiño 1, las de mayor abundancia son: *Plinia rivularis, Achatocarpus sp* y *Ocotea sp*, en tanto que las de mayor dominancia son *Achatocarpus sp*, *Ocotea sp* y *Plinia rivularis*. En la Parcela Patiño 2, las más abundantes son: *Plinia rivularis* y *Achatocarpus praecox; mientras que, Plinia rivularis*, *Albizia niopoides* y *Handroanthus heptaphyllus* son las especies con mayor dominancia.

En cuanto a los Valores de Índice de Importancia Familiar para cada parcela evaluada son: Euphorbiaceae, Combretaceae, Annonaceae en Parcela Pirayu 1, Euphorbiaceae y Combretaceae en Parcela Pirayu 2, Fabaceae, Phytolacaceae, Achatocarpaceae y Flacourtiaceae en Parcela rio Salado 1, Meliaceae, Lauraceae y Myrtaceae en Parcela Rio Salado 2, Myrtaceae en Parcela Patiño 1 y Patiño 2.

La única alternativa para recuperar y/o conservar los ecosistemas es iniciar los procesos de restauración de los mismos, a través de la implementación de un programa de recupe-

ración de la cuenca del lago Ypacarai a nivel país, además de la necesidad imperiosa del cumplimiento de las normativas ambientales por parte de los actores sociales afectados.

Ésta restauración se podría realizar con los dueños de las propiedades que aun conserven remanentes de unidades de vegetación originales, en especial los bosques de ribera, bosques en galería y sabana palmar de *Copernicia alba*. Al mismo tiempo es necesario incorporar un plan de ordenamiento ambiental, con un fuerte componente de concienciación, para facilitar la participación de los actores sociales involucrados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Rectorado de la UNA por los fondos proveídos para el desarrollo del proyecto; a los integrantes del grupo ecológico "taguató" de San Bernardino por la ayuda en los muestreos de ambientes acuáticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altieri, M. et Nicholls. (2000). Agroecología-Teoría y práctica para una agricultura sustentable. Serie textos básicos para la formación ambiental. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Red de Formación Ambiental para América Latina y el Caribe. México. 250 pp.

Alvis G., J. F. 2009. Análisis estructural de un bosque natural localizado en zona rural del Municipio de Popayan. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Vol 7, 1: 115-122

Díaz p. et al. 2010. Composición florística del bosque ribereño del Río San José, Reserva Forestal de Imataca, Estado Bolivar, Venezuela. Acta Bot. Venez. 33 (1): 1-21.

Flora del Conosur. 2013. En: http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/Flor

- Steviana, Vol. 6. 2014. Benítez et al. Análisis de los remanentes de comunidades vegetales de las cuencas del Rio Salado y del Arroyo Pirayú, en el área de influencia del Lago Ypacarai
 - aArgentina/FA.asp. Fecha de consulta: 2, 3, 4, 5 de diciembre del 2013.
- Flora del Paraguay. L. Ramella & P. Perret (editores). Conservatoire et Jardin Botaniques de la Ville de Geneve.
- González Romero, N. 1980. Clasificación Tecnico-Cientifica del Sistema "Lago Ypacarai". Investigación FACEN na 17.
- Instituto de Ciencias Básicas-Universidad Nacional de Asunción. 1985. Informe Técnico. Estudio Limnologico del Lago Ypacarai. 198 pp.
- Josse, C. et al. 2007. Sistemas Ecológicos de la Cuenca Amazónica de Perú y Bolivia-Clasificación y mapeo. NatureServe. Arlington, Virginia, EE UU . 92 pp.
- Lamprecht, H. 1990. Silvicultura en los trópicos. GTZ. República Federal Alemana.
- Ley N°3239/2007 de los Recursos Hídricos del Paraguay. En: http://www.seam.gov.py/images/stories/se am/legislacion/ley_de_recursos_hdricos.pd <u>f</u>. Fecha de consulta: 8 de marzo del 2013.
- Mereles, F. 2004. Los humedales del Paraguay: principales tipos de vegetación. IN: Salas, D. Mereles, F. & A. Yanosky (eds.), Humedales del Paraguay. Convención RAMSAR, Fundación Moisés Bertoni, Comité Nacional de Humedales, Proyecto WWF/01/PAR2. Departamento de Estado y Servicio de Pesca y Vida Silvestre de los Estados Unidos de América. 67-88 pp.
- Mereles, F. et al. 1991. Contribución al estudio de la vegetación del valle del Lago de Ypacarai II. Revista. Universidad Nacional de Asunción. Año 2- Número 2. 56-59 pp.
- Mori, S. A., B. M. Boom, A. M. de Carvalho and T. S. Dos Santos. 1983. Ecological importance of Myrtaceae in an eastern Brazilian wet forest forest. Biotropica 15: 68-70
- Recalde de Bordón et al. 1991. Relevamiento preliminar de la flora de la Cuenca del Rio

- Salado. Informe Final. San Lorenzo, Paraguay. 25 pp.
- Recalde de Bordón et al. 1993. Relevamiento de la vegetación alta de la sub cuenca del Rio Salado. Informe Final. San Lorenzo, Paraguay. 19 pp.
- Ritterbusch, B. 1988. Estudio Limnológico del Lago Ypacarai. Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral, 19 (1): 11-26.
- Sayre, R., E. Roca, G. Sedaghatkish, B.
 Young y S. Keel. 2000. Un Enfoque en la
 Naturaleza: Evaluaciones Ecológicas
 Rápidas. The Nature Conservancy. Edición en Español. Alright, Virginia. 196
 pp.
- TROPICOS. 2013. En: www.tropicos.org. Fecha de consulta: 3, 4 y 5 de diciembre del 2013.

Steviana, Vol. 6. 2014. Benítez et al. Análisis de los remanentes de comunidades vegetales de las cuencas del Rio Salado y del Arroyo Pirayú, en el área de influencia del Lago Ypacarai

Anexo A. Tabla 2. Familia, Genero y especie, Nombre común, Hábito, Usos, Hábitat, Referencia

Nº	Familia	Nombre Científico	N. Común	Hábito	Hábitat	Referencia
1	Achatocarpaceae	Achatocarpus praecox Griseb. var. praecox		árbol	bosque	MEOC
2	Achatocarpaceae	Achatocarpus sp.		árbol	bosque	MEOC
3	Alismataceae	Sagittaria montevidensis Cham. & Schltdl. ssp. montevidensis	saeta	hierba	humedal	MVera 4318
4	Amaranthaceae	Gomphrena sp.		hierba	humedal	MVera 4322
5	Amaranthaceae	Pfaffia sp.		hierba	humedal	MEOC
6	Annonaceae	Rollinia emarginata Schltdl.	aratiku'i	árbol	bosque	MVera 4273
7	Apiaceae	Eryngium ebracteatum Lam.		hierba	humedal	MEOC
8	Apiaceae	Hydrocotyle ranunculoides L. f.		hierba	humedal	MEOC
9	Apiaceae	Hydrocotyle sp.		hierba	humedal	MVera 4306
10	Apocynaceae	Rhabdadenia madida (Vell.) Miers		enr	humedal	MVera 4332
11	Apocynaceae	Tabernaemontana catharinensis A. DC.	sapirangy	árbol	bosque	MVera 4281
12	Araceae	Pistia stratiotes L.	repollito de agua	h acuática	humedal	MVera 4336
13	Arecaceae	Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart.	mbocajá	árbol	bosque	MEOC
14	Arecaceae	Copernicia alba Morong	karanda'y	árbol	palmar	MEOC
15	Asteraceae	Mikania sp.		enr	humedal	MVera 4337
16	Asteraceae	Vernonia sp.		enr	bosque	MVera 4274
17	Bignoniaceae	Dolichandra cynanchoides Cham.		enr	bosque	MVera 4271
18	Bignoniaceae	Fridericia sp. (flores amarillas)		enr	bosque	MVera 4294
19	Bignoniaceae	Fridericia sp. (flores lilas)		enr	bosque	MVera 4293
20	Bignoniaceae	Handroanthus heptaphyllus (Vell.) Mattos	tajy hü	árbol	bosque	MEOC
21	Bignoniaceae	Amphilophium crucigerum (L.) L.G. Lohmann	ka'i kygua	enr	bosque	MVera 4297
22	Boraginaceae	Cordia glabrata A. DC.	peterevy morotï	árbol	bosque	MVera 4298
23	Bromeliaceae	Pseudananas sagenarius (Arruda) Camargo		hierba	bosque	MVera 4369
24	Celtidaceae	Celtis ehrenbergiana (Klotzsch) Liebm.	juasy'y	árbol	bosque	MVera 4313
25	Ceratophyllaceae	Ceratophyllum sp.		hierba	humedal	MEOC
26	Combretaceae	Terminalia sp.		árbol	bosque	MEOC
27	Combretaceae	Terminalia sp.2		árbol	bosque	MEOC
28	Combretaceae	Terminalia triflora (Griseb.) Lillo		árbol	bosque	MVera 4272
29	Commelinaceae	Commelina erecta L.	santa lucía	hierba	bosque	MEOC
30	Convolvulaceae	Ipomoea carnea Jacq. ssp. fistulosa (Mart. ex Choisy) D.F.Austin	mandyju rä	arbusto	humedal	MEOC
31	Convolvulaceae	<i>Ipomoea</i> sp		enr	humedal	MEOC
32	Cucurbitaceae	Cayaponia bonariensis (Mill.) Mart.Crov.	tayuyá	enr	humedal	MEOC
33	Cyperaceae	Cyperus giganteus Vahl	pirí guasú	hierba	humedal	MVera 4323
34	Cyperaceae	Cyperus sp.		hierba	palmar	MVera 4292

	I	rayu, en et area de influencia det Lago .	рисити	I	I	
35	Cyperaceae	Eleocharis montana (Kunth) Roem. & Schult.		hierba	humedal	MVera 4340
36	Cyperaceae	Eleocharis sp.		hierba	palmar	MVera 4287
37	Euphorbiaceae	Actinostemon concolor (Spreng.) Müll. Arg.	yvyrá hü	árbol	bosque	MVera 4276
38	Euphorbiaceae	Sapium haematospermum Müll. Arg.	kurupika'y	árbol	bosque	MVera 4291
39	Euphorbiaceae	Euphorbia sp.		hierba	palmar	MVera 4285
40	Fabaceae	Acacia caven (Molina) Molina var. caven	aromita	árbol	humedal	MEOC
41	Fabaceae	Albizia niopoides (Spruce ex Benth.) Burkart	yvyrá ju,	árbol	bosque	MEOC
42	Fabaceae	Chloroleucon tenuiflorum (Benth.) Barneby & J.W. Grimes		árbol	bosque	MEOC
43	Fabaceae	Copaifera langsdorffii Desf. var. langsdorfii	kupa'y	árbol	bosque	MEOC
44	Fabaceae	Erythrina crista-galli L.	ceibo	árbol	humedal	MVera 4314
45	Fabaceae	Inga uraguensis Hook. & Arn.	inga guasú	árbol	bosque	MEOC
46	Fabaceae	Mimosa pigra L. var. pigra	jukeri	árbol	humedal	MVera 4339
47	Fabaceae	Peltophorum dubium (Spreng.) Taub.	yvyrá pytä	árbol	bosque	MEOC
48	Fabaceae	Senna occidentalis (L.) Link	taperyva hü	hierba	humedal	MVera 4315
49	Fabaceae	Sesbania virgata (Cav.) Pers.		árbol	humedal	MVera 4286
50	Lauraceae	Ocotea diospyrifolia (Meisn.) Mez		árbol	bosque	MEOC
51	Lauraceae	Ocotea sp.		árbol	bosque	MEOC
52	Lythraceae	Heimia salicifolia (Kunth) Link		sufrútice	palmar	MEOC
53	Malpighiaceae	sp.		enr	bosque	MVera 4277
54	Malvaceae	Hibiscus striatus Cav.		sufrutice	humedal	MVera 4325
55	Marantaceae	Thalia geniculata L.	peguajó	h acuática	humedal	MEOC
56	Meliaceae	Guarea kunthiana A. Juss.	yrupé rupa	árbol	bosque	MEOC
57	Meliaceae	Guarea sp.		árbol	bosque	MVera 4280
58	Meliaceae	Trichilia pallida Sw.	katigua morotí	árbol	bosque	MVera 4304
59	Moraceae	Sorocea sprucei (Baill.) J.F. Macbr. ssp. saxicola (Hassl.) C.C. Berg	_	árbol	bosque	MVera 4374
60	Myrtaceae	Eugenia pitanga (O. Berg) Kiaersk.		árbol	bosque	MEOC
61	Myrtaceae	Eugenia sp.		árbol	bosque	MVera 4305
62	Myrtaceae	Hexachlamys edulis (O. Berg) Kausel & D. Legrand	yva hai	árbol	bosque	MVera 4308
63	Myrtaceae	Plinia rivularis (Cambess.) Rotman	yvaporoity	árbol	bosque	MEOC
64	Onagraceae	Ludwigia sp1.		H acuática	humedal	MVera 4319
65	Onagraceae	Ludwigia sp2. (flores pequeñas)		H acuática	humedal	MVera 4320
66	Onagraceae	Ludwigia sp3.(flores blancas)		h acuática	humedal	MEOC
67	Orchidaceae	Campylocentrum neglectum (Rchb. f. & Warm.) Cogn.		hierba epífita	bosque	MVera 4370
68	Oxalidaceae	Oxalis sp.		hierba	bosque	MVera 4284
69	Passifloraceae	Passiflora sp.	mburucuja'i	trepadora	humedal	MVera 4331
70	Phytolaccaceae	Seguieria paraguayensis Morong	joavy guasú	árbol	bosque	MVera 4300
•						

Steviana, Vol. 6. 2014. Benítez et al. Análisis de los remanentes de comunidades vegetales de las cuencas del Rio Salado y del Arroyo Pirayú, en el área de influencia del Lago Ypacarai

71	Plantaginaceae	Plantago major L.	llantén	hierba	palmar	MEOC
72	Poaceae	Panicum sp.		h acuática	humedal	MVera 4324
73	Poaceae	Paspalum rufum Nees ex Steud.		hierba	palmar	MVera 4289
74	Polygonaceae	Polygonum hispidum Kunth	ka'a tai guasu	hierba	humedal	MEOC
75	Polygonaceae	Polygonum punctatum Elliott	ka'a tai	hierba	humedal	MVera 4321
76	Pontederiaceae	Eichhornia azurea (Sw.) Kunth	aguapé purua	h acuática	humedal	MVera 4328
77	Pontederiaceae	Eichhornia crassipes (Mart.) Solms	aguapé	h acuática	humedal	MVera 4317
78	Pontederiaceae	Pontederia cordata L. var. cordata		h acuática	humedal	MVera 4329
79	Portulacaceae	Portulaca sp.		hierba	palmar	MVera 4290
80	Rosaceae	Prunus sp.		árbol	bosque	MEOC
81	Rubiaceae	Cephalanthus glabratus (Spreng.) K. Schum.		arbusto	humedal	MVera 4334
82	Rubiaceae	Richardia sp.		hierba	humedal	MVera 4341
83	Rutaceae	Helietta apiculata Benth.	yvyrá ovi	árbol	bosque	MVera 4371
84	Rutaceae	Zanthoxylum petiolare A. StHil. & Tul.	naranjillo	árbol	bosque	MEOC
85	Rutaceae	Zanthoxylum fagara (L.)Sarg.	kuraturä	árbol	bosque	MEOC
86	Salicaceae	Casearia sylvestris Sw. var. sylvestris	burro ka'a	árbol	bosque	MVera 4296
87	Salicaceae	Xylosma venosa N.E. Br.		árbol	humedal	MEOC
88	Salviniaceae	Salvinia sp.		H acuática	humedal	MVera 4335
89	Sapotaceae	Chrysophyllum marginatum (Hook. & Arn.) Radlk. ssp. marginatum	pykasu rembi'u	árbol	bosque	MEOC
90	Sapotaceae	Sideroxylon obtusifolium (Roem. & Schult.) T.D. Penn.	guajayvi rai	árbol	bosque	MEOC
91	Smilacaceae	Smilax sp.	ju'a peká	enr	bosque	MVera 4275
92	Solanaceae	Cestrum laevigatum Schltdl.		árbol	bosque	MVera 4279
93	Solanaceae	Petunia integrifolia (Hook.) Schinz & Thell. ssp. integrifolia	petunia	hierba	palmar	MVera 4295
94	Solanaceae	Solanum glaucophyllum Desf.	duraznillo	arbusto	humedal	MVera 4326
95	Solanaceae	Solanum sisymbriifolium Lam.	ñuatï pytä	arbusto	humedal	MEOC
96	Solanaceae	Solanum sp.		arbusto	humedal	MVera 4327
97	Sterculiaceae	Byttneria scabra L.		arbusto	humedal	MVera 4330
98	Tiliaceae	Luehea divaricata Mart.	ka'a ovetí	árbol	bosque	MEOC
99	Typhaceae	Typha sp.	totora	h acuática	humedal	MVera 4333
100	Vitaceae	Cissus palmata Poir.		enr	humedal	MVera 4338

Referencias: Enr: enredadera; h acuática: hierba acuática; MVera: María Vera; MEOC: material estéril observado en el campo

Steviana, Vol. 6. 2014. Benítez et al. Análisis de los remanentes de comunidades vegetales de las cuencas del Rio Salado y del Arroyo Pirayú, en el área de influencia del Lago Ypacarai Anexo B. Figuras de los diferentes tipos de comunidades observadas en los sitios de muestreo.



Figura 2. Bosque en galeria de altura media



Figura 4. Sabana palmar de Copernicia alba

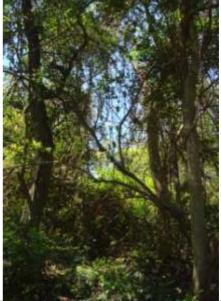


Figura 3. Bosque en galería de altura media



Figura 5. Bosque alto en galería (Parcela Río Salado 1)



Figura 6. Bosque en galería de altura media (Parcela Río Salado 2)



Figura 7. Bosque ribereño de altura media (Parcela Patiño 1)



Figura 8. Bosque alto ribereño (Parcela Patiño 2)



Figura 9. Camalotales (*Eichhornia crassipes* y *E. azurea*)



Figura 10. Camalotales (*Eichhornia crassipes* y *E. azurea*) y en el fondo totorales (*Typha spp*)



Figura 11. Camalotales (*Eichhornia azurea y E. crassipes*), en el fondo Pirizales (*Cyperus giganteus*)



Figura 12. Peguajósales (Thalia geniculata)

Anexo C.

Tabla 3. Familia, especies, Abundancia y dominancia absoluta y relativa. Bosque en galería de altura media (Parcela Arroyo Pirayú 1)

Nº	Familia	Especie	A. A.	A. R.	D. A.	D. R.
1	Euphorbiaceae	Actinostemon concolor	23	58,97	0,143	42,621
2	Annonaceae	Rollinia emarginata	4	10,26	0,025	7,603
3	Combretaceae	Terminalia triflora	4	10,26	0,036	10,825
4	Celtidaceae	Celtis ehrenbergiana	2	5,13	0,007	2,131
5	Moraceae	Sorocea sprucei ssp saxicola	2	5,13	0,020	5,916
6	Combretaceae	Terminalia sp.	2	5,13	0,031	9,400
7	Fabaceae	Inga uraguensis	1	2,56	0,068	20,343
8	Apocynaceae	Tabernaemontana catharinensis	1	2,56	0,004	1,161
		Total general	39	100	0,335	100

Tabla 4. Familia, Índice de Valor de Importancia Familiar. Bosque en galería de altura media (Parcela Arroyo Pirayú 1)

Nº	Familia	N° de Ind x Fi	Nº de Sp. x Fi	DvRFi	DRFi	IVIFi
1	Euphorbiaceae	23	1	12,5	58,97	71,47
2	Combretaceae	6	2	25	15,38	40,38
3	Annonaceae	4	1	12,5	10,26	22,76
4	Moraceae	2	1	12,5	5,13	17,63
5	Celtidaceae	2	1	12,5	5,13	17,63
6	Apocynaceae	1	1	12,5	2,56	15,06
7	Fabaceae	1	1	12,5	2,56	15,06
	Total general	39	8	100	100	200

Tabla 5. Familia, especies, Abundancia y dominancia absoluta y relativa. Bosque en galería de altura media (Parcela Arroyo Pirayú 2)

Nº	Familia	Especie	A. A.	A. R.	D. A.	D. R.
1	Euphorbiaceae	Actinostemon concolor	11	57,89	0,269	51,518
2	Combretaceae	Terminalia sp	2	10,53	0,106	20,408
3	Arecaceae	Acrocomia aculeata	1	5,26	0,034	6,453
4	Myrtaceae	Eugenia sp	1	5,26	0,001	0,138
5	Meliaceae	Guarea sp	1	5,26	0,006	1,212
6	Fabaceae	Peltophorum dubium	1	5,26	0,050	9,532
7	Moraceae	Sorocea sprucei ssp saxicola	1	5,26	0,045	8,592
8	Combretaceae	Terminalia triflora	1	5,26	0,011	2,148
		Total general	19	100	0,521	100

Tabla 6. Familia, Índice de Valor de Importancia Familiar. Bosque en galería de altura media (Parcela Arroyo Pirayú 2)

-,						
Nº	Familia	Nº de Ind x Fi	Nº de Sp. x Fi	DvRFi	DRFi	IVIFi
1	Euphorbiaceae	11	1	57,89	12,5	70,39
2	Combretaceae	3	2	15,79	25	40,79
3	Arecaceae	1	1	5,26	12,5	17,76
4	Fabaceae	1	1	5,26	12,5	17,76
5	Meliaceae	1	1	5,26	12,5	17,76
6	Moraceae	1	1	5,26	12,5	17,76
7	Myrtaceae	1	1	5,26	12,5	17,76
	Total	19	8	100,00	100	200,00

Tabla 7. Familia, especies, Abundancia y dominancia absoluta y relativa. Sabana palmar de *Copernicia alba* (Parcela Palmar 1)

Nº	Familia	Especie	A. A.	A. R.	D. A.	D. R.
1	Arecaceae	Copernicia alba	21	100	0,834	100

Tabla 8. Familia, Índice de Valor de Importancia Familiar. Sabana palmar de Copernicia alba (Parcela Palmar 1)

Nº	Familias	Nº de Ind x Fi	Nº de Sp. x Fi	DvRFi	DRFi	IVIFi
1	Arecaceae	21	1	100	100	200

Tabla 9. Familia, especies, Abundancia y dominancia absoluta y relativa. Sabana palmar de *Copernicia alba* (Parcela Palmar 2)

Nº	Familia	Especie	A. A.	A. R.	D. A.	D. R.
1	Arecaceae	Copernicia alba	13	100	0,603	100

Tabla 10. Familia, Índice de Valor de Importancia Familiar. Sabana palmar de Copernicia alba (Parcela Palmar 2)

Nº	Familias	Nº de Ind x Fi	Nº de Sp. x Fi	DvRFi	DRFi	IVIFi
1	Arecaceae	13	1	100	100	200

Tabla 11. Familia, especies, Abundancia absoluta y relativa del Bosque alto en galería (Parcela Río Salado 1)

\mathbf{N}°	Familia	Especie	A.A.	A. R.	D. A.	D. R.
1	Phytolacaceae	Seguieria paraguayensis	3	15,79	0,204	25,10
2	Achatocarpaceae	Achatocarpus praecox var. praecox	2	10,53	0,012	1,50
3	Fabaceae	Albizia niopoides	2	10,53	0,141	17,46
4	Flacourtiaceae	Cassearia sylvestris	2	10,53	0,004	0,57
5	Arecaceae	Acrocomia aculeata	1	5,26	0,064	7,93
6	Fabaceae	Chloroleucon tenuiflorum	1	5,26	0,318	39,16
7	Myrtaceae	Eugenia sp.	1	5,26	0,001	0,22
8	Rosaceae	Prunus sp.	1	5,26	0,010	1,34
9	Euphorbiaceae	Sapium haematospermum	1	5,26	0,027	3,41
10	Indet. 1	Sp 1	1	5,26	0,001	0,13
11	Apocynaceae	Tabernaemontana catharinensis	1	5,26	0,005	0,69
12	Combretaceae	Terminalia sp	1	5,26	0,008	1,07
13	Meliaceae	Trichilia pallida	1	5,26	0,001	0,12
14	Rutaceae	Zanthoxyllum petiolare	1	5,26	0,010	1,30
		Total general	19	100,00	0,813	100,00

Tabla 12. Familia, Índice de Valor de Importancia Familiar. Bosque alto en galería (Parcela Río Salado 1)

Nº	Familias	Nº de Ind x Fi	Nº de Sp. x Fi	DvRFi	DRFi	IVIFi
1	Fabaceae	3	2	15,78	14,28	30,07
2	Phytolacaceae	3	1	15,78	7,14	22,93
3	Achatocarpaceae	2	1	10,52	7,14	17,66
4	Flacourtiaceae	2	1	10,52	7,14	17,66
5	Apocynaceae	1	1	5,26	7,14	12,40
6	Arecaceae	1	1	5,26	7,14	12,40
7	Combretaceae	1	1	5,26	7,14	12,40
8	Euphorbiaceae	1	1	5,26	7,14	12,40
9	Indet. 1	1	1	5,26	7,14	12,40
10	Meliaceae	1	1	5,26	7,14	12,40
11	Myrthaceae	1	1	5,26	7,14	12,40
12	Rosaceae	1	1	5,26	7,14	12,40
13	Rutaceae	1	1	5,26	7,14	12,40
	Total	19	14	100	100	200

Tabla 13. Familia, especies, Abundancia y dominancia absoluta y relativa. Bosque en galería de altura media (Parcela Río Salado 2)

N°	Familia	Especie	A. A.	A. R.	D. A.	D. R.
1	Lauraceae	Ocotea diospyrifolia	5	22,73	0,146	60,06
2	Meliaceae	Guarea kunthziana	4	18,18	0,007	2,76
3	Myrtaceae	Eugenia sp	3	13,64	0,006	2,28
4	Sapotaceae	Chrysophyllum marginatum ssp marginatum	2	9,09	0,012	4,74
5	Meliaceae	Guarea sp	2	9,09	0,001	0,50
6	Annonaceae	Rollinia emarginata	2	9,09	0,001	0,51
7	Achatocarpaceae	Achatocarpus praexox var praecox	1	4,55	0,003	1,18
8	Flacourtiaceae	Cassearia sylvestris	1	4,55	0,002	0,74
9	Celtidaceae	Celtis ehrenbergiana	1	4,55	0,002	0,64
10	Fabaceae	Chloroleucon tenuiflorum	1	4,55	0,064	26,58
		Total general	22	100	0,243	100,0

Tabla 14. Familia, Índice de Valor de Importancia Familiar. Bosque en galería de altura media (Parcela Río Salado 2)

Nº	Familias	N° de Ind x Fi	Nº de Sp. x Fi	DvRFi	DRFi	IVIFi
1	Meliaceae	6	2	27,27	20,00	47,27
2	Lauraceae	5	1	22,72	10,00	32,72
3	Myrtaceae	3	1	13,63	10,00	23,63
4	Anonaceae	2	1	9,09	10,00	19,09
5	Sapotaceae	2	1	9,09	10,00	19,09
6	Achatocarpaceae	1	1	4,54	10,00	14,54
7	Flacourtiaceae	1	1	4,54	10,00	14,54
8	Fabaceae	1	1	4,54	10,00	14,54
9	Ulmaceae	1	1	4,54	10,00	14,54
	Total	22	10	100	100,00	200

Steviana, Vol. 6. 2014. Benítez et al. Análisis de los remanentes de comunidades vegetales de las cuencas del Rio Salado y del Arroyo Pirayú, en el área de influencia del Lago Ypacarai

Tabla 15. Familia, especies, Abundancia y Dominancia absoluta y relativa. Bosque ribereño de altura media (Parcela Patiño 1)

N^o	Familia	Especie	A. A.	A. R.	D. A.	D. R.
1	Myrtaceae	Plinia rivularis	5	22,73	0,059	14,079
2	Achatocarpaceae	Achatocarpus sp	4	18,18	0,097	23,027
3	Lauraceae	Ocotea sp	4	18,18	0,076	18,191
4	Arecaceae	Acrocomia aculeata	2	9,09	0,057	13,584
5	Sapotaceae	Chrysophyllum marginatum ssp marginatum	2	9,09	0,010	2,437
6	Apocynaceae	Tabernaemontana catharinensis	2	9,09	0,052	12,328
7	Myrtaceae	Eugenia pitanga	1	4,55	0,011	2,597
8	Myrtaceae	Hexaclamys edulis	1	4,55	0,054	12,753
9	Rutaceae	Zanthoxylum fagara	1	4,55	0,004	1,003
		Total general	22	100,00	0,420	100

Tabla 16. Familia, Índice de Valor de Importancia Familiar. Bosque ribereño de altura media (Parcela Patiño 1)

Nº	Familias	Nº de Ind x Fi	Nº de Sp. x Fi	DvRFi	DRFi	IVIFi
1	Myrtaceae	7	3	31,82	33,33	65,15
2	Achatocarpaceae	4	1	18,18	11,11	29,29
3	Lauraceae	4	1	18,18	11,11	29,29
4	Apocynaceae	2	1	9,09	11,11	20,20
5	Arecaceae	2	1	9,09	11,11	20,20
6	Sapotaceae	2	1	9,09	11,11	20,20
7	Rutaceae	1	1	4,55	11,11	15,66
	Total general	22	9	100	100	200

Tabla 17. Familia, especies, Abundancia y Dominancia absoluta y relativa. Bosque alto ribereño (Parcela Patiño 2)

Nº	Familia	Especie	A. A.	A. R.	D. A.	D. R.
1	Myrtaceae	Plinia rivularis	11	40,74	0,121	16,491
2	Achatocarpaceae	Achatocarpus praecox var praecox	3	11,11	0,019	2,550
3	Myrtaceae	Eugenia sp	2	7,41	0,021	2,861
4	Phytolaccaceae	Seguieria paraguayensis	2	7,41	0,072	9,835
5	Sapotaceae	Sideroxylon obtusifolium	2	7,41	0,058	7,856
6	Fabaceae	Albizia niopoides	1	3,70	0,119	16,174
7	Sapotaceae	Chrysophyllum marginatum ssp marginatum	1	3,70	0,018	2,401
8	Fabaceae	Copaifera langsdorfii var langsdorfii	1	3,70	0,045	6,113
9	Tiliaceae	Luehea divaricata	1	3,70	0,055	7,486
10	Indet. 1	sp 1	1	3,70	0,006	0,754
11	Indet. 2	sp 2	1	3,70	0,083	11,306
12	Bignoniaceae	Handroanthus heptaphyllus	1	3,70	0,119	16,174
		Total general	27	100,00	0,733	100,000

Tabla 18. Familia, Índice de Valor de Importancia Familiar. Bosque alto ribereño (Parcela Patiño 2)

Nº	Familias	Nº de Ind x Fi	Nº de Sp. x Fi	DvRFi	DRFi	IVIFi
	Myrthaceae	13	2	48,14	16,66	64,81
	Sapotaceae	3	2	11,11	16,66	27,77
	Fabaceae	2	2	7,40	16,66	24,07
	Achatocarpaceae	3	1	11,11	8,33	19,44
	Phytolacaceae	2	1	7,40	8,33	15,74
	Bignoniaceae	1	1	3,70	8,33	12,03
	Sp 1	1	1	3,70	8,33	12,03
	Sp 2	1	1	3,70	8,33	12,03
	Tiliaceae	1	1	3,70	8,33	12,03
	Total general	27	12	100	100	200

Guía para Autores

Objetivos y alcance de la revista

Steviana es una publicación de investigación primaria que cubre todas las líneas de trabajo dentro del área de la Botánica. Los artículos publicados en *Steviana*, serán de interés para especialistas dentro de este campo. Los resultados y conclusiones principales no deben haber sido publicados en ningún otro lugar.

Responsabilidades del Cuerpo Editorial

Las decisiones editoriales en *Steviana* son tomadas por el Cuerpo Editorial – científicos de un amplio espectro de la comunidad científica – quienes manejarán el proceso de revisión por pares y decidirán qué manuscritos deben ser publicados.

Formato de los artículos

Steviana publica investigaciones originales (artículos) y revisiones (reviews). Los autores a escribir de manera concisa y según las siguientes pautas:

- Los artículos originales no deben sobrepasar las 15 páginas. El texto principal (sin incluir el resumen, los métodos, las referencias y las leyendas al pie de las figuras) no debe tener más de 4500 palabras. La extensión máxima del título es de 15 palabras. El resumen no debe tener más de 150 palabras ni contener referencias.
- El texto principal de un Artículo original debe seguir los siguientes delineamientos: Título, Autores, Filiación de autores (superíndice numerado), Titulo seguido de un resumen, Palabras claves, Titulo (inglés) seguidos de resumen en inglés, Palabras claves en ingles, Introducción que se explaye sobre los antecedentes del trabajo (alguna coincidencia con el Resumen es aceptable), seguido de secciones con los encabezados Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones y Referencias. Las secciones pueden dividirse con subtítulos temáticos; la Discusión debe ser **concisa** y no puede contener subtítulos. La sección de Métodos debe limitarse a 1500 palabras. Los pies de figura están limitados a 350 palabras.
- Los artículos de revisión serán aceptados cuando los mismos sean encomendados por el Cuerpo Editorial a
 profesionales competentes en el tema y seguirán las normas de presentación de un artículo científico, substituyendo sin embargo metodología, resultados y discusión, por el desarrollo comentado de la revisión, sin
 alterar las demás partes.
- Los artículos son revisados por pares e incluyen fechas de recepción y aceptación. Los autores deben proveer una declaración sobre conflictos de intereses dentro del archivo del manuscrito.

Información general para la presentación de manuscritos

Las solicitudes incluyen una carta de presentación, un archivo de texto manuscrito, archivos de figuras individuales y archivos opcionales de Información Suplementaria. Los autores deben notar que solamente los siguientes tipos de archivos pueden ser levantados como textos y figuras para artículos:

Para texto: .txt (LaTex), .doc, .docx, .tex (LaTeX), odt.

Para figuras: .eps, .tiff, .jpg, .png

Si su artículo no incluye fórmulas, le alentamos a que lo presente en .txt, .odt, .doc o .docx en lugar de en .tex.

Las abreviaciones, particularmente aquellas que no sean estándar, deben también ser mantenidas al mínimo. Cuando sea inevitable, las abreviaciones deben ser definidas en el texto o leyendas en su primera utilización, y deben ser usadas exclusivamente desde ese momento. La introducción, las justificaciones y las conclusiones principales del estudio deben estar claramente explicadas.

Carta de presentación

Los autores deben proveer una carta de presentación que incluya su afiliación y su información de contacto. Deben explicar brevemente por qué el trabajo es considerado como apropiado para *Steviana*.

Formato de los manuscritos

En la mayoría de los casos no imponemos límites estrictos a la extensión en palabras y páginas, sin embargo alentamos a los autores a que escriban de manera concisa y les sugerimos observar las pautas siguientes:

- *Microsoft Word/LibreOffice Writer* El archivo manuscrito debe tener un formato de interlineado doble y una sola columna, sin justificación. Las páginas deben ser numeradas al pie con números arábigos.
- TeX/LaTeX los autores que presenten archivos LaTeX pueden utilizar cualquiera de los tipos estándar de archivos; como article.cls, revtext.cls o amsart.cls. Para la inclusión de gráficos, recomendamos graphicx.sty. Las referencias deben ser incluidas dentro del archivo del manuscrito. Como precaución final, los autores deben asegurarse de que el archivo .tex completo compile exitosamente en su propio sistema sin errores ni advertencias, antes del envío.

Nomenclatura y abreviaciones químicas y biológicas

Las estructuras moleculares son identificadas por números arábigos en negrita que les son asignados en orden de presentación en el texto. Una vez identificadas en el texto principal o en una figura los compuestos deben ser llamados por su nombre, por una abreviación definida, o por el número arábigo en negrita (mientras el compuesto sea nombrado consistentemente de una de estas tres formas). Siempre que sea posible, los autores deben referirse a los compuestos químicos y las biomoléculas usando la nomenclatura sistemática, preferentemente utilizando IUPAC.

Materiales v Métodos

Los autores deben limitar la sección de Métodos a 1500 palabras y deben asegurarse de que su sección de Métodos incluya datos experimentales y de caracterización necesarios para que otros en el área reproduzcan su trabajo. Las descripciones de protocolos estándar y procedimientos experimentales deben ser dadas. Los autores deben describir el protocolo experimental en detalle, refiriéndose a las cantidades de los reactivos en paréntesis, cuando sea posible (ej.: 1.03 g, 0.100 mmol). La masa aislada y el rendimiento porcentual deben ser reportados al final de cada protocolo.

Pautas estadísticas

Cada artículo que contiene pruebas estadísticas debe especificar el nombre del test estadístico, el valor n para cada análisis estadístico, las comparaciones de interés, una justificación para el uso de ese test (incluyendo, por ejemplo, una discusión de la normalidad de los datos cuando el test es apropiado sólo para datos normales), el nivel alfa para todos los tests, si los tests tuvieron una o dos colas, y el valor P real para cada test (no meramente "significativo" o "P < 0.05"). Debe ser claro qué test estadístico fue utilizado para generar cada valor P. El uso de la palabra "significativo" debe estar siempre acompañado de un valor P; de lo contrario, utilice "sustancial", "considerable", etc.

Los conjuntos de datos deben ser resumidos con estadística descriptiva, la cual debe incluir el valor n para cada conjunto de datos, una medida de tendencia central claramente catalogada (como la media o la mediana), y una medida de variabilidad claramente catalogada (como desviación estándar o rango). Los rangos son más apropiados que las desviaciones estándar o errores estándar para conjuntos pequeños de datos. Los gráficos deben incluir **barras de error** claramente señaladas. Los autores deben declarar si un número que sigue a un signo \pm es un error estándar (SEM) o una desviación estándar (SD).

Caracterización de materiales químicos y biomoleculares

Los autores deben proveer datos adecuados para sostener su asignación de identidad y pureza para cada nuevo compuesto descripto en el manuscrito. Los autores deben proveer una declaración confirmando la fuente, identidad y pureza de compuestos conocidos que sean centrales al estudio científico, incluso si son comprados o resintetizados utilizando métodos publicados.

Referencias

Las referencias serán electrónicamente vinculadas a bases de datos externas cuando sea posible, lo que hace que la corrección del formato sea esencial. Sólo artículos que hayan sido publicados o aceptados por una publicación identificada o un servidor de pre-impresiones reconocido deben incluirse; las pre-impresiones de artículos aceptados en la lista de referencias deben ser presentadas con el manuscrito. Los resúmenes publicados de conferencias y las patentes numeradas pueden incluirse en la lista de referencias. En cuanto a las referencias bibliográficas, todas las publicaciones deberán seguir el estilo: *Chicago Manual of Style (author-date)*. Ejemplos:

Libro:

NRC (National Research Council). 1996. *Understanding risk: Informing decisions in a democratic society*. Washington, D.C: National Academic Press.

Sección de un libro:

Blancas, L, D. M Arias, y N. C Ellstrand. 2002. «Patterns of genetic diversity in sympatric and allopatric populations of maize and its wild relative teosinte in Mexico: Evidence for hybridization». En *Scientific methods workshop: Ecological and agronomic consequences of gene flow from transgenic crops to wild relatives*, ed. A. A Snow, 31–38. Meeting Proceedings. Columbus, Ohio.

Publicación en revistacientífica:

Chavez, Nancy, Jose Flores, Joseph Martin, Norman Ellstrand, Roberto Guadagnuolo, Sylvia Heredia, y Shana Welles. 2012. «Maize x Teosinte Hybrid Cobs Do Not Prevent Crop Gene Introgression». *Economic Botany* 66 (2): 132–137. doi:10.1007/s12231-012-9195-2.

Tesis:

Wilkes, H. G. 1967. «Teosinte: The closest relative of maize». Ph.D. thesis, Cambridge, Massachusetts: Harvard University.

Página web:

Kew Royal Botanic Gardens. 2011. «Kew Economic Botany Collection». *Kew Royal Botanic Gardens*. http://apps.kew.org/ecbot/search.

Pies de figura

Las tablas y figuras deberás ser numeradas secuencialmente en el texto. Los pies de figura comienzan con un breve título para toda la figura y continúan con una descripción breve de lo que se observa en cada panel en secuencia y los símbolos usados. Cada leyenda debe totalizar no más de 350 palabras.

Tablas

Presente sus tablas al final de su documento de texto (en Word o TeX/LaTeX). Las tablas que incluyan análisis estadísticos de datos deben describir sus estándares de análisis de error y rangos en un pie de tabla.

Ecuaciones

Las ecuaciones y las expresiones matemáticas deben ser provistas en el texto principal del artículo. Las ecuaciones que son citadas en el texto se identifican con números entre paréntesis, tales como (1), y son citadas en el manuscrito como "ecuación (1)".

Si su manuscrito estará en formato .docx y contiene ecuaciones, debe asegurarse de que sus ecuaciones sean editables cuando el archivo entre a producción.

Figuras para la publicación

Prepare figuras que quepan en una (87 mm de ancho) o dos columnas (180 mm de ancho). Los autores son responsables de la obtención de permisos para la publicación de cualquier figura o ilustración que estén protegidas por derechos de autor, incluyendo figuras publicadas en otros lugares y fotografías tomadas por fotógrafos profesionales. La revista no puede publicar imágenes descargadas de internet sin los permisos correspondientes.

Gráficos, tablas v esquemas

Todos los gráficos y los esquemas deben ser proveídos en un formato vectorial, tal como EPS (preferido), y deben ser guardados o exportados como tales directamente desde la aplicación en la que fueron hechos. No deben ser guardados como mapas de bits, jpegs u otros tipos de archivo no vectoriales a menos que sea estrictamente necesario.

Imágenes fotográficas y de mapas de bits

Todas las imágenes fotográficas y de mapas de bits deben ser enviadas en formato TIFF (preferido) o JPEG a 300 DPI de ser posible. No presente archivos de Word o PowerPoint con imágenes colocadas.

Estructuras químicas

Las estructuras químicas deben producirse con *ChemDraw* o un programa similar. A todos los compuestos químicos se les debe asignar un número arábigo en negrita de acuerdo al orden en el que son presentados en el texto manuscrito.

Políticas de presentación

La presentación a *Steviana* se interpreta como que el manuscrito no ha sido ya publicado en ninguna otra parte. Si un trabajo similar o relacionado se ha publicado o presentado en algún otro lugar, los autores deben proveer una copia con el artículo presentado. Los autores no pueden presentar el artículo en ningún otro lugar mientras esté puesto a consideración en *Steviana*.

La afiliación primaria para cada autor debe ser la institución en donde ha hecho **la mayor parte de su trabajo.** Si el autor se ha mudado posteriormente, la dirección actual también se puede mencionar.

Steviana se reserva el derecho de rechazar un artículo incluso después de que haya sido aceptado si se vuelve patente la existencia de serios problemas con el contenido científico o con violaciones de nuestras políticas de publicación.

Revisión por pares

El trabajo será recepcionado por el Asistente de edición, quien remitirá a los miembros del Cuerpo Editorial. Los trabajos podrán ser revisados por uno o más miembros del Cuerpo editorial si lo creyere conveniente. El autor correspondiente será notificado por email cuando un Miembro del Comité Científico decida si el artículo ha de ser revisado o no. En este momento el Miembro del Comité Científico tiene dos opciones:

- El Cuerpo Editorial puede elegir contactar a uno o más árbitro(s) no asociado(s) con Steviana para conducir la revisión por pares.
- El Cuerpo Editorial puede elegir conducir la revisión por pares, él mismo, o por los miembros del Comité científico si necesario fuere, a base de su propia experiencia y pericia.

Luego de la consideración el Miembro del Comité Científico tomará una de las siguientes decisiones:

• Aceptar el artículo, con o sin revisiones editoriales.

- Invitar a los autores a revisar su manuscrito para dirigirse a inquietudes específicas antes de que sea tomada una decisión final.
- Rechazar el artículo, indicando a los autores que mayor trabajo podría justificar un nuevo intento de publicación.
- Rechazar el artículo por completo.

Durante la etapa de presentación, los autores pueden indicar un número limitado de científicos que no deben revisar el artículo. Los científicos excluidos deben ser identificados por su nombre. Los autores también pueden sugerir potenciales revisores; estas sugerencias suelen ser de ayuda, aunque no siempre son seguidas. La identidad de los árbitros no es revelada a los autores, excepto a solicitud de los árbitros.

Decisión post-revisión

En los casos en que los árbitros hayan solicitado cambios bien definidos al manuscrito que no parezcan requerir experimentación extensiva adicional, el Cuerpo Editorial puede solicitar un manuscrito revisado que responda a las inquietudes de los árbitros. La carta de decisión especificará un plazo, y las revisiones que sean devueltas dentro de este periodo retendrán la fecha original de su presentación.

En los casos en que las inquietudes de los árbitros que tengan un mayor alcance, el Cuerpo Editorial normalmente rechazará el manuscrito. Si el Miembro delComité siente que el trabajo es de interés potencial para la revista, sin embargo, podrá expresar interés en que el artículo vuelva a ser presentado.

Presentación final y aceptación

Cuando todas las recomendaciones editoriales se hayan resuelto, el artículo es finalmente aceptado. La fecha de recepción es la fecha en la que los editores recibieron el manuscrito original (o si había sido previamente rechazado, la fecha en la que recibieron el manuscrito por segunda vez). La fecha de aceptación es aquella en la que el Cuerpo Editorial envía la carta de aceptación.

Selección de árbitros

La selección de árbitros es crítica para el proceso de revisión, y el Cuerpo Editorial debe basar su decisión en varios factores, incluyendo pericia, recomendaciones específicas, y experiencia previa.

Redacción de la revisión

Al redactar la revisión, los árbitros deben mantener en mente que están evaluando el manuscrito en términos de su solidez técnica. De manera a permitir decisiones rápidas y fáciles hemos desarrollado una plantilla de base técnica. El proceso de revisión responderá las siguientes preguntas:

- ¿Es el artículo técnicamente sólido?
- ¿Están las afirmaciones basadas en evidencias? Si no, ¿qué mayor evidencia es necesaria?
- ¿Son las afirmaciones totalmente respaldadas por los datos experimentales?
- ¿Las afirmaciones son apropiadamente discutidas en el contexto de la literatura previa?
- Si el manuscrito es inaceptable en su forma presente, ¿el estudio parece suficientemente prometedor como para que los autores sean alentados a considerar una segunda presentación en el futuro?

Además de responder las preguntas anteriores, los árbitros pueden proveer mayor información, incluyendo comentarios que pueden contestar a lo siguiente:

- ¿Está el manuscrito claramente redactado? Si no, ¿cómo puede hacerse más accesible?
- ¿Se han hecho justicia los autores sin sobrevalorar sus afirmaciones?
- ¿Han sido justos en el tratamiento de la literatura previa?
- ¿Han proveído suficientes detalles metodológicos como para que el experimento pueda ser reproducido?
- ¿Es sólido el análisis estadístico de los datos?
- ¿Existe alguna preocupación ética especial con respecto al uso de sujetos humanos o animales?

Confidencialidad

Solicitamos a todos los Miembros del Cuerpo Editorial y a los árbitros externos que **traten el proceso de revisión de manera estrictamente confidencial**, y que no discutan el manuscrito con nadie no directamente involucrado en la revisión.

Plazos

Pedimos a los árbitros que respondan con celeridad (dentro de una semana de haber recibido un manuscrito, aunque esto puede ser extendido o disminuido por acuerdo previo). Si los árbitros prevén un retraso mayor, les solicitamos que notifiquen al Cuerpo Editorial de manera que podamos mantener a los autores informados y, cuando sea necesario, encontrar árbitros alternativos.

Anonimato

No revelamos la identidad de los árbitros a los autores o a otros árbitros, excepto cuando los árbitros soliciten específicamente ser identificados.

Edición de los reportes de los árbitros

Como una cuestión de política, no suprimimos los reportes de los árbitros; cualquier comentario dirigido a los autores es transmitido, sin perjuicio de lo que nosotros pudiéramos pensar del contenido. Solicitamos a los árbitros que eviten decir nada que pudiera causar ofensa innecesaria; en cambio, los autores deben reconocer que las críticas no son necesariamente injustas simplemente porque estén expresadas en un lenguaje claro, conciso y directo.

Conflictos de intereses

Nuestra política es evitar Miembros del Cuerpo Editorial y árbitros que los autores hayan excluido, por cualquier razón. También tratamos de evitar a árbitros que tienen colaboraciones recientes o en curso con los autores, que hayan comentado en borradores del manuscrito, que estén en directa competencia para publicar el mismo descubrimiento, que sepamos que tienen una historia de disputa con los autores, o que tengan un interés financiero en el resultado.

Información de contacto

Para preguntas editoriales generales relacionadas con *Steviana*, incluyendo consultas sobre la presentación de manuscritos, y para consultas relacionadas con la guía para autores, por favor contacte con dfernandez@facen.una.py

Observación:

La Guía para los autores, in extenso, está disponible en la web: www.facen.una.py

A partir del Vol. 7 los artículos remitidos deberán ser presentados rigurosamente en el formato de la revista y seguir exactamente la guía para autores.

Steviana, Vol. 6, 2014

Formas de adquisición: Por canje e intercambio con instituciones oficiales y privadas

Para canjes e intercambios dirigirse a:
Bonifacia Benítez de Bertoni
e-mail: bbenbert@facen.una.py
Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales-Herbario FACEN
Dirección Postal: 1039
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UNA
Campus Universitario, San Lorenzo-Paraguay

Steviana, Vol. 6, 2014

PáginasContenido5 - 12-Propiedad antichagasica in vitro e in vi

5 - 12 - Propiedad antichagasica *in vitro* e *in vivo* de maculina aislada de *Helietta apiculata* Benth. (Rutaceae)

María Elena Ferreira, Hector Nakayama, Susana Torres, Gloria Yaluff, Luis Sanabria, Ninfa Vera de Bilbao, Alicia Schinini, Antonieta Rojas de Arias, Isabelle Guy, Helene Guinaudeau, Alain Fournet

13 - 19 -Incidencia y distribución de hongos filamentosos durante el proceso de beneficio húmedo del café

Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga, Martha Yolanda Quezada Viay, Danilo Fernández Ríos, Ernesto Moreno Martínez, Alberto Flores Olivas

20 - 35 - Asociación *in vitro* del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* Thunb. y anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*

Juliana Moura Mendes Arrua, Fillipe de Oliveira Pereira, Felipe Queiroga Sarmento Guerra, Everardo Albuquerque Menezes, Francisco Afrânio Cunha, Edeltrudes Oliveira Lima

-Caracterización biológica del Arroyo San Lorenzo en el tramo del Campus Universitario-UNA

Gilberto Antonio Benítez Rodas, Héctor David Nakayama, Juliana Moura Arrúa, Griselda Franco Cardozo, Rocío Rosmary Acosta Brítez, Liza María Ramírez Garay

50 - 69 - Caracterización físico-química del aceite esencial de *Origanum syriacum* L. extraído a macro escala en distintos tiempos utilizando el método de destilación por arrastre de vapor

Miguel Martínez, Claudia Mancuello, Claudia Pereira, Fidelina González, Bonifacia Benítez. Francisco Ferreira. César Sena

70 - 70 - El género *Pleurotus* (Pleurotaceae-Basidiomycota) en Paraguay *Alma Flecha Rivas, Barbara De Madrignac, Michelle Campi*

 80 – 101 - Análisis de los remanentes de comunidades vegetales de las cuencas del Rio Salado y del Arroyo Pirayú, en el área de influencia del Lago Ypacarai

Bonifacia Benítez, Maria Vera, Siemens Bertoni