

Vol. 13(1) – 2021  
ISSN 2304-2907 (on line)

# *Steviana*



Cultivo del hongo comestible *Oudemansiella cubensis*



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



La revista *Steviana* es una publicación semestral, del Laboratorio de Recursos Vegetales (LAREV), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN), la misma fue creada en 2009, y cubre áreas de investigación primaria, en todas las líneas de trabajo en el campo de las ciencias botánicas y áreas relacionadas. Las subsecciones temáticas son: Conservación, Ecología, Etnobotánica y Botánica Económica, Ficología, Fisiología, Biotecnología, Fitoquímica, Flora y Vegetación, Genética y Biología Molecular, Micología, Morfoanatomía Vegetal, Sistemática y Taxonomía, Toxicología, entre otras.

Además *Steviana* publica números especiales, tales como: libros y suplementos con los resúmenes de los trabajos presentados a las Jornadas Paraguayas de Botánica.

Cuenta con dos versiones, una impresa con tirada anual (ISSN 2077-8430) y otra on-line con publicación semestral (ISSN 2304-2907). Se publican investigaciones originales (artículos), revisiones (reviews), notas cortas y una sección de noticias, divulgación de redes y eventos, sin costo para los autores.

La revista se encuentra indexada desde el 2012 al Catálogo de Latindex con N° de Folio 21767.

**La Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad Nacional de Asunción,** agradece a los investigadores, que han dedicado su tiempo y esfuerzo incondicional en el arbitraje de los artículos:

**MSc. Gloria Yaluff**

FACEN, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

**Dr. Gerardo Lucio Robledo**

Laboratorio de Micología, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

**MSc. Claudia Pereira S.**

FACEN, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

**Dr. Nicolás Niveiro**

Instituto de Botánica del Nordeste, Argentina

**MSc. Juana de Egea**

Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica - CEDIC

**Dr. Miguel Angel Martínez**

FACEN, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

**MSc. Elodia Torres**

FACEN, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

**Dra. Ana Gómez**

Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica, CEDIC, Asunción-Paraguay

**Dr. Jorge Alfonso**

Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica, CEDIC, Asunción-Paraguay

**Dr. Pastor E. Pérez Estigarribia**

Investigador Asociado. Universidad Sudamericana. Facultad de Medicina. Filiar PJC

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCION**

**RECTORA**

Prof. Dra. Zully Concepción Vera de Molinas

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**DECANO**

Prof. Lic. Constantino Nicolás Guefos K., MAE

---

**CUERPO EDITORIAL**

**Editor**

Bonifacia Benítez de Bertoni  
(FACEN – UNA)

**Co-editor**

Pamela Marchi  
María Vera Jiménez

**Diseño y diagramación**

Pamela Marchi  
María Vera Jiménez

**Fotografía de tapa**

Cultivo del hongo comestible  
*Oudemansiella cubensis*  
Autor: Brenda Veloso

**Revisión de escritos en Inglés**

Nidia Beatriz Benítez Candia  
(FACEN – UNA)

**Comité Científico**

**María de Fátima Mereles H.**

Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica – CEDIC, Paraguay

**Gloria Yaluff**

FACEN-UNA, Paraguay

**Claudia Pereira S.**

FACEN-UNA, Paraguay

**Miguel Angel Martínez**

FACEN-UNA, Paraguay

**Christian Vogt P.**

FACEN-UNA, Paraguay

**Michelle Campi G.**

FACEN-UNA, Paraguay

**Karina Nuñez G.**

FACEN-UNA, Paraguay

---

**Revista Steviana:** Indexada al Catálogo de Latindex, N° de folio 21767

**DIRECCIÓN OFICIAL**

Facultad de Ciencias Exáctas y Naturales-UNA

Telefono-fax: (595-21) 585 600

Dirección Postal: 1039

Campus Universitario, San Lorenzo-Paraguay

Página web: [www.facen.una.py](http://www.facen.una.py)

---

**CONTENIDO POR SECCIONES**

**Biotecnología Vegetal**

- 5-12 Propagación vegetativa de *Pongamia pinnata* (L.) Pierre (Algarrobo aceitero) mediante mini esquejes de raíz  
*Cantero García, I.; Benítez Núñez, J.; Enciso, M.; Samudio Oggero A.*

**Ficología**

- 13-24 Floraciones de *Cyanotetras sp.* en cuerpos de agua salobres eutrofizados del Paraguay durante el 2020  
*Dos Santos, M.; Morel, R.; Ávalos, C.; Méndez M. S.; Benítez, G. A.*

**Fitoquímica**

- 25-37 Evaluación de *Campyloneurum phyllitidis* y de *Asplenium serratum* sobre el desarrollo embrionario de *Danio rerio*  
*Benítez Acuña, J.A.; Ibarra, P.; López, T. y Segovia, E.*

38-49

Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto vegetal de las hojas de *Solanum granuloso-leprosum* Dunal  
*Aguilar, S. ; Mc Donald, A.; Diaz, A.; Martínez, M.; Moura-Mendes, J.*

**Micoquímica**

- 50-61 Evaluación del perfil químico de metabolitos secundarios del hongo comestible *Oudemansiella cubensis* silvestre y cultivado y, factibilidad de producción indoor  
*Veloso Paredes, B.; Campi Gaona, M.; Maubet Cano, Y.; Mancuello Chaparro, C.*

**Toxicología**

- 62-70 Toxicidad del extracto acuoso de *Sida cordifolia* L. mediante el ensayo de micronúcleo en ratones  
*Caballero, H.; Paredes, K.; Torres, E.; Segovia, E.*

# Propagación vegetativa de *Pongamia pinnata* (L.) Pierre (Algarrobo aceitero) por mini esquejes de raíz

Cantero García, I.<sup>1</sup>; Benítez Núñez, J.<sup>2\*</sup>; Enciso, M.<sup>3</sup>; Samudio Oggero A.<sup>4</sup>

<sup>1,2,4</sup> Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, San Lorenzo, Paraguay

<sup>3</sup> Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Ingeniería Forestal, San Lorenzo, Paraguay

\*E-mail del autor: juanvenabe@gmail.com

---

**Propagación vegetativa de *Pongamia pinnata* (L.) Pierre (Algarrobo aceitero) por mini esquejes de raíz.** La *Pongamia pinnata* es un árbol, cuya semilla es empleada como materia prima para la elaboración de biodiesel. El objetivo fue evaluar la propagación vegetativa, mediante el uso de diferentes, longitudes de esquejes de raíz y tipos de sustratos, con y sin aplicación de la hormona AIB (Ácido Indol Butírico). Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial (2 X 2 X 2) compuesto por 3 factores, 2 tipos de sustratos y 2 longitudes de esquejes de 3 cm (L1) y 6cm (L2), con y sin AIB. En total se evaluaron 8 tratamientos que consistieron en la combinación de los 3 factores. Las variables evaluadas fueron porcentaje de enraizamiento, número de raicillas y longitud de raicillas (cm), número de brotes, longitud de brotes (cm) y número de esquejes con callosidad. Los datos obtenidos, fueron analizados con ANOVA y test de significancia (Tukey a un nivel de confianza del 95%) con el Software Estadístico Infostat. Los factores sustrato y hormona no arrojaron diferencias significativas con relación a las variables evaluadas. El factor longitud de esquejes arrojó diferencias significativas para todas las variables evaluadas a favor de la longitud L2 (6cm). La propagación vegetativa de la especie no se ve influenciada estadísticamente por el tipo de sustrato y la aplicación de AIB, pero sí por la longitud de los esquejes, siendo la longitud de 6 cm la más adecuada para cultivarlas.

**Palabras clave:** Enraizamiento, sustrato, callosidad, AIB

**Vegetative propagation of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre (Algarrobo aceitero) using mini root cuttings.** *Pongamia pinnata* is a tree, whose seed is used as raw material for the production of biodiesel. This work aimed to evaluate its vegetative propagation, using of different lengths of root cuttings and types of substrates, with and without application of the hormone IBA (Indole Butyric Acid). A completely randomized design with a factorial arrangement (2 × 2 × 2) was used, composed of 3 factors, 2 types of substrates, and 2 cutting lengths of 3 cm (L1) and 6 cm (L2), with and without IBA. In total 8 treatments which consisted of the combination of the 3 factors were evaluated. The variables evaluated were percentage of rooting, number of rootlets and rootlet length (cm), number of shoots, shoot length (cm) and number of cuttings with calluses. The data obtained were analyzed with ANOVA and a significance test (Tukey at a 95% confidence level) through the Infostat Statistical Software. The substrate and hormone factors did not show significant differences in relation to the variables evaluated. The cuttings length factor showed significant differences for all the variables evaluated in favor of length L2 (6cm). The vegetative propagation of the species is not statistically influenced by the type of substrate and the application of IBA, but it is influenced by the length of the cuttings, the length of 6 cm being the most suitable for cultivating them.

**Keywords:** Rooting, substratum, calluses, IBA

---

## INTRODUCCIÓN

*Pongamia pinnata* (L.) Pierre pertenece a la familia Fabaceae, es un árbol originario de la India de rápido crecimiento conocido popularmente como “algarrobo aceitero”, posee buen desarrollo en diversos tipos de suelos, es muy tolerante a condiciones de salinidad y alcalinidad, fija gran cantidad de nitrógeno atmosférico e incorpora importante volumen de materia orgánica en el suelo, lo que provoca una mejor absorción de agua y de nutrientes, ayudando de esta manera a la recuperación de suelos marginales (Ferrari y Wall 2004; Sujatha y Hazra 2007; Chopade *et al.*, 2008; Falasca y Bernabé 2009).

*P. pinnata* es también empleada por sus propiedades medicinales para tratar resfriado, tos, diarrea, disentería, cólicos inflamatorios, reumatismo, hipertensión, bronquitis, tumores abdominales enfermedades de la piel, herpes y otras afecciones. Además, es una especie ornamental y melífera (Meher *et al.*, 2004; Wagh *et al.*, 2007; Chopade *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2011; Bobade y Khyade 2012; Sajid *et al.*, 2012). Al Muqarrabun *et al.* (2013), realizaron revisiones bibliográficas de los usos tradicionales de *P. pinnata*, encontraron estudios farmacológicos que revelaron las actividades biológicas tales como antioxidantes, actividades antimicrobianas, antiinflamatorias y antidiabéticas de la especie. Arote *et al.* (2008), demostraron que los extractos de hoja de *P. pinnata* poseen efectos antibacterianos. Sajid *et al.* (2012), encontraron agentes antioxidantes y antimicrobianos para usos alimenticios y farmacéuticos funcionales en los

extractos de la corteza de *P. pinnata*.

Actualmente existe un debate sobre utilización de productos agrícolas para la elaboración de biocombustibles. A medida que la población crece la necesidad de alimentos también aumenta. Esta especie puede ser una alternativa en este debate, porque no forma parte de la dieta humana. La semilla de la *P. pinnata* es utilizada como materia prima para la producción de biodiesel, este producto es biodegradable de combustión limpia (Bobade y Khyade, 2012), esto vuelve a la especie muy prometedora siendo una alternativa la elaboración de biodiesel a partir de sus semillas.

En Paraguay existen una amplia variedad de condiciones edafoclimáticas potenciales para su cultivo, considerando su plasticidad.

Por medio de la propagación vegetativa de la especie, se podrá clonar individuos con las características genéticas deseadas preservando el genotipo y se logrará acelerar el proceso de multiplicación de la misma. Trabajos realizados por Enciso y Irrazábal (2007), Ovando *et al.* (2006), demostraron la posibilidad de propagar especies forestales (*Melia azedarach* L. y *Tabebuia heptaphylla*) utilizando esquejes de raíz. Revisiones realizadas por Mukta y Sreevalli (2010), encontraron buenos resultados para la inducción de raíces en esquejes de *P. pinnata* utilizando ácido indol butírico (AIB). Estudios elaborados por Rout y Nayak (2015), obtuvieron altos porcentajes de enraizamiento empleando esquejes de tallo de *P. pinnata*.

Con el resultado de este trabajo se espera una mayor producción de plantines con brotes y raicillas a partir de esquejes

de raíz, a través de una técnica novedosa de propagación.

El objetivo del estudio fue evaluar la propagación vegetativa, mediante el uso de diferentes longitudes de esquejes de raíz y tipos de sustratos, con y sin aplicación de AIB (Ácido Indol Butírico).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento fue llevado a cabo en la casa de vegetación del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT) de la Universidad Nacional de Asunción (UNA) a finales del invierno (septiembre) hasta comienzos del verano (noviembre) del año 2017, con una T<sub>0</sub> máxima de 29,9-29,7 0C y una T<sub>0</sub> mínima de 18,7-19,3 0C.

### Material genético

Se emplearon mini esquejes de raíz de 3 cm (L1) y 6 cm (L2) de longitud y 0,6 -1 cm de diámetro, fueron extraídos de una parcela de árboles de *P. pinnata* de 9 años de edad situado en el Campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción. Se seleccionaron los individuos con las mejores características fenotípicas (semillas más grandes, fuste recto, copa ancha y con mayor cantidad de ramas).

### Propagación asexual

Los mini esquejes de raíz, una vez extraídos fueron envueltos con papel diario, remojado con agua e introducidos en bolsa de polietileno para evitar su desecación, luego fueron trasladados a la casa de vegetación para iniciar el cultivo. Se utilizaron 160 mini esquejes

de los cuales 80 fueron sumergidos en la hormona AIB (1000 ppm). La plantación del material vegetativo se realizó en bandejas germinadoras con sustrato comercial (turba, vermiculita, caliza dolomítica, yeso agrícola y fertilizante NPK-trazas) (S<sub>1</sub>) y humus de lombriz (S<sub>2</sub>). En total se emplearon ocho tratamientos que consistieron en la combinación de, tipo de sustrato, longitud de esquejes y la aplicación o no de la hormona AIB.

### Diseño del ensayo

La investigación fue de tipo experimental con un delineamiento factorial (2x2x2). Se contó con tres factores (sustrato, longitud de esquejes y con y sin hormona) y cinco repeticiones por tratamiento. Las unidades muestrales fueron distribuidas al azar y estuvieron compuestas por cuatro mini esquejes cada una. A los 60 días se evaluaron, el porcentaje de enraizamiento, número de raicillas y longitud de raicillas (cm), número de brotes, longitud de brotes (cm) y número de esquejes con callosidad (formación de abultamiento en el extremo distal del esqueje). Los resultados fueron analizados mediante el test de ANOVA (con previa comprobación de homocedasticidad en la variancia y distribución normal) y la prueba post-hoc de Tukey (5% de nivel de significancia) empleándose el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2008).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Factor sustrato

El factor sustrato no mostró diferencias estadísticas para las variables,

porcentaje de enraizamiento ( $F=0,21$ ;  $p \geq 0,05$ ), número de raicillas ( $F=3,47$ ;  $p \geq 0,05$ ) y longitud de raicillas (cm) ( $F=0,12$ ;  $p \geq 0,05$ ), número de brotes ( $F=0,00$ ;  $p \geq 0,05$ ), longitud de brotes (cm) ( $F=0,21$ ;  $p \geq 0,05$ ) y número de esquejes con callosidad ( $F=0,75$ ;  $p \geq 0,05$ ). Empleando humus de lombriz (S2) se obtuvieron el porcentaje de enraizamiento y número de esquejes con callo-

sidad más altos, al igual que las variables número y longitud de raíces y de brotes (**Tabla 1**). El humus de lombriz ayuda a la propagación de diferentes especies, mejora y estimula el desarrollo radicular dando lugar a mayor vigor en la parte aérea de la planta debido a la cantidad de nutrientes que posee como nitrógeno, fósforo, calcio, potasio y otros (Tenecela 2012; Salinas *et al.*, 2014).

**Tabla 1.** Efecto del tipo de sustrato, longitud de esqueje y la aplicación o no de ácido indol butírico (AIB) en la propagación vegetativa de *Pongamia pinnata*

Variables/Factores	Sustrato		Longitud		Hormona (AIB)	
	S1	S2	L1 (3cm)	L2 (6cm)	CH	SH
Enraizamiento %	33.0 a	37.0 a	22.0 a	48.0 b	28.0 a	41.3 a
Raíces (Nro.)	3.1 a	5.1 a	2.3 a	6.0 b	3.1 a	5.1 a
Long. de raíz (cm)	15.4 a	17.1 a	6.5 a	26.1 b	12.1 a	20.2 a
Brotes (Nro.)	2.0 a	2.0 a	1.4 a	3.0 b	2.0 a	2.3 a
Long. de brotes (cm)	4.5 a	5.0 a	2.1 a	8.0 b	4.0 a	5.4 a
Esquejes con callosidad (Nro.)	0.5 a	1.0 a	0.3 a	1.1 b	0.5 a	1.0 a

S1, S2, L1, L2, CH, SH; medias significativamente diferentes a un nivel de confianza del 95%

### Factor longitud de esqueje

Todas las variables evaluadas, porcentaje de enraizamiento ( $F=10,14$ ;  $p \leq 0,05$ ), número de raicillas ( $F=12,17$ ;  $p \leq 0,05$ ) y longitud de raicillas (cm) ( $F=20,54$ ;  $p \leq 0,05$ ), número de brotes ( $F=19,69$ ;  $p \leq 0,05$ ), longitud de brotes (cm) ( $F=32,80$ ;  $p \leq 0,05$ ) y número de esquejes con callosidad ( $F=6,75$   $p \leq 0,05$ ), mostraron diferencias significativas para el factor longitud de esquejes. Cultivando esquejes de 6 cm de longitud (L2) se dieron el porcentaje de enraizamiento

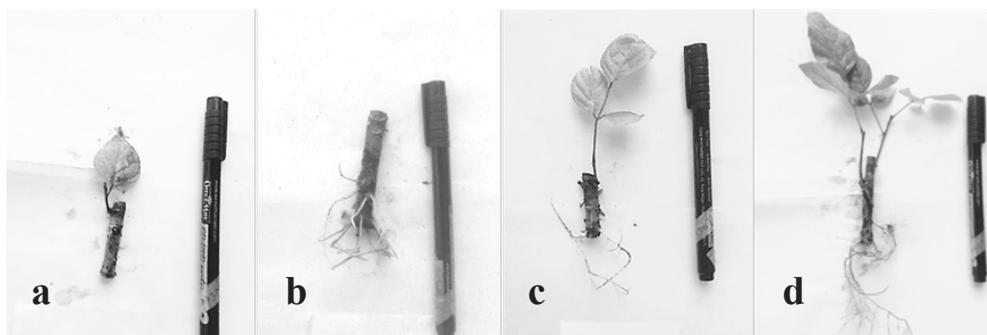
más elevado. Los valores más altos para el número de raicillas, brotes y esquejes con callosidad y longitud de raicillas y brotes también se obtuvieron con esquejes de L2 (**Tabla 1**) (**Figura 1**).

Los mejores resultados para todas las variables se registraron utilizando esquejes de 6 cm de longitud (L2). Estos efectos se pudieron dar a que los esquejes poseían una mayor cantidad de reservas nutritivas para la propagación vegetativa de *P. pinnata* a esquejes de 3 cm de longitud que probablemente tenían

una baja disponibilidad de reservas.

Hartmann y Kester (1998), recomiendan cultivar esquejes de 10 a 12 cm de longitud por que estas se encuentran provistas de carbohidratos de reserva. Solís *et al.*, 2015 por su parte, mencio-

nan que los mejores resultados de propagación utilizando estacas de mayor longitud se deba a que estos contienen mayor cantidad de sustancias de reserva que intervienen en el proceso de enraizamiento y crecimiento de las raíces.



**Figura 1.** a-Esquejes con brotes y callosidad en el extremo distal. b- Esquejes con raicillas sin brotes. c-Esquejes de 3 cm longitud con brote y raicillas. d- Esquejes de 6 cm longitud con brotes y raicillas

### Factor hormona

El factor hormona (AIB) no arrojó diferencias estadísticas para ninguna de las variables estudiadas, porcentaje de enraizamiento ( $F=2,78$ ;  $p \geq 0,05$ ), número de raicillas ( $F=3,84$ ;  $p \geq 0,05$ ) y longitud de raicillas (cm) ( $F=3,66$ ;  $p \geq 0,05$ ), número de brotes ( $F=0,31$ ;  $p \geq 0,05$ ), longitud de brotes (cm) ( $F=2,47$ ;  $p \geq 0,05$ ) y número de esquejes con callosidad ( $F=0,75$ ;  $p \geq 0,05$ ). Los esquejes no sometidos a la hormona AIB presentaron los mejores valores para el porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raicillas y las demás variables evaluadas (Tabla 1).

La aplicación de AIB no estimuló la formación de raíces adventicias, pudiendo enraizar esta especie perfectamente sin el tratamiento hormonal.

Azcón y Talón (2008), afirman que en muchas especies botánicas el enraizamiento (formación de raíces adventi-

cias), es un proceso espontáneo. Estudios realizados por Kesari *et al.* (2009), mencionan que obtuvieron efectos positivos utilizando diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas para el enraizamiento adventicios de esquejes de tallos de *Pongamia pinnata*, sin embargo, utilizando altas concentración de auxinas superiores a 7mM este inhibió el enraizamiento de los esquejes. Sugla *et al.* (2007), consiguieron buenos resultados de enraizamiento de brotes de *P. pinnata* en condiciones in vitro en medio cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) de concentración completa suplementado con 1.0 $\mu$  ácido indol butírico (AIB). Palanisamy *et al.* (1998), para el enraizamiento de esquejes de brotes de *P. pinnata* obtuvieron los mejores resultados con la auxina AIB.

## CONCLUSIÓN

La propagación de *Pongamia pinnata* (L.) Pierre fue posible a partir de mini esquejes de raíz utilizando diferentes longitudes de raíz, tipos de sustratos, con y sin la aplicación de hormona AIB. Se concluye que los esquejes de *Pongamia* no se ven influenciados por la aplicación de AIB y tipos de sustratos utilizados, pero si se ven afectados por la longitud de esquejes, siendo la longitud 6 cm la más adecuada para la propagación vegetativa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Muqarrabun, R., Ahmat, N., Ruzaina, S., Ismail, H., y Sahidin, I. (2013). Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre: A review. *Journal of ethnopharmacology*, 150(2), 395-420. DOI: [https://www.researchgate.net/publication/256479216\\_Medicinal\\_uses\\_phytochemistry\\_and\\_pharmacology\\_of\\_Pongamia\\_pinnata\\_L\\_Pierre\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/256479216_Medicinal_uses_phytochemistry_and_pharmacology_of_Pongamia_pinnata_L_Pierre_A_review)
- Arote, S., Dahikar, S., y Yeole, G. (2008). Phytochemical screening and antibacterial properties of leaves of *Pongamia pinnata* Linn. (Fabaceae) from India. *African Journal of Biotechnology*, 8(22), 6393-6396. DOI: <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text-pdf/E01764128623>
- Azcón, B., y Talón, M. (2008). *Fundamentos de la fisiología vegetal*. Barcelona, España: McGRAW-HILL.
- Bobade, N., y Khyade, B. (2012). Preparation of methyl ester (biodiesel) from karanja (*Pongamia pinnata*) oil. *Research Journal of Chemical Sciences*, 2(8), 43-50. DOI: <http://www.isca.in/rjcs/Archives/v2/i8/8.ISCA-RJCS-2012-106.pdf>
- Chopade, V., Tankar, N., Pande, V. V., Tekade, A. R., Gowekar, N. M., Bhandari, S. R., y Khandake, S. N. (2008). *Pongamia pinnata*: Phytochemical constituents, traditional uses and pharmacological properties: A review. *International Journal of Green Pharmacy*, 2(2), 72-75. DOI: <http://dx.doi.org/10.22377/ijgp.v2i2.31>
- Di Rienzo, A., Casanoves, F., Balzarini, G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, W. (2008). *InfoStat*, (versión 2008), Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Enciso, M., y Irrazábal, C. (2007). Propagación vegetativa de paraíso gigante (*Melia azedarach* L. var. *gigantea*) mediante estacas de raíz. *Investigaciones y estudios de la UNA*, 2, 43-49.
- Falasca, S., y Bernabé, A. (2009). El reemplazo del cultivo de *Jatropha curcas* en Argentina por *Pongamia pinnata*. XVI Congreso Brasileño de Agrometeorología, Brasil. DOI: <http://www.sbagro.org/files/biblioteca/2274.pdf>
- Ferrari, E., y Wall, G. (2004). Utilización de árboles fijadores de nitrógeno para la revegetación de suelos degradados. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*,

- 105(2), 63-87. DOI: <http://revista.agro.unlp.edu.ar/index.php/revagro/article/view/189>
- Hartmann, H., y Kester, D. (1998). Propagación de plantas: principios y prácticas. México: Continental.
- Kesari, V., Krishnamachari, A., y Rangan, L. (2009). Effect of auxins on adventitious rooting from stem cuttings of candidate plus tree *Pongamia pinnata* (L.), a potential biodiesel plant. *Springer*, 23(3), 597-604. DOI: <https://www.researchgate.net/publication/226137906>
- Meher, C., Naik, N., y Das, M. (2004). Methanolysis of *Pongamia pinnata* (karanja) oil for production of biodiesel. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, 913-918. DOI: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5482/1/JSIR%2063%2811%29%20913-918.pdf>
- Mukta, N., y Sreevalli, Y. (2010). Propagation techniques, evaluation and improvement of the biodiesel plant, *Pongamia pinnata* (L.) Pierre—a review. *ELSEVIER*, 31(1), 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.09.004>
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Ovando L., Enciso M., Ovelar R., y Villalba, N. (2006). Propagación vegetativa de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (lapacho negro), mediante esquejes de raíz. *Investigación Agraria*, 9 (1), 73-79. DOI: <http://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/91>
- Palanisamy, K., Ansari, S. A., Kumar, P., y Gupta, B. N. (1998). Adventitious rooting in shoot cuttings of *Azadirachta indica* and *Pongamia pinnata*. *New Forests*, 16(1), 81-88. DOI: [https://www.researchgate.net/publication/251387619\\_Adventitious\\_rooting\\_in\\_shoot\\_cuttings\\_of\\_Azadirachta\\_indica\\_and\\_Pongamia\\_pinnata](https://www.researchgate.net/publication/251387619_Adventitious_rooting_in_shoot_cuttings_of_Azadirachta_indica_and_Pongamia_pinnata)
- Rao, R., Shanker, K., Srinivas, I., Korwar, R., y Venkateswarlu, B. (2011). Diversity and variability in seed characters and growth of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre accessions. *Springer*, 25(4), 725-734. DOI: <https://core.ac.uk/download/pdf/288309082.pdf>
- Rout, S., y Nayak, S. (2015). Vegetative propagation of *Karanja* (*Pongamia pinnata* L. Pierre) through stem cuttings. *Journal of Applied and Natural Science*, 7(2), 844-850. DOI: <https://doi.org/10.31018/jans.v7i2.694>
- Sajid, I., Anwar, F., Shabir, G., Rasul, G., Alkharfy, M., y Gilani, H. (2012). Antioxidant, antimicrobial properties and phenolics of different solvent extracts from bark, leaves and seeds of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre. *Molecules*, 17(4), 3917-3932. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules17043917>
- Salinas, F., Sepúlveda, L., y Sepúlveda, G. (2014). Evaluación de la cali-

- dad química del humus de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) elaborado a partir de cuatro sustratos orgánicos en Arica. *Ideasia* (Arica), 32(2), 95-99. DOI: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pi34292014000200013&script=sci\\_arttext&tlng=en](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pi34292014000200013&script=sci_arttext&tlng=en)
- Sujatha, K., y Hazra, S. (2007). Micropropagation of mature *Pongamia pinnata* Pierre. *In Vitro Cell.Dev. Biol.-Plant*, 43(6), 608-613. DOI: [https://www.researchgate.net/publication/226299356\\_Micropropagation\\_of\\_mature\\_Pongamia\\_pinnata\\_Pierre](https://www.researchgate.net/publication/226299356_Micropropagation_of_mature_Pongamia_pinnata_Pierre)
- Sugla, T., Purkayastha, J., Singh, K., Solleti, K., y Sahoo, L. (2007). Micropropagation of *Pongamia pinnata* through enhanced axillary branching. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 43(5), 409-414. DOI: [https://www.academia.edu/6235418/Micropropagation\\_of\\_Pongamia\\_pinnata\\_through\\_enhanced\\_axillary\\_branching](https://www.academia.edu/6235418/Micropropagation_of_Pongamia_pinnata_through_enhanced_axillary_branching)
- Solís, A., Jiménez, V., y Arias, J. (2015). Propagación asexual de azul de mata (*Justicia tinctoria* (Oerst.) DN Gibson, Fam. Acanthaceae) por medio de estacas. *Agronomía Costarricense*, 39(2), 91-104. DOI: [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pi-94242015000200091&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pi-94242015000200091&script=sci_arttext)
- Tenecela, X. (2012). Producción de humus de lombriz mediante el aprovechamiento y manejo de los residuos orgánicos (Tesis de grado). Universidad de Cuenca, Ecuador. DOI: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3252/1/> TESIS.pdf
- Wagh, P., Rai, M., Deshmukh, K., y Durate, T. (2007). Bio-activity of oils of *Trigonella foenum-graecum* and *Pongamia pinnata*. *African journal of Biotechnology*, 6(13), 1592-1596. DOI: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/57699>

# Floraciones de *Cyanotetras* sp. en cuerpos de agua salobres eutrofizados del Paraguay durante el 2020

Dos Santos, M.<sup>1</sup>; Morel, R.<sup>2</sup>; Ávalos, C.<sup>3</sup>; Méndez, M. S.<sup>4</sup>; Benítez, G. A.<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Hidrobiología, San Lorenzo, Paraguay

<sup>2</sup>Ministerio del Ambiente y Desarrollo Sostenible, Dirección General de Gestión Ambiental, Asunción, Paraguay

<sup>3</sup>Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Laboratorio de Hidrobiología, San Lorenzo, Paraguay.

<sup>4</sup>Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza - CATIE -Unidad de Cuencas, Seguridad Hídrica y Suelos, Turrialba, Costa Rica

\* Email del autor: gilberto.benitez@cemit.una.py

---

**Floraciones de *Cyanotetras* sp. en cuerpos de agua salobres eutrofizados del Paraguay durante el 2020.** Las floraciones de cianobacterias se producen en ambientes acuáticos eutrofizados debido, principalmente, a la falta de gestión adecuada de los recursos hídricos y sus contaminantes. En el caso de Paraguay, se han reportado dos floraciones rojas, una en la Región Occidental (P1) y otra en la Región Oriental (P2). Por lo tanto, se estableció como objetivo identificar al microorganismo causante y las condiciones fisicoquímicas en que se desarrollaron. En ambos casos, se identificó al género *Cyanotetras* (Cyanobacteria) como el más abundante con una densidad de 1.065.000 cél/mL (P1) y 5.504.000 cél/mL (P2). En cuanto a los parámetros fisicoquímicos, se reportó elevada concentración de nutrientes y sales, característicos de ecosistemas acuáticos eutrofizados y salobres. En conclusión, se puede indicar que en P1 la floración se produjo en forma natural, mientras que en P2 fue debido al aporte de contaminantes provenientes de las actividades antrópicas aledañas al cuerpo de agua.

**Palabras clave:** *Cyanotetras*, eutrofización, agua salobre, floraciones

***Cyanotetras* sp. in eutrophicated brackish water bodies of Paraguay during 2020.** Cyanobacterial blooms occur in eutrophic aquatic environments mainly due to the lack of proper management of water resources and their pollutants. In the case of Paraguay, two red blooms have been reported, one in the Western Region (P1) and the other in the Eastern Region (P2). Therefore, the objective was to identify the causative microorganism and the physicochemical conditions in which they developed. In both cases, the genus *Cyanotetras* (Cyanobacteria) was identified as the most abundant with a density of 1,065,000 cells/mL (P1) and 5,504,000 cells/mL (P2). Regarding the physicochemical parameters, they reported a high concentration of nutrients and salts was reported, characteristic of eutrophied and brackish aquatic ecosystems. In conclusion, we can indicate that in P1 the flowering occurred naturally, while in P2 it was due to the contribution of pollutants from anthropic activities near the body of water.

**Keywords:** *Cyanotetras*, eutrophication, brackish-water, blooms

---

## INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias, antiguamente denominadas algas verdeazuladas, perte-

necen al dominio procariota. Fueron las primeras en aparecer como organismos fotosintéticos en ambientes acuáticos y pueden adaptarse a una amplia variedad

*Steviana*, Vol. 13 (1), 2021 pp. 13 - 24

Original recibido el 25 de junio de 2021

Aceptado el 30 de agosto de 2021

de condiciones ambientales. Cuando estas condiciones se vuelven extremas, como cuando se produce un aumento de la concentración de nutrientes (N y P) y de la temperatura, dan lugar a un proceso conocido como floración o Bloom (Zhao *et al.*, 2021; Zou *et al.*, 2020).

El aumento de los nutrientes puede ocurrir en forma natural o como consecuencia de las actividades antrópicas, en este último caso, debido a la falta de un tratamiento adecuado de los desechos generados, sobre todo de los efluentes domésticos o industriales que terminan en los ecosistemas acuáticos alterando su equilibrio natural. Este proceso se conoce como eutrofización, y genera condiciones favorables para el crecimiento desmesurado de algas microscópicas, así como también de las cianobacterias (Zou *et al.*, 2020).

En la actualidad, los reportes acerca de floraciones de cianobacterias ya no son una novedad en nuestra región ni en el mundo, debido a los problemas que existen respecto a la gestión integral de los recursos hídricos y sus contaminantes. Sin embargo, lo más preocupante de esta situación es que estas bacterias tienen la capacidad de sintetizar compuestos bioactivos que pueden ser tóxicos para el ser humano, así como para otros organismos que tengan contacto directo con los mismos o a través de la cadena alimentaria por ser bioacumulativos. Por lo tanto, el impacto negativo puede ser a nivel ambiental, sanitario y económico (Paerl *et al.*, 2020).

Los sistemas de agua generan condiciones de supervivencia básica y de ahí la importancia y relevancia de entender la causa de las floraciones de

cianobacterias, para poder plantear acciones a corto, medio y largo plazo para esta problemática ambiental. Las floraciones son conocidas como Floraciones Algaes Nocivas (FANs), y países como Argentina, Brasil, Bolivia, Perú, Brasil y Chile han reportado floraciones algales o blooms en diferentes tipos de sistemas de agua, ya sean naturales o artificiales (Conti *et al.*, 2005; De Domitrovic *et al.*, 2005; Juanena *et al.*, 2020). Estos blooms pueden estar asociados a cambios de la coloración del agua y esto dependerá de los pigmentos que presentan en mayor cantidad, como la clorofila a con color verde, la ficocianina con color azul, la ficoeritrina con color rojo, así como la degradación parcial de este último que puede dar un color rosado (Harada *et al.*, 2009; Tomita *et al.*, 2016).

Entre 1980 y 2005 Uruguay ha reportado unas 27 floraciones algales en diferentes puntos del país. Los principales organismos fotosintéticos identificados en estas floraciones fueron *Gonyaulax* sp., *Gymnodinium* sp., *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium tamarense*, *Dynophysis acuminata*, *Dynophysis caudata*, *Microcystis aeruginosa*, *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Méndez y Ferrari, 2002). Algunos de estos son causantes de las “mareas rojas” ampliamente conocidas por las características que adquieren las zonas de las costas (Cabrera Di Piramo, 2015).

En el caso de Paraguay se han reportado floraciones de cianobacterias, siendo la más conocida desde el 2012 la ocurrida en el Lago Ypacaraí, originada inicialmente por *Cylindrospermopsis raciborskii* y luego por *Microcystis aeruginosa*, en ambos casos causando

un color verde-azulado de la superficie del agua. Desde entonces y hasta la actualidad se siguen produciendo floraciones, pero en forma puntual; esto pudo deberse a la disminución de la concentración de nutrientes y al aumento de la turbidez del agua (Benítez Rodas *et al.*, 2017; López Moreira M. *et al.*, 2018). Sin embargo, a mediados de 2020 se reportó una llamativa floración de color rojo en un tajarar natural del Chaco paraguayo (Región Occidental) y luego otra con características ecológicas diferentes en una laguna del Departamento Central (Región Oriental) originadas por cianobacterias.

Por lo tanto, se planteó como objetivo de este trabajo de investigación identificar al microorganismo causante de dichos fenómenos y caracterizar las condiciones fisicoquímicas en las cuales ocurrieron dichas proliferaciones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El Ministerio del Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADES) y el Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT) dependiente de la Universidad Nacional de Asunción (UNA), realizaron tomas de muestras de agua superficial de un tajarar ubicado en Loma Plata y de la Laguna Cerro en el Municipio de Limpio (Figura 1), debido a denuncias realizadas acerca del cambio de coloración que se observó en ambos cuerpos de agua. Los inusuales fenómenos causaron preocupación en pobladores y autoridades, quienes solicitaron la intervención de especialistas en la materia.

### 1. Descripción de los puntos de muestreo

El Paraguay se divide en dos regiones, la Occidental o Chaco que constituye la mayor extensión territorial, pero con menor población, con un clima caluroso y seco, suelo arcilloso y en varias zonas con agua salobre; mientras que la Región Oriental cuenta con mayor población, clima caluroso, más húmedo, mayor cantidad de recursos hídricos y agua dulce (López-González, 2004).

### 2. Detalles del muestreo

**Región Occidental o Chaco:** Primer muestreo realizado el 17 de junio de 2020, asignado como P1 (Tabla 1). Este muestreo se realizó como consecuencia del reporte de pobladores del Chaco por el cambio de la coloración de un tajarar natural utilizado para abastecimiento de agua para ganado vacuno. Este punto se encuentra ubicado en el distrito de Loma Plata, Departamento de Boquerón a 450 km de Asunción, capital de Paraguay.

**Región Oriental:** Segundo muestreo realizado el 17 de agosto de 2020, denominado P2 (Tabla 2). Este muestreo también se realizó como consecuencia de la denuncia ciudadana del cambio de la coloración del agua de la Laguna “Cerro” similar a la registrada en el Chaco. Este punto de muestreo se encuentra localizado en el municipio de Limpio, Departamento Central a 25 km de Asunción.

**Tabla 1.** Coordenadas y puntos de muestreos en las regiones Occidental y Oriental.

Puntos	Coordenadas - UTM	Región
P1	21K 204742 7512642	Occidental
P2	21J 449797 7223222	Oriental

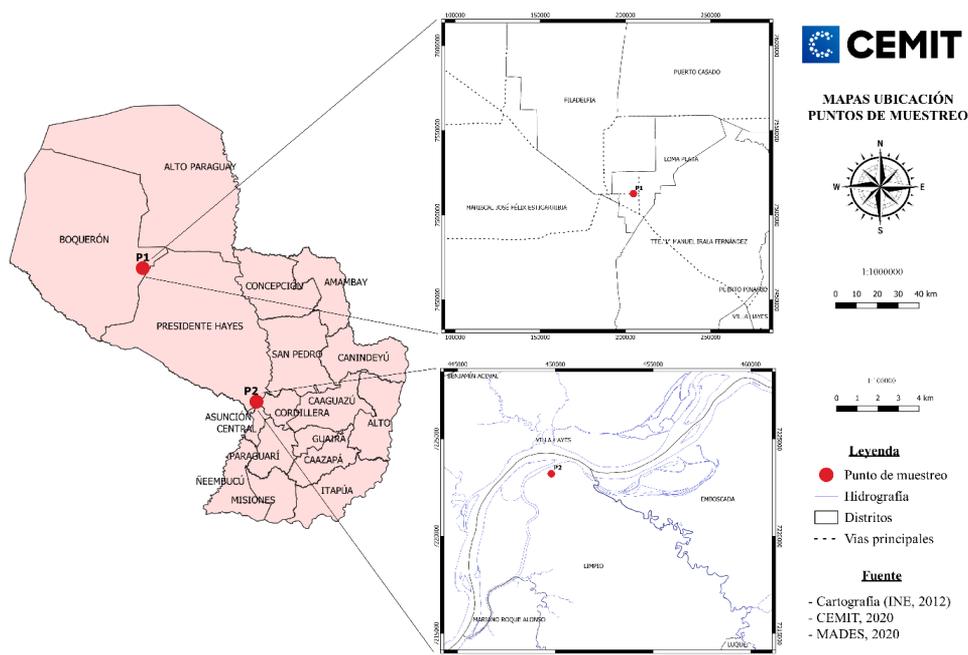


Figura 1. Mapa con los puntos de muestreo en la Región Occidental (P1) y Oriental (P2)

### 3. Variables del estudio

Para poder determinar las condiciones fisicoquímicas que favorecieron las floraciones en ambos sitios, se tuvieron en cuenta las siguientes 12 variables: transparencia, temperatura del agua, pH, oxígeno disuelto, conductividad, nitrógeno total (NT), fósforo total (PT), DBO<sub>5</sub>, DQO, dureza total, sulfatos y sales; estos constituyen los principales factores que pueden afectar directamente a las poblaciones de cianobacterias (Haider *et al.*, 2003; Henry, 1990; Lu *et al.*, 2013). Para los análisis, se tomaron muestras de agua superficial, las que fueron luego almacenadas para su transporte según lo establecido en el Standard Methods (APHA, 2012).

### 4. Cuantificación de cianobacterias y determinaciones de parámetros fisicoquímicos

Para los análisis se tomaron muestras de agua superficial preservadas con Lugol y otra a 4°C para su transporte (APHA, 2012). Para la identificación y clasificación de las cianobacterias se tuvieron en cuenta las características morfológicas y se utilizaron diversas claves taxonómicas (Hindák, 1988; Komárek y Anagnostidis, 2000; Komárek y Fott, 1983). Una vez realizada la identificación, se procedió con la cuantificación mediante el método de Utermöhl (Edler y Elbrächter, 2010). En relación a la medición de los parámetros fisicoquímicos mencionados anteriormente, se utilizaron los métodos normalizados para el

análisis de agua (APHA, 2012).

## 5. Análisis de datos

Para el procesamiento de los datos como la densidad de las cianobacterias y la comparación de las variables físico-

químicas consideradas más importantes durante el proceso de la floración de cianobacterias se utilizó el programa Sigma Plot 11.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1- Descripción general del área de estudio de cada punto de muestreo



**Figura 2.** Imágenes de los lugares donde se realizaron los muestreos: a-Tajamar natural ubicado en Loma Plata (P1), Departamento Boquerón; b- Laguna Cerro, localizada en el municipio de Limpio (P2), Departamento Central.

Las actividades industriales desarrolladas en Loma Plata (Chaco Paraguayo) son la refinería, aceite de maní, fabricación de tanino, esencia de palo santo entre otras. Sin embargo, la principal actividad constituye la industria láctea, que es una de las más productivas del país y la mayor consumidora de agua local. Gran parte del Chaco tiene un clima semiárido a húmedo dependiendo de la estación de año, y las aguas subterráneas presentan elevados contenidos de sales debido a la presencia de evaporíticas y carbonatos en los sedimentos, que al ser muy solubles pasan a la fase acuosa dando lugar a aguas salobres y saladas, dependiendo de la profundidad. Por esta razón, los productores suelen realizar la construcción de reservorios de agua o aprovechar los lugares donde se alma-

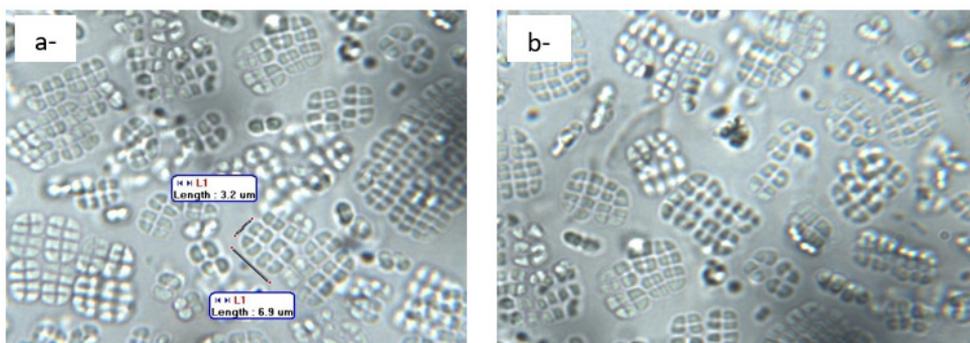
na agua en periodos de lluvias; estos reservorios son conocidos como tajamares, y sirven para el abastecimiento de agua dulce, principalmente para el ganado (Larroza y Centurión, 1995). En el caso del punto de muestreo P1, se trata de un tajamar de formación natural utilizado como fuente de agua para el ganado vacuno. Sin embargo, a finales del mes de mayo de 2020 se reportó el cambio de la coloración del agua a un color rojizo, obligando al propietario a trasladar los animales de dicha zona (Figura 2a).

El punto de muestreo P2, ubicado en la Ciudad de Limpio a más de 400 km de distancia del punto anterior, se caracteriza por un suelo de color rojo negruzco, de origen basáltico y con un buen drenaje. En los alrededores de la laguna se

encuentran industrias que están relacionadas con el procesamiento de cuero de origen animal. Es una zona húmeda, con periodos de lluvias importantes y presencia de gran cantidad de agua dulce (Franco y Saldívar, 2015). Alberga una gran diversidad de organismos, siendo la más reconocida, por su tamaño e im-

pacto visual, la planta acuática conocida con el nombre de Yacaré irupé (*Victoria cruziana*). Sin embargo, a partir de julio de 2020 se registró un cambio en la coloración del agua a un rojo intenso, además de un olor fétido y la mortandad de plantas y animales acuáticos (Figura 2b).

## 2- Caracterización morfológica y densidad (cél/mL) de *Cyanotetras* sp.



**Figura 3.** Imágenes microscópicas de *Cyanotetras* sp. con un aumento de 100x capturadas mediante un microscopio invertido. a-Corresponde al punto de muestreo del Tajamar natural de Loma Plata (P1), b-Pertenece a la muestra de la Laguna Cerro (P2) del municipio de Limpio

Las muestras fueron analizadas mediante microscopía convencional e invertida para determinar las características morfológicas. Se pudo constatar la mayor densidad de un solo género de cianobacteria, observándose colonias microscópicas, libres, planas, con mucílago envolvente homogéneo. Presentaron células ovales, dispuestas en colonias de 2, 4, 16 y 32 células, pero sin un espacio cuadrangular central, y unidas mediante masa gelatinosa característica del género *Crucigenia*. En cuanto a las dimensiones, las células ovales fueron de 1,5 - 2,5  $\mu\text{m}$  x 1,2 - 1,8  $\mu\text{m}$ ; otra característica fue el color pálido azul verdoso brillante, sin vesículas de gas, cloroplastos y pirenoides (Figura 3). Por lo tanto, con base en las características

morfológicas registradas, las colonias fueron identificadas como pertenecientes al género *Cyanotetras*, de la familia Merismopediaceae (Hindák, 1988; Komárek y Anagnostidis, 2000; Komárek y Fott, 1983).

Con relación a la densidad, en la primera muestra (P1) la concentración total de *Cyanotetras* fue 1.065.000 células/mL, mientras que en la segunda muestra (P2) fue 5.504.000 células/mL. En ambos casos, la mayor abundancia fue para este género, al cual pueden atribuirse las floraciones originadas por el exceso de nutrientes como veremos en el siguiente apartado. Además de la capacidad de realizar fotosíntesis, las cianobacterias también pueden sintetizar toxinas o cianotoxinas que, dependiendo de su

concentración y tiempo de exposición, pueden llegar a ser letales para humanos y animales. Por lo tanto, teniendo en cuenta lo establecido por la OMS (Organización Mundial de la Salud), en función a la concentración de cianobacterias (>100.000 cél/mL) nivel de aler-

ta 2, se recomendó evitar todo tipo de contacto directo con el agua, ya sea para recreación o para el consumo humano y de animales, debido al alto riesgo de exposición a las cianotoxinas (Chorus, 2005; Falconer *et al.*, 1999; Sivonen y Jones, 1999).

**3- Parámetros fisicoquímicos condicionantes de la floración de *Cyanotetras* sp.**

**Tabla 2.** Listado de parámetros fisicoquímicos determinados en los dos puntos de muestreo. Ref.: NTK (Nitrógeno Total Kjeldahl); DBO5 (Demanda Bioquímica de Oxígeno) y DQO (Demanda Química de Oxígeno)

Parámetros	Unidad de medida	Resultados		Promedio	Desviación Estándar	C.V.	Límites Res. 222/02*
		P1	P2				
Temperatura de agua	°C	25	20	22,5	3,54	31,8	Sin límite
Oxígeno Disuelto	mg.L <sup>-1</sup>	1,33	0,61	0,97	0,509	4,57	< 5
pH	Unidad de pH	7,67	7,79	7,73	0,0849	0,762	6 a 9
Conductividad	µS.cm <sup>-1</sup>	9.890	11.240	10.565	955	8.577	Sin límite
Fósforo total	mg.L <sup>-1</sup>	5,29	1,97	3,63	2,35	21,1	0,05
NTK	mg.L <sup>-1</sup>	21,8	119	70,4	68,7	617,5	0,6
Nitrógeno de Nitratos	mg.L <sup>-1</sup>	3,11	14,65	8,88	8,16	73,3	10
Nitrógeno Amoniacal	mg.L <sup>-1</sup>	0,41	90,8	45,605	63,9	574,3	0,02
DBO5	mg.L <sup>-1</sup>	57	65	61	5,66	50,8	0,1
DQO	mg.L <sup>-1</sup>	448	1.098	773	459,6	4.129,5	5,0
Sulfatos	mg.L <sup>-1</sup>	2.453	94,3	1.274	1.668	14.985	1

En relación a los parámetros fisicoquímicos, los resultados laboratoriales obtenidos indicaron que, en ambos casos, corresponden a ecosistemas eutrofizados

debido a la elevada concentración de nutrientes tanto en P1 (NT=21,8 mg.L<sup>-1</sup> y PT=5,29 mg.L<sup>-1</sup>) como en P2 (NT=119 mg.L<sup>-1</sup> y PT=1,97 mg.L<sup>-1</sup>). Además, es-

tos valores superaron los límites establecidos para aguas superficiales del país, según las normativas vigentes del MADES. También presentaron valores fuera del límite establecido el Oxígeno Disuelto (OD), Nitrógeno amoniacal, DBO5, DQO y sulfatos (Resolución-Nº-255/06, 2006; Resolución-Nº-222/02, 2002). Por otro lado, la baja concentración del OD pudo ocasionar la mortandad de peces y de macroinvertebrados, mientras que la elevada concentración de sales la mortandad de las plantas acuáticas, observadas en la Laguna Cerro del distrito de Limpio.

El primer punto de muestreo (P1) corresponde a un ecosistema acuático que, por lo general, tiene agua dulce. Sin embargo, luego de un extenso periodo de sequía el agua se fue evaporando y debido a las características del suelo, la concentración de sales fue aumentando (Paerl *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021). Teniendo en cuenta que el agua se destinaba al consumo del ganado, era de esperarse que la concentración de material orgánico también se concentre a medida que aumentaba la evaporación (Tabla 2), lo cual podría haber generado las características de un cuerpo de agua eutrofizado (Zou *et al.*, 2020).

En cuanto al segundo punto (P2), las características del agua fueron cambiando probablemente como consecuencia de la falta de tratamiento adecuado de los efluentes generados por las actividades antropogénicas desarrolladas en zonas cercanas a la laguna. Al parecer, el causante del proceso de eutrofización fue el aporte de material orgánico proveniente del desecho de las curtiembres circundantes al cuerpo de agua (Tabla

2). En relación a la salinidad, pudo deberse al aporte de sales empleadas para curtir el cuero, que fueron aumentando gradualmente su concentración. Todas estas alteraciones crearon condiciones similares a las de la laguna de Loma Plata (Paerl *et al.*, 2020).

Por lo tanto, en ambos casos se generaron condiciones similares a ecosistemas acuáticos salobres eutrofizados, los cuales habrían favorecido el desarrollo de las *Cyanotetras*, ya reportadas en ambientes lénticos (Komárek y Anagnostidis, 2000; Komárek y Komárková-Legnerová, 2002). También, la mayor concentración de nutrientes pudo estar relacionada con la mayor densidad de *Cyanotetras* sp. reportada en el punto P2 (Tabla 2). Además, las especies de este género podrían sintetizar dos tipos de toxinas anatoxinas (neurotoxina) y microcistina (hepatotoxina) (Christensen y Khan, 2020; Gomez *et al.*, 2012; Juanena *et al.*, 2020). Por esta razón, se puede considerar que dicho género, y su presencia en procesos de floración, constituye un riesgo a nivel ambiental y de salud pública (Paerl *et al.*, 2020).

En cuanto al cambio de la coloración del agua, una de las hipótesis estaría relacionada con un compuesto orgánico volátil sintetizado por las cianobacterias, conocido como  $\beta$ -ciclocitral. Este compuesto tiene una actividad lítica y se ha reportado que está relacionado con la degradación de los pigmentos presentes en estas bacterias. También se demostró que en algunos casos produce la oxidación completa de la clorofila a y de los Betacarotenos, mientras que las ficocianinas permanecen estables dando un color azul. En otros géneros pueden darse

diferentes grados de oxidación de la ficoeritrina, con diferentes tipos de color rojo y rosado. El primer caso se ha reportado en aguas con un pH de 5,5 a 6,5, mientras que en este estudio, el pH permaneció neutro, lo cual podría explicar que pudo ocurrir el segundo caso, con la consecuente aparición de diferentes tonos de color rojo (Harada *et al.*, 2009; Tomita *et al.*, 2016).

## CONCLUSIONES

Ambos cuerpos de agua que presentaron cambios en su coloración se encuentran ubicados en diferentes regiones del país con características ecológicas distintas. Sin embargo, al realizar las determinaciones fisicoquímicas y biológicas, se logró determinar que presentaron condiciones de un ecosistema salobre eutrofizado, lo cual ocasionó la floración por el género *Cyanotetras* sp. perteneciente a las cianobacterias. Una consideración importante a destacar, en cuanto al primer punto de muestreo (P1) ubicado en la Región Occidental es que, la floración se produjo en forma natural, mientras que en el segundo (P2) de la Región Oriental fue debida al aporte de contaminantes provenientes de las actividades industriales aledañas al cuerpo de agua, no tratados de manera adecuada. En relación a la coloración, pudo deberse a la degradación parcial del pigmento ficoeritrina ocasionado por un compuesto orgánico ( $\beta$ -ciclocitral) que sintetizan las cianobacterias, con actividad lítica. Para confirmar esta hipótesis, se requerirá realizar más estudios, así como la cuantificación de las posibles cianotoxinas presentes que son de inte-

res ambiental y de salud pública.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA, A., WEF. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (22 ed.). Washington, DC: American Public Health Association.
- Benítez Rodas, G. A., Villalba Duré, G., Ávalos de Enciso, C. A., Araujo Florentín, C. M., Acosta Brítez, R. R., Escobar, Astigarraga, O., Peralta López, I., & Cardozo Román, C. (2017). Influencia de factores fisicoquímicos sobre la biodiversidad de cianobacterias en el Lago Ypacaraí durante el periodo 2012-2014. *Steviana*, 9(2), 15-25.
- Cabrera Di Piramo, C. (2015). Optimización de usos del suelo para prevenir floraciones nocivas de fitoplancton en la Laguna de Rocha, Uruguay. Maestría Tesis de Maestría en Geociencias, Universidad de la República, Uruguay, Uruguay.
- Conti, A., Rodríguez, M., & Angelaccio, C. (2005). Ocurrencia de Cianobacterias 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.
- Chorus, I. (2005). Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Berlin, Ger-

- many: Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt).
- Christensen, V. G., & Khan, E. (2020). Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin. *Science of The Total Environment*, 139515. De Domitrovic, Z., Forastier, Y., & Marina, E. (2005). Cyanophyceae (Cyanobacteria) del nordeste argentino: distribución y diversidad. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005. Corrientes, Argentina.
- Edler, L., & Elbrächter, M. (2010). The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. In C. C. a. E. B. Bengt Karlson (Ed.), *Microscopic and Molecular Methods for Quantitative Phytoplankton Analysis* (pp. 114). España: UNESCO - Intergovernmental Oceanographic Commission.
- Falconer, I. R., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper-Goodman, T., Utkilen, H., Burch, M., & Codd, G. A. (1999). Chapter 5. SAFE LEVELS AND SAFE PRACTICES In I. Chorus & J. Bartram (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management* WHO. London - Great Britain: E & FN Spon.
- Franco, L. C., & Saldívar, S. (2015). Construcción y puesta en funcionamiento de las sede central, administrativa, taller y deposito—H. Petersen. Asunción: Secretaria del Ambiente (SEAM) Retrieved from. [http://mades.gov.py/sites/default/files/users/control/petersen\\_samuel.j.pdf](http://mades.gov.py/sites/default/files/users/control/petersen_samuel.j.pdf)
- Gomez, L., Álvarez, I., & Rodríguez, J. C. (2012). CUBA: Toxic cyanobacteria risk assessment, research and management. In D. I. Chorus (Ed.), *Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries* (pp. 40). Dessau-Roßlau, Germany: Federal Environment Agency, Germany.
- Haider, S., Naithani, V., Viswanathan, P. N., & Kakkar, P. (2003). Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Pergamon*, 52, 1-21.
- Harada, K.-I., Ozaki, K., Tsuzuki, S., Kato, H., Hasegawa, M., Kuroda, E. K., Arii, S., & Tsuji, K. (2009). Blue Color Formation of Cyanobacteria with  $\beta$ -Cyclocitral. *Journal of Chemical Ecology*, 35(11), 1295-1301. doi: 10.1007/s10886-009-9706-5
- Henry, R. (1990). Amônia ou fosfato como agente estimulador do crescimento do fitoplâncton na represa de Jurumirim (Rio Paranapanema, SP). *Rev. Brasil. Biol.*, 50(4), 883-892.
- Hindák, F. (1988). Contribution to the taxonomy of some cyanophyte genera. *Preslia*, 60, 289-308.
- Juanena, C., Negrin, A., & Laborde, A. (2020). Cianobacterias en las playas: riesgos toxicológicos y vulnerabilidad infantil. *Revista Médica Uruguay*, 36(3), 157-18.

- Komárek, J., & Anagnostidis, K. (2000). Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales Süßwasserflora Von Mitteleuropa Band 19/1, Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales: Spectrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 548p.
- Komárek, J., & Fott, B. (1983). Das Phytoplankton des Süßwassers. Alemania: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- Komarek, J., & Komárková-Legnerová, J. (2002). Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central Mexico. *PRESLIA-PRAHA*, 74, 207-234.
- Larroza, F. A., & Centurión, C. (1995). Estudio hidrogeológico e hidroquímico del agua freática en el área urbana de Loma Plata, Chaco Paraguayo. . *Águas Subterráneas* 17.
- López-González, C. (2004). Ecological zoogeography of the bats of Paraguay. *Journal of Biogeography*, 31(1), 33-45. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2004.00940.x>
- López Moreira M., G. A., Hinegk, L., Salvadore, A., Zolezzi, G., Hölker, F., Monte Domecq S., R. A., Toffolon, M. (2018). Eutrophication, Research and Management History of the Shallow Ypacaraí Lake (Paraguay). *Sustainability*, 10(7), 2426.
- Lu, X., Tian, C., Pei, H., Hu, W., & Xie, J. (2013). Environmental factors influencing cyanobacteria community structure in Dongping Lake, China. *Journal of Environmental Sciences*, 11, 2196-2206.
- Méndez, S., & Ferrari, G. (2002). Floraciones algales nocivas en Uruguay: Antecedentes, proyectos en curso y revisión de resultados. Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano. In E. A. Sar, M.E. Ferrario & B. Reguera (Ed.), (pp. 271-288): Instituto Español de Oceanografía.
- Paerl, H. W., Havens, K. E., Xu, H., Zhu, G., McCarthy, M. J., Newell, S. E., Scott, J. T., Hall, N. S., Otten, T. G., & Qin, B. (2020). Mitigating eutrophication and toxic cyanobacterial blooms in large lakes: The evolution of a dual nutrient (N and P) reduction paradigm. *Hydrobiologia*, 847(21), 4359-4375. doi: 10.1007/s10750-019-04087-y
- Secretaría del Ambiente. (2006). Resolución-Nº-255/06. "Por la cual se establece la clasificación de las aguas superficiales de la República del Paraguay".
- Secretaría del Ambiente. (2002). Resolución-Nº-222/02. Por la cual se establece el padrón de calidad de las aguas en el Territorio Nacional.
- Sivonen, K., & Jones, G. (1999). Chapter 3. CYANOBACTERIAL TOXINS. In I. C. a. J. Bartram (Ed.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management* WHO. London - Great Britain: E & FN Spon.
- Tomita, K., Hasegawa, M., Arii, S., Tsuji, K., Bober, B., & Harada, K.-i. (2016). Characteristic oxidation behavior of  $\beta$ -cyclocitral from

the cyanobacterium *Microcystis*.  
Environmental Science and Pollution Research, 23(12), 11998-12006. doi: 10.1007/s11356-016-6369-y

Zhao, F., Zhan, X., Xu, H., Zhu, G., Zou, W., Zhu, M., Kang, L., Guo, Y., Zhao, X., Wang, Z., Tang, W. (2021). New insights into eutrophication management: Importance of temperature and water residence time. *Journal of Environmental Sciences*, 111, 229-239. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.02.033>

Zou, W., Zhu, G., Cai, Y., Xu, H., Zhu, M., Gong, Z., Zhang, Y., & Qin, B. (2020). Quantifying the dependence of cyanobacterial growth to nutrient for the eutrophication management of temperate-subtropical shallow lakes. *Water Research*, 177, 115806. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115806>

# Efecto de *Campyloneurum phyllitidis* (L.) C. Presl y de *Asplenium serratum* L. sobre el desarrollo embrionario de *Danio rerio*

Benítez Acuña, J.A<sup>1-3</sup>; Ibarra, P<sup>2</sup>; López, T<sup>4</sup> y Segovia, E<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Hidrobiología. San Lorenzo, Paraguay

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Laboratorio de Química y Toxicología. San Lorenzo, Paraguay

<sup>3</sup> Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Laboratorio de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay

<sup>4</sup>Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biotecnología Ambiental

\*E-mail del autor: edith.segovia@cemit.una.py; edaluz@gmail.com

---

**Evaluación de *Campyloneurum phyllitidis* (L.) C. Presl y de *Asplenium serratum* L. sobre el desarrollo embrionario de *Danio rerio*.** Las plantas de uso medicinal *Campyloneurum phyllitidis* y *Asplenium serratum* se utilizan en la medicina popular como abortivas. El objetivo de este trabajo fue evaluar los extractos acuosos de *Campyloneurum phyllitidis* y *Asplenium serratum* L sobre el desarrollo embrionario de pez cebra (*Danio rerio*) para determinar sus posibles efectos tóxicos. Se utilizaron huevos de 4 hpf (horas pos fecundación) y cuatro concentraciones (0,03%, 0,06%, 0,125% y 0,25%) de extracto de cada planta medicinal, como control positivo se utilizó cafeína 2,4 mM; se los expuso por cinco días y se evaluaron parámetros agrupados en tres categorías: Efecto letal (coagulación de los embriones), efecto subletal (ausencia de formación de los somitas, latidos cardiacos, circulación sanguínea, pigmentación, eclosión, formación de edema, retardo del desarrollo) y efecto teratogénico (deformación de la columna vertebral). En la evaluación de *C. phyllitidis* se observó que el efecto letal fue significativo a las dosis de 0,125 y 0,25%, no se observó algún efecto subletal o teratogénico significativo, ya que entre el 90% y el 100% de los embriones, respectivamente, coagularon. En la evaluación de *A. serratum* se observó que el efecto letal fue significativo a la dosis de 0,25%, los efectos subletales fueron significativos a 0,06 y 0,125% (ausencia de somitas, ausencia de latidos, ausencia de circulación y ausencia de pigmentos); el efecto teratogénico no fue significativo. *C. phyllitidis* presentó un efecto letal (coagulación del embrión), mientras que *A. serratum* presentó efectos significativos sobre el desarrollo, además se registró efecto teratogénico, no significativo.

**Palabras clave:** Plantas medicinales, teratogénesis, *Danio rerio*

**Evaluation of *Campyloneurum phyllitidis* C. Presl and *Asplenium serratum* L. on the embryonic development of *Danio rerio*.** The medicinal plants *Campyloneurum phyllitidis* and *Asplenium serratum* are used in popular medicine as abortifacient. The aim of this work was to evaluate the aqueous extracts of *Campyloneurum phyllitidis* and *Asplenium serratum* L. on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) to determine their possible toxic effects. Eggs of 4 hpf (hours after fertilization) and four concentrations (0.03%, 0.06%, 0.125% and 0.25%) of each medicinal plant were used; 2.4 mM caffeine was used as a positive control. They were exposed for five days, and parameters grouped into three categories were evaluated: Lethal effect (embryo coagulation), sub-lethal effect (absence of somite formation, heartbeat, blood circulation, pigmentation, hatching, edema formation, developmental delay), and teratogenic effect (deformation of the spine). In the evaluation of *C. phyllitidis* it

was observed that the lethal effect was significant at the doses of 0.125 and 0.25%, no significant sub-lethal or teratogenic effect was observed, since between 90% and 100% of the embryos, respectively, coagulated. In the evaluation of *A. serratum* it was observed that the lethal effect was significant at the dose of 0.25%, the sub-lethal effects were significant at 0.06 and 0.125% (absence of somites, absence of heartbeats, absence of circulation and absence of pigments); the teratogenic effect was not significant. *C. phyllitidis* had a lethal effect (embryo coagulation), while *A. serratum* had significant effects on development, and a non-significant teratogenic effect was also recorded.

**Keywords:** Medicinal plants, teratogenesis, *Danio rerio*

## INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son utilizadas por el 80% de la población mundial (Soares-Bezerra *et al.*, 2013). Entre estos usos se encuentra el control de la fertilidad humana, donde extractos de plantas medicinales producen efectos como inhibición de la ovulación, la implantación del óvulo, actúa como emenagogo, entre otros efectos (Kumar *et al.*, 2012).

*Campyloneurum phyllitidis* (L.) Presl. Pertenece a la familia Polypodiaceae, es una hierba epífita o terrestre; presenta rizomas cortos, escamosos; peciolo corto; lámina monomorfa, entera, coriácea, glabra, venas areoladas, soros circulares, sin indusio, en varias filas entre la costa y el margen; se distribuye desde Estados Unidos hasta Bolivia y Brasil (Peña-Chocarro *et al.*, 1999), en el Paraguay se encuentra en los departamentos de Alto Paraná, Central, Cordillera, Itapúa y Paraguari, (Pin *et al.*, 2009).

*Asplenium serratum* (L.) C. Presl es una planta de uso medicinal, pertenece a la familia Aspleniaceae, es una especie epífita, a veces terrestre, con hojas simples, soros en líneas continuas paralelas a los nervios de las hojas, que comúnmente crece sobre troncos muertos (Fundación Moisés Bertoni, 2006) y se distribuye desde el sur de Florida hasta

Argentina y Paraguay (Peña-Chocarro *et al.*, 1999). Presenta rizomas erectos, robustos, cortos a medianos cubiertos densamente por escamas castañas a castaño-oscuros, lanceoladas, con ápice agudo a largamente acuminado, en el ápice del rizoma y la base de los peciolos (Ponce *et al.*, 2016). Presenta 5-20 frondes por rizoma, erectas, fasciculados, generalmente en roseta; peciolos cortos, de 2-7 cm de largo, surcados adaxialmente, no alados, pardo-verdosos en el lado adaxial a pardo oscuros en el abaxial. Láminas simples, enteras, lanceoladas, de 20-110 x 4-16 cm, atenuadas hacia la base, ápice acuminado, margen subentero a aserrado, cartáceas, verde claras a oscuras, con escasas escamas sobre la costa, costa nigrescente. Soros cercanos a la costa, paralelos, lineares, de 5-50 mm de largo; indusios lineares, membranáceos a coriáceos, hialinos. Esporas de 40-43 x 28-30  $\mu\text{m}$ , con perisporio alado-dentado, con abundantes pliegues parcialmente fusionados, perforaciones ocasionales (Ponce *et al.*, 2016). Ambas especies, anteriormente descritas, son utilizadas, en el Paraguay, como abortivos (Fernández *et al.* 1999) (**Figura 1**); el extracto acuoso de *C. phyllitidis* también se utiliza como antiinflamatorio, expectorante, en la medicina popular (Pin *et al.*, 2009, Degen de Arrúa *et al.* 2014). En un trabajo rea-

lizado por Fernández *et al.* (1999), se analizó la acción de *Campyloneurum phyllitidis* y *Asplenium serratum* sobre el ciclo replicativo celular utilizando como modelo de estudio *Allium cepa* L.,

donde *Asplenium serratum* redujo el índice mitótico concluyendo que es ciclo activo a diferencia de *Campyloneurum phyllitidis*, el cual no mostró diferencias significativas.



**Figura 1:** A. *Asplenium serratum*. B. Detalle de soros de *Asplenium serratum*. C. *Campyloneurum phyllitidis*. D. Detalle de soros de *Campyloneurum phyllitidis*

El ensayo en embriones de pez cebra (*Danio rerio*), es de fácil mantenimiento, económica y podría reducir el uso de animales en la investigación (Yang *et al.*, 2009). No existen reportes, de las especies descritas, de datos sobre sus efectos secundarios tóxicos, en mamíferos u otros organismos. Los ensayos biológicos son herramientas de evaluación del potencial tóxico, ya que estos son adecuados para la determinación del efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas (Castillo Morales y Morales, 2004). El pez cebra (*Danio rerio*) es un vertebrado de la clase Actinopterygii, de la familia Cyprinidae que se distribuye ampliamente por el sudeste asiático (India, Bangladesh, Nepal, Myanmar y Pakistan) (Espinosa, 2016). Es de tamaño pequeño, de fácil manejo en el laboratorio, genera un elevado número de proge-

nie y se ha convertido en un modelo importante, principalmente para los estudios genéticos (Pierce, 2010). Embriones de pez cebra (*Danio rerio*) se utilizan como modelo de estudio del efecto de agentes químicos, físicos o biológicos sobre el desarrollo embrionario inicial en vertebrados (OECD, 2013) y puede ser utilizado para evaluar extractos acuosos de plantas de uso medicinal (Zainol Abidin *et al.*, 2020; Thiagarajan *et al.*, 2019). De acuerdo con Nagel (2002), los parámetros evaluados en *Danio rerio* pueden ser letales, sub letales o teratogénicos y los mismos fueron utilizados en este trabajo. Considerando el uso en el control de la natalidad de ambas plantas descritas, y ante la falta de estudios sobre el desarrollo embrionario, el objetivo de este trabajo fue analizar el potencial tóxico de los extractos acuosos de estas especies en embriones del modelo biológico, el pez cebra, mediante la evalua-

ción de parámetros letales, sub letales y/o teratogénicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Los ejemplares de estudio fueron colectados del vivero etnobotánico-medicinal del Jardín Botánico de la ciudad de Asunción (25°14'45,4''S, 57°34'11,6''W), en el mes de octubre de 2017. Se colectaron hojas de varios individuos de cada especie. Las especies se encontraban en un jardín cultivado de suelo arenoso, con media sombra, de hábito terrestre y presentaban hojas fértiles. Se depositó un ejemplar de cada especie, en el herbario de FACEN-UNA (Colectas 01 y 02. Benítez Acuña, J.A).

### Extracción acuosa de *C. phyllitidis* y *A. serratum*

Las hojas de ambas especies se congelaron en nitrógeno líquido y se licuaron en una licuadora industrial para obtener partículas pequeñas. Se utilizaron 76,4 g de hojas de *C. phyllitidis* y 153,7g de hojas de *A. serratum*. Las hojas fueron pulverizadas y se agregó, a cada muestra, 1,5L de agua destilada que se calentó evitando la ebullición, luego se filtró, y las infusiones fueron concentradas mediante evaporación en un rotavapor EYELA SB-1000. Se almacenó a -20°C cada muestra, hasta la liofilización en un Liofilizador LABCONCO FreeZone.

### Mantenimiento de pez cebra

Los peces fueron obtenidos de acuarios comerciales y se aclimataron por 3 meses en el Laboratorio de Hidrobiolo-

gía del Departamento de Biología (FACEN-UNA). La temperatura promedio en cada pecera fue de 28°C y pH de 8.

### Obtención de huevos fecundados

Para la obtención de los huevos se separaron parejas de 2x2 (dos hembras y dos machos) un día antes de la colecta de los huevos, que fueron recogidos utilizando una pipeta Pasteur y examinados bajo microscopio óptico con un aumento de 40x para descartar los huevos no fecundados o los que se encuentren en mal estado. Los huevos fueron expuestos a las 6 horas pos fecundación. La dilución de las concentraciones de cada extracto evaluadas se realizó en Medio para Embrión.

### Medio para embrión utilizado

Solución: (0,358 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhidro) y 0,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mL H<sub>2</sub>O (1%), 8 g NaCl y 0,4 g KCl, 100 mL H<sub>2</sub>O (1%), 0,35 g NaHCO<sub>3</sub>, 10 mL H<sub>2</sub>O (1%), 1,23 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 50 mL H<sub>2</sub>O (1%), 0,72 g CaCl<sub>2</sub>, 50 mL H<sub>2</sub>O (1%), 95,9 mL de agua) (Westerfield, 2000).

### Exposición de los embriones a los extractos

Para el ensayo de toxicidad se tuvo en cuenta la guía de ensayo 236 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE, 2013) y al protocolo propuesto por Martínez-Jerónimo & Espinosa Chávez, (2008).

### Tratamientos

Los huevos fueron expuestos a cuatro concentraciones en placas de 96 pocillos, utilizándose 10 pocillos por con-

centración, con un huevo por pocillo, en 200µL. Las concentraciones analizadas fueron 0,03; 0,06; 0,125 y 0,250% de cada planta, peso/200 µL. Como control negativo se utilizó el medio embrión y como control positivo cafeína (2,4 mM), diluido en el mismo medio. El ensayo se realizó por triplicado, tomando como réplica una placa con las 4 concentraciones de prueba y los dos controles, 10 huevos por tratamiento, 60 por placa para cada planta. Las réplicas se realizaron en diferentes tiempos. Todos los embriones fueron controlados a las 24, 48, 72, 96 y 144 horas en microscopio óptico con un aumento de 40x y se registraron las observaciones de los efectos; coagulación-efecto letal (24 y 48 h) y ausencia de somitas (24hpf), ausencia de latidos y de circulación (48 hpf), ausencia de pigmentos y formación de edema (72 hpf), deformación de la columna (96 y 144

hpf), de acuerdo a Nagel (2005).

### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y el Test de Tukey, utilizando el software para el análisis estadístico (SPSS 21), considerando estadísticamente significativo un valor  $P \leq 0,05$ .

### RESULTADOS

Para evaluar el efecto tóxico del extracto acuoso de *C. phyllitidis*, y de *A. serratum*, en embriones de pez cebra fueron tratados con 4 concentraciones de cada extracto. Los efectos fueron evaluados a las 24, 48, 72, 96 y 144 hpf, tiempos donde se pueden observar efectos letales, subletales y teratogénicos (**Figura 2**).



**Figura 2:** Desarrollo normal del embrión de *Danio rerio* en medio embrión (Control negativo) en 6 tiempos, control positivo y tratado con *C. phyllitidis*: **A**, 4 hpf; **B**, 24 hpf; **C**, 48 hpf; **D**, 72 hpf; **E**, 96 hpf; **F**, 144 hpf. **G**, deformación de la columna vertebral y formación de edema, 72 hpf (Cafeína: control positivo). **H**, Huevo coagulado, 24 hpf (*C. phyllitidis* 0,06%)

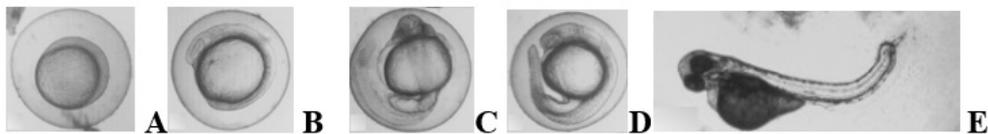
En la **Figura 2** se pueden observar los distintos estadios normales de las primeras 144 hpf (horas pos fecundación) del control negativo, mantenido en el Medio para Embrión. En la **Figura 2.A** se observa un huevo de 4 hpf, al momento de iniciar el ensayo; en **2.B** se observa un embrión de 24 hpf, la presencia de somitas y la ausencia de pigmentación; en **2.C**, a las 48 hpf, se observa la presencia de pigmentación en los ojos y el cuerpo, además se registran otros parámetros

como como el latido cardíaco y la circulación sanguínea, no posibles de visualizar en fotografías; en **2.D**, a las 72 hpf, se produce la eclosión de los embriones, en **2.E** y **2.F** se puede observar mayor cantidad de pigmento y menor tamaño del vitelo, además un tamaño general superior. En la **Figura 2.G** se observa el efecto del tratamiento de un embrión con cafeína (control positivo), donde el embrión presenta una deformación de la columna y la formación de edema. Varias

drogas como la cafeína producen retardo en el desarrollo, se observan los efectos de la cafeína a una concentración de 2,4 mM y se puede apreciar una curvatura en la columna vertebral y un doblamiento de la cola además de la formación de edema, en los embriones pertenecientes a este grupo no se registró circulación sanguínea. Los tratamientos con *C. phyllitidis* tuvieron un efecto letal sobre los embriones de *D. rerio*. En la **Figura 2.H** se observa un huevo coagulado (efecto letal), tratado con la menor concentración de *C. phyllitidis*. La letalidad aumentó a concentraciones mayores, registrándose diferencias significativas en los tratamientos de 0,125% y 0,25%. El 100% de los huevos coagularon en la concentración de 0,25%. Los números indican la cantidad de huevos coagulados en cada grupo experimental, por triplicado. La menor cantidad de huevos coagulados se observó en los embriones del control negativo y el número mayor, 100%, en el tratamiento de concentra-

ción 0,25%, tanto a las 24 como 48h. No se observó importante diferencia entre los días, es decir, a las 24 hpf resulta letal en forma definitiva, solo en el tratamiento de concentración 0,125% se observó una variación (datos no mostrados). En la evaluación de los efectos sub letales, los parámetros evaluados resultaron no significativos (**Tabla 1**).

En la **Figura 3** se observan los efectos de los tratamientos, con diferentes concentraciones, de *A. serratum*. En **3.A** se observa un embrión sin formación de somita. En la **Figura 3.B** se observa un embrión de 24 hpf con retardo en el desarrollo y retardo en la formación de somitas, al compararlo con el control negativo (1.B) (**Figura 2B**), en **3.C** se observa la ausencia de pigmentos, en **3.D** se observa la formación de edema y en **3.E** se observa la deformación de la columna, que se observó en tres embriones tratados con la concentración más alta del extracto.



**Figura 3:** Efectos letales, subletales y teratogénicos en embriones de *Danio rerio* tratados con diferentes concentraciones de *A. serratum*. **A**, Ausencia de la formación de somitas, 24 hpf (0,125%); **B**, Retardo del desarrollo y en la formación de somitas, 24 hpf (0,03%); **C**, Ausencia de pigmentos, 72 hpf (0,06%); **D**, Formación de edema, 72 hpf (0,06%); **E**, deformación de la columna vertebral, 144 hpf (0,06%).

En la **Tabla 2** se presenta el resumen de los parámetros evaluados en los diferentes tiempos de estudio de los efectos del extracto acuoso de *A. serratum*. Se agruparon en tres categorías, letal (coagulación, ausencia de la formación de somitas, ausencia de latidos cardia-

cos), subletal (ausencia de circulación sanguínea, ausencia de pigmentación y formación de edema) y teratogénico (deformación de la columna vertebral). La coagulación se evaluó a las 24h, resultando no significativa y a las 48h, cuando ya fue significativa y el 100%

de los huevos coagularon en el mayor tratamiento. Se observa diferencia significativa para los parámetros ausencia de formación de somitas, ausencia de latidos cardiacos, ausencia de circulación y ausencia de pigmentos, con valores

significativos a partir de la concentración de 0,060% (significativo), cuando comparados con el control negativo. Se observaron tres embriones con deformación de la columna, en la concentración de 0,060%.

**Tabla 1.** Efecto letal, subletal y teratogénico de *C. phyllitidis* sobre embriones de *Danio rerio*

Categoría	Parámetro	Controles		Tratamientos			
		C+	C-	0,030	0,060	0,125	0,250
Letal	Coagulación	10/30	2/30	7/30	18/30	27/30*	30/30*
	Ausencia de somita	6/26	0	4/23	0/12	2/6	-
	Ausencia de latidos	2/20	0	0	0	0	-
Subletales	Ausencia de circulación	20/20*	0	0	0/12	2/3	-
	Ausencia de pigmentos	1/20	0	1/23	0/12	1/2	-
	Formación de edema	20/20*	0	0	0	0	-
Teratogénico	Deformación de la columna	20/20*	0	0	0	0	-

C- : control negativo. C+: control positivo. “/”: el efecto se calcula sobre el total (en el caso de coagulación) o sobre los sobrevivientes. \*Estadísticamente significativo

## DISCUSIÓN

Considerando que los extractos acuosos de *C. phyllitidis* y *A. serratum* se utilizan, durante la gestación humana, como abortivos y ambas especies vegetales presentan características similares (Pin *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 1999) y ante el desconocimiento de los efectos

secundarios de las plantas de uso medicinal *C. phyllitidis* y *A. serratum* sobre el embrión, se realizó un estudio de sus posibles efectos tóxicos y teratogénicos en embriones de *Danio rerio*. En un ensayo previo, se evaluaron las posibles concentraciones de estudio, el polvo obtenido de la liofilización de cada extracto se suspendió en el Medio para Embrión, en

**Tabla 2.** Efecto letal, subletal y teratogénico de *A. serratum* sobre embriones de *Danio rerio*

Categoría	Parámetro	Controles		Tratamientos			
		C+	C-	0,030	0,060	0,125	0,250
Letal	Coagulación	09/30	2/30	4/30	0	6/30	30/30*
	Ausencia de somita	0	0	4/26	23/30*	26/27*	-
	Ausencia de latidos	01/20	0	0	29/30*	24/24*	-
Subletales	Ausencia de circulación	21/21*	0	0	29/30*	24/24*	-
	Ausencia de pigmentos	00/20	0	0	27/30*	24/24*	-
	Formación de edema	21/21*	0	0	6/30	0	-
Teratogénico	Deformación de la columna	21/21*	0	0	3/30	0	-

C- : control negativo. C+: control positivo. “/”: el efecto se calcula sobre el total (en el caso de coagulación) o sobre los sobrevivientes. \*Estadísticamente significativo

concentraciones de 0,5%, 1% y 2,5%, de acuerdo a Fernández *et al.* (1999). Todos los tratamientos resultaron letales a estas concentraciones, por lo que en este trabajo se evaluaron concentraciones menores. El modelo biológico *Danio rerio* se utiliza para evaluar efectos tóxicos o teratogénicos de agentes químicos (Chahardehi *et al.*, 2000; Veeren *et al.*, 2021).

Para la realización de este trabajo se siguieron las guías de la OECD (2013). El extracto acuoso de *C. phyllitidis* es utilizado en la medicina popular, como emenagogo, anticonceptivo y abortivo, expectorante, sedante, antiinflamatorio (Pin *et al.*, 2009; Degen de Arrúa y Gon-

zález, 2014). No se registran en la literatura científica efectos sobre estados patológicos o sobre su uso seguro en individuos sanos o mujeres embarazadas.

En este trabajo evaluamos los posibles efectos tóxicos en embrión de *Danio rerio* a fin de determinar la inocuidad del extracto acuoso de esta planta durante el desarrollo embrionario. Al analizar los embriones del ensayo se observó que los embriones del control negativo presentaron un desarrollo conforme a la literatura, con presencia de pigmentación de los ojos y el cuerpo, latido cardiaco y circulación sanguínea, conforme a los estadios del desarrollo normal de *Danio*

*rerio* (Nagel, 2002), mientras que los resultados obtenidos en los embriones tratados con cafeína (control positivo) coinciden con lo encontrado por Rodríguez *et al.* (2014), que observaron un fenotipo de cuerpo enroscado y retardo en el desarrollo para periodos cortos de exposición. El efecto de extracto acuoso de *C. phyllitidis*, planta de uso medicinal, fue analizado en embriones de *D. rerio* y se observó que el tratamiento no produjo efectos subletales, en ninguna de las concentraciones analizadas. Esto puede ser debido a que la letalidad de las concentraciones evaluadas, no permiten que los efectos subletales se observen (Reimers *et al.* 2004). Se observaron huevos coagulados, a las 24 y 48 hpf, a las concentraciones mayores, siendo este efecto significativo y proporcional al aumento de las concentraciones analizadas. Un huevo se considera coagulado al no observarse ninguna estructura clara en el embrión (Busquet *et al.*, 2008), este parámetro se evaluó a las 24 hpf y 48 hpf y es el único parámetro considerado como letal en el trabajo. Los tratamientos con las diferentes concentraciones resultaron no significativos en los demás parámetros evaluados. Ciertos parámetros como la no formación de los somitas (**Figura 3.B**), el no desprendimiento de la cola del vitelo o la ausencia de latidos cardíacos se pueden considerar letales luego de las 48 hpf, pero dentro de los ensayos de teratogenicidad para una mejor comparación con mamíferos solo se sugiere el punto final de coagulación como un efecto letal (Nagel, 2002).

En la evaluación de *A. serratum* no se observó ninguna malformación en los individuos del control negativo, se ob-

servó la coagulación de dos embriones (6,6%), que está de acuerdo con las recomendaciones de la OECD (2013). En los tratamientos de embriones con *A. serratum* no se observó un efecto letal significativo, en casi todas las concentraciones evaluadas, excepto la concentración de 0,250%, donde el total de los huevos tratados coagularon, pero el efecto no fue de tipo dosis dependiente. Al evaluarse los efectos subletales se observó que la ausencia de somitas, de latidos cardíacos, de circulación y de pigmentos fue significativa en las concentraciones mayores evaluadas. Los somitas son estructuras que se forman en la primera etapa del desarrollo del pez cebra, componentes del mesodermo y que aparecen a partir de las 10 horas post fecundación (hpf), y de las cuales se derivan el esqueleto axial, los músculos esqueléticos y parte de la dermis (Kimmel *et al.*, 1995; Rojas M. y Smok C., 2014), por lo que la ausencia de los somitas afecta todo el desarrollo del embrión. Las células pigmentadas derivan de la cresta neural, que es una población de células pluripotentes cuya formación ocurre temprano en el desarrollo de los vertebrados (Cedrona *et al.*, 2020), y la ausencia de estas células podría indicar efectos sobre el desarrollo de tejidos. Se observó un efecto teratogénico, no significativo, pero que podría indicar un potencial teratogénico en menores concentraciones. No se ha reportado el perfil fitoquímico de estas especies, por lo que se desconocen las posibles causas de sus efectos. El control positivo, cafeína, utilizado tanto en la evaluación de *C. phyllitidis* como de *A. serratum*, de manera independiente, tuvo efectos subletales,

con ausencia de circulación y formación de edema, que fueron significativos, así como el efecto teratogénico. Autores observaron que el tratamiento con cafeína afecta la angiogénesis en embriones de *D. rerio* (Yeh et al., 2012; Basnet et al., 2021). A este efecto sobre la angiogénesis podrían deberse los efectos observados en los embriones.

## CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto de plantas medicinales comercializadas como Kala-guala'i (*Campyloneurum phyllitidis* y *Asplenium serratum*) sobre el desarrollo embrionario de pez cebra (*Danio rerio*). *C.phyllitidis* presentó un efecto letal (coagulación del embrión), mientras que *A serratum* presentó efectos significativos sobre el desarrollo, además se registró efecto teratogénico, no significativo.

Se recomienda realizar otros estudios, para determinar el perfil fitoquímico de ambas especies y evaluar sus efectos en vertebrados como ratones, para determinar si uno a ambos extractos tiene efectos tóxicos sobre los embriones o comprometen su viabilidad. También se podrían realizar estudios in vitro en células humanas para determinar todos los posibles efectos sobre la salud humana.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Basnet R. M., Zizioli D., Muscò A., Finazzi D., Sigala S., Rossini E., Tobia C., Guerra J., Presta M., & Memo M. (2021). Caffeine Inhibits Direct and Indirect Angiogenesis in Zebrafish Embryos. *Int J Mol Sci.* May 3;22(9):4856. doi:

10.3390/ijms22094856.

Busquet F., Nagel R., Landenberg F. Von, Mueller S. O., Huebler N., & Broschard, T. H. (2008). Development of a New Screening Assay to Identify Proteratogenic Substances using Zebrafish *Danio rerio* Embryo Combined with an Exogenous Mammalian Metabolic Activation System (m Dar T). *Toxicological Sciences*, 104(1), 177–188. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn065>.

Castillo Morales, G., & Morales, G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=GD7->

Chahardehi A. M., Arsad H., & Lim V. (2000). Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Plants (Basel)*. Oct 12;9(10):1345. doi: 10.3390/plants9101345.

Cedrona V.P., Weinerb A. M. J., Vera M., & Sanchez L. (2020). Acetaminophen affects the survivor, pigmentation and development of craniofacial structures in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Biochemical Pharmacology* 174. 113816.

Yeh C.H., Liao Y.F., Chang C.Y., Tsai J. N., Wang Y.H., Cheng C. C., Wen C. C., & Chen Y. H. (2012). Caffeine treatment disturbs the angiogenesis of zebrafish embryos. *Drug Chem Toxicol.* Oct;35(4):361-5. doi:

- 10.3109/01480545.2011.627864. Epub 2012 Feb 8. PMID: 22313413.
- Degen de Arrúa R. y González Y. (2014). Plantas utilizadas en la medicina popular paraguaya como antiinflamatorias. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(3),213-231.[fecha de Consulta 13 de Mayo de 2021]. ISSN: 0717-7917. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85631010001>.
- Espinosa, M. B. (2016). El Pez Cebra : una herramienta en educación The Zebrafish : A Tool in Education Resumen Introducción, 19, 11–18.
- Fernández V., Desvars N., Diana D., Benítez B., y Joachini J. (1999). Acción de algunas plantas medicinales paraguayas sobre el ciclo replicativo celular. *Revista de Ciencia y Tecnología*. vol. 1, f 1, 17-23.
- Fundación Moisés Bertoni. (2006). Helechos de Tapyta, una guía educativa por jóvenes campesinos de Paraguay. Asunción. pp. 34.
- Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullmann B., & Schilling T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. Jul;203(3):253-310. doi: 10.1002/aja.1002030302.
- Kumar D., Kumar A., & Prakash O. (2012). Potential antifertility agents from plants: a comprehensive review. *J Ethnopharmacol*. 2012 Mar 6;140(1):1-32. doi: 10.1016/j.jep.2011.12.039. Epub. Jan 5. PMID: 22245754 Review.
- Nagel, R. (2002). DarT : The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* - a General Model in Ecotoxicology and Toxicology. *Altex*, 19, 38–48.
- Martínez-Jerónimo F. F., y Espinosa Chávez, F. (2008). Ensayo de toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces *Brachydanio rerio* y *Poecilia reticulata*. In *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en Mexico* (pp. 167–190). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- OECD. 2013. Fish embryo acute toxicity (FET) test. Test guideline n° 236. Guidelines for the testing of chemicals. Paris: OECD.
- Peña-Chocarro M., Marín G., Jiménez B. y Knapp S. (1999). Helechos de Mbarakayú, una guía de los Helechos de la Reserva Natural del Bosque Mbarakayú, Paraguay. The Natural History Museum. London. pp. 45-52.
- Pierce B A. 2010. Fundamentos de genética, conceptos y relaciones. Editorial médica panamericana. 1ª edición. España. pp. 5-6.
- Pin A., González G., Marín G., Céspedes G., Cretton G., Christen P. y Roguet, D. (2009). Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción. Asunción, PY: Asociación Etnobotánica Paraguaya. 441p.
- Ponce M., Arana M., y Zuloaya F, (2016). Flora Vasculare de la República Argentina. Vol. 2, Licó-

- fitas, Helechos, Gymnospermae. 1ª edición. Instituto de Botánica Darwinión. pp. 73.
- Reimers M. J., Flockton A. R., & Tanguy R. L. (2004). 15451041 Ethanol- and acetaldehyde-mediated developmental toxicity in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 2004 Nov-Dec;26(6):769-81. doi: 10.1016/j.ntt.2004.06.012.
- Rodriguez S., Haugen R., Rueber A., & Huang C. (2014). Reversible neuronal and muscular toxicity of caffeine in developing vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.03.004>.
- Rojas M. y Smok C. (2014). Modelando el cuerpo del embrión durante el periodo somático. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 1(1):57-62.
- Soares-Bezerra R. J., Calheiros A. S., da Silva Ferreira N.C., da Silva Frutuoso V., & Alves L. A. (2013). Natural Products as a Source for New Anti-Inflammatory and Analgesic Compounds through the Inhibition of Purinergic P2X Receptors. *Pharmaceuticals (Basel)*. Apr 29;6(5):650-8. doi: 10.3390/ph6050650
- Thiagarajan S. K., Rama Krishnan K., Eit T., Husna Shafie N., Arapoc D. J., & Bahari H. (2019). Evaluation of the Effect of Aqueous *Momordica charantia* Linn. Extract on Zebrafish Embryo Model through Acute Toxicity Assay Assessment. *Evid Based Complement Alternat Med.* May 2;2019:9152757. doi: 10.1155/2019/9152757. eCollection.
- Yang L., Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, Mikut R, Liebel U, Müller F, Strähle U. (2009). Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol.* 2009 Sep;28(2):245-53. doi: 10.1016/j.reprotox..04.013. Epub 2009 May 4.
- Veeran B., Bringart M., Turpin C., Rondeau P., Planesse C., Ait-Arsa I., Gimié F., Marodon C., Meilhac O., Gonthier M. P., Diotel N., & Bascands J. L. (2021). Caffeic Acid, One of the Major Phenolic Acids of the Medicinal Plant *Antirhea borbonica*, Reduces Renal Tubulointerstitial Fibrosis. *Biomedicines.* Mar 30;9(4):358. doi: 10.3390/biomedicines9040358.
- Westerfield, M. (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.
- Yang L., Ho N. Y., Alshut R., Legradi J., Weiss C., Reischl M., Mikut R., Liebel U., Müller F., & Strähle U. (2009). Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol.* 2009 Sep;28(2):245-53. doi: 10.1016/j.reprotox..04.013. Epub 2009 May 4.
- Zainol Abidin I. Z., Fazry S., Jamar N. H., Ediwar Dyari H. R., Zainal Ariffin Z., Johari A. N., Ashaari N. S., Johari N. A., Megat Abdul Wahab R., & Zainal Ariffin S.H. (2020) The effects of *Piper sarmentosum* aqueous extracts on

zebrafish (*Danio rerio*) embryos  
and caudal fin tissue regeneration.  
Sci Rep. Aug 25;10(1):14165.  
doi: 10.1038/s41598-020-70962-  
7.

# Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto vegetal de las hojas de *Solanum granuloso-leprosum* Dunal

Aguilar, S<sup>1</sup>; Mc Donald, A<sup>5</sup>; Diaz, A<sup>2</sup>; Martínez, M<sup>4</sup>; Moura-Mendes, J<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología. San Lorenzo, Paraguay

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Estadística. San Lorenzo, Paraguay

<sup>3</sup>Universidad Nacional de Asunción. Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas. San Lorenzo, Paraguay

<sup>4</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología, Laboratorio de Recursos Vegetales, Área Fitoquímica. San Lorenzo, Paraguay

<sup>5</sup>Investigador independiente. Panamá, República de Panamá

\*E-mail del autor: jmendes@rec.una.py (JMM)

---

**Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto vegetal de las hojas de *Solanum granuloso-leprosum* Dunal.** Las plantas son fuentes de moléculas biológicamente activas que pueden ser utilizadas para el tratamiento de diferentes afecciones. *Solanum granuloso-leprosum*, conocida como “hu’i moneha”, es una especie nativa del Paraguay, cuyas propiedades farmacológicas y composición química son aún desconocidas. Sin embargo, popularmente esta planta se utiliza como calmante, para aliviar la tos, depurar la sangre, tratar dolores orales, como los causados por las caries. Es por ello que, ante el desconocimiento de sus propiedades farmacológicas, este trabajo de investigación tuvo por objetivo evaluar la actividad antibacteriana del extracto vegetal de las hojas de *Solanum granuloso-leprosum*, así se llevó a cabo una investigación de tipo experimental, con diseño en bloques al azar, donde se utilizó la técnica de disco difusión frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, sometiénolas a distintas concentraciones del extracto etanólico (2000, 1000, 500 y 250 µg.mL<sup>-1</sup>). En cuanto a los resultados, no se observó halos de inhibición en ninguna de las concentraciones ensayadas, una causa probable podría ser que el extracto bruto es aparentemente rico en ácidos grasos y ésteres. Finalmente, se concluye que el extracto de las hojas no demostró actividad antibacteriana frente a las cepas utilizadas en las condiciones ensayadas. Sin embargo, deben realizarse otras investigaciones variando el tipo de extracto con relación a la polaridad con el fin de elucidar otras posibles actividades biológicas y así ampliar la información científica sobre las propiedades terapéuticas de la especie estudiada.

**Palabras clave:** hu’i moneha, extracto etanólico, plantas medicinales, Paraguay

**Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto vegetal de las hojas de *Solanum granuloso-leprosum* Dunal.** Plants are sources of biologically active molecules that can be used to treat different conditions. *Solanum granuloso-leprosum*, known as “hu’i moneha”, is a species native to Paraguay, whose pharmacological properties and chemical composition are still unknown. However, this plant is popularly used as a painkiller, to relieve coughs, purify the blood and treat oral pain such as cavities. For this reason, due to the unknown pharmacological properties, the objective of this research was to evaluate the antibacterial activity of the plant extract of the leaves of *Solanum granuloso-leprosum*. An experimental research was carried out, designed in random blocks, where the disc diffusion technique was used against

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, subjecting them to different concentrations of the ethanolic extract (2000, 1000, 500, and 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Regarding the results, inhibition halos were not observed at any of the concentrations tested, a likely cause might be that the crude extract is apparently rich in fatty acids and esters. Finally, it is concluded that the leaf extract did not show antibacterial activity against the strains used under the conditions tested. However, other investigations must be carried out, varying the type of extract in relation to polarity to search for other possible biological activities and thus expand the scientific information on the therapeutic properties of the species studied.

**Keywords:** hu'i moneha, ethanolic extract, medicinal plants, Paraguay

---

## INTRODUCCIÓN

Desde el comienzo de su formación, las sociedades humanas han estado en estrecho contacto con su entorno, obteniendo del mismo tanto alimentos como medicamentos (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018; Prakash *et al.*, 2020). El hecho de que una planta adquiera la denominación de “medicinal”, radica principalmente en la actividad farmacológica que pueda llegar a tener (Vanaclocha y Folcara, 2003).

Las sustancias denominadas principios activos, también conocidos como fitoquímicos, son los responsables de ejercer la mencionada acción farmacológica, como por ejemplo la actividad antibacteriana (Muñoz Lopez de Bustamante, 1996; Prakash *et al.*, 2020; Thakur *et al.*, 2020). A menudo, la propiedad farmacológica se encuentra en una determinada parte de la planta, que puede ser la raíz, la corteza del tronco o las hojas de un árbol o arbusto; así como también en las semillas, flores, frutos o parte aérea (Muñoz Lopez de Bustamante, 1996; Vanaclocha y Folcara, 2003).

*Solanum* representa el género más importante de la familia de las Solanáceas debido a su amplia distribución en regiones tropicales y subtropicales, ade-

más son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional (Böhme y Pinker, 2016; Kaunda y Zhang, 2019). *Solanum granuloso-leprosum* Dunal, conocido popularmente como “hu'i moneha” (en guaraní), pertenece a dicho género, corresponde a una planta nativa de Paraguay, y en cuanto a su morfología, es un árbol siempre verde, que puede alcanzar hasta 12 metros de altura (Pin *et al.*, 2009). Sus hojas habitualmente se disponen en espiral, de manera alterna y, no presentan estípulas (Perez de Molas, 2016). Su área de distribución abarca países como Argentina, Brasil, Bolivia, México, Paraguay y Uruguay (Tropicos, 2021).

Según Pin *et al.*, (2009), las propiedades farmacológicas y la composición química del hu'i moneha son desconocidas, sin embargo, en la medicina tradicional se utilizan las hojas para aliviar la tos; la raíz para depurar la sangre, en tanto que sus frutos actúan como calmantes (Fogel *et al.*, 2016). También, Amat *et al.*, (2002), mencionaron su uso en el tratamiento de dolores orales, como los producidos por las caries dentales y en el caso de pérdida de dientes, y, por otro lado, concuerdan con Pin *et al.*, (2009), respecto a que no existe información científica acerca de la composición química.

mica de la planta en general.

Amat *et al.* (2002), evaluaron el extracto acuoso de siete plantas utilizadas en la medicina popular en Argentina como agente antihipertensivo, entre ellas *Solanum granuloso-leprosum*, y se observó actividad antifúngica y posible genotoxicidad por la producción significativa de anormalidades cromosómicas.

En el 2013, de Toledo Picoli y colaboradores analizaron las características anatómicas, histoquímicas y micromorfológicas de las hojas de *S. granuloso-leprosum* para evaluar las características asociadas a su rol como planta pionera, es decir que forma parte del grupo de especies vegetales resistentes que poseen capacidad de colonizar ambientes hostiles, y según los resultados observados, confirman lo mencionado.

Según la Organización Mundial de la Salud – OMS (2013), aproximadamente 80% de la población de países en desarrollo basa su salud primaria en la medicina tradicional, a pesar de que este tipo de medicina alternativa está muy poco reglamentada, por lo que ciertos tratamientos podrían resultar poco seguros y adecuados.

Esta situación también se ve reflejada en la población paraguaya que tiene muy arraigado el uso de la medicina popular basada en tradiciones guaraníes, pues casi el 90% de la población del país utilizan las hierbas medicinales como primera opción en el tratamiento o prevención de las enfermedades (Fogel *et al.*, 2016; Basualdo & Soria, 2014; Soria y Ramos, 2015).

En el 2020, se publicó un estudio realizado en el departamento de Caaguazú, Paraguay sobre el uso de plantas medicinales

por esta comunidad, por medio de entrevistas, como resultado colectaron 450 muestras vegetales, e identificaron 54 familias botánicas, que correspondían a 93 géneros y 116 especies vegetales. Las principales dolencias tratadas son del sistema digestivo y genitourinario, generalmente esas dolencias están asociadas a infecciones bacterianas, que pueden ser causadas por bacterias Gramnegativas como: *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* o grampositivas como *Staphylococcus aureus* (Soria *et al.*, 2020).

Además, las infecciones superficiales y de mucosas también son muy tratadas en la medicina popular con plantas medicinales, que pueden ser causadas por especies microbianas similares a las citadas anteriormente (Chandra, 2013; Mahady, 2005; Manandhar *et al.*, 2019).

Razón por la cual, el uso de compuestos naturales ha sido considerado una alternativa o un complemento en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, por lo tanto, es vital la búsqueda e identificación de componentes bioactivos con actividad antimicrobiana (Thakur *et al.*, 2020).

En Paraguay, además, es muy escasa la información científica que valide el uso de plantas como alternativa para el tratamiento eficaz de infecciones bacterianas, como es el caso de *Solanum granuloso-leprosum*. Considerando el desconocimiento de las propiedades farmacológicas de esta especie en particular, se propuso como objetivo de este estudio evaluar la actividad antibacteriana del extracto vegetal de las hojas de *Solanum granuloso-leprosum* frente bacterias grampositivas y negativas de

relevancia en la salud humana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

La especie vegetal estudiada fue colectada en la ciudad de Nueva Italia, Departamento Central, Paraguay (25°38'54.7"S 57°26'46.4"W) en junio de 2017. La identificación botánica fue realizada por especialistas del Laboratorio de Recursos Vegetales del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción (LAREV – FACEN – UNA). El material testigo de la especie vegetal se depositó como muestra permanente en el Herbario del Laboratorio de Recursos Vegetales – FACEN, UNA (Colector Aguilar, S., N°01).

### Elaboración del extracto vegetal

Se secaron las hojas de la especie vegetal *Solanum granuloso-leprosum* en un lugar limpio y seco, a temperatura ambiente (25°C), con escasa iluminación y aireación, para evitar la acción de agentes biológicos, físicos y químicos (oxígeno, luz, temperatura) que podrían convertir los compuestos originales en artefactos (Martínez *et al.*, 2015; Matos, 2009; Sánchez *et al.*, 2015).

Las hojas secas fueron trituradas con un molino de cuchillas convencional. Se pesaron 915 gramos del micropolvo obtenido y se transfirió a un recipiente, en el cual se adicionó etanol 96° como solvente de extracción, cantidad suficiente para cubrir completamente la muestra vegetal, se agitó vigorosamente, se selló y se dejó en reposo por un periodo

de 15 días, con agitación periódica de 1 vez por día; posteriormente se filtró; y se concentró en un rotavapor a 75° C. El extracto obtenido fue disuelto en solución de EtOH:H<sub>2</sub>O (7:3) y sometido a una partición líquida-líquida con hexano. La fracción hexánica obtenida fue acondicionada a temperatura ambiente para su uso posterior (Martínez *et al.*, 2015; Matos, 2009; Sánchez *et al.*, 2015).

### Evaluación de la actividad antibacteriana

Los ensayos fueron realizados en el laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas - Universidad Nacional de Asunción (CEMIT-UNA).

### Microorganismos utilizados

Las cepas bacterianas fueron donadas por el Instituto Nacional de Tecnología, Normalización y Metrología (INTN), Paraguay. Se utilizaron tres cepas Gramnegativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y dos cepas Grampositivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

### Ensayo de sensibilidad a antimicrobianos por Disco-difusión

Para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico bruto de las hojas de *S. granuloso-leprosum* se realizó la técnica de disco-difusión estandarizada por NCCLS M2-A8. Para ello, se activaron las cepas bacterianas, que se encontraban almacenadas a 4°C mencionadas anteriormente inoculando en placas de Petri con medio de cultivo

agar Muller-Hinton a 35° C incubados por 24-48 horas.

Tanto para las bacterias Grampositivas como para las Gramnegativas, se realizó la inoculación por el método de suspensión directa de colonia. En solución salina estéril al 0,9 % fueron preparadas suspensiones microbianas, con la turbidez ajustada de acuerdo con el estándar 0,5 de la escala de McFarland (NCCLS, 2003).

La inoculación de las placas de prueba se realizó con siembra por agotamiento, luego se aplicaron los discos empapados con 10 µL de los antibióticos (gentamicina, eritromicina y neomicina) y de las diluciones del extracto vegetal de *S. granuloso-leprosum* a diferentes concentraciones (2000, 1000, 500 y 250 µg/µL) sobre la superficie del agar de manera equidistante. Se tuvieron en cuenta controles de esterilidad (placas que contenían solamente agar Mueller Hinton); controles negativos de actividad antibacteriana (placas que contenían agar Mueller Hinton más el inóculo con las bacterias, una cepa diferente para cada placa) y; los controles positivos de actividad antibacteriana (placas que contenían el medio de cultivo más el inóculo de las diferentes bacterias expuestas a los distintos discos de antibióticos utilizados). Cada uno de los tratamientos fue realizado por triplicado.

Las placas fueron incubadas a 35° C después de los 15 minutos de haber hecho la aplicación de los discos. Luego de 24 horas de incubación, se examinó cada placa y se midieron (en milímetros) los halos de inhibición alrededor de cada disco (diámetros) con ayuda de un escalímetro.

## RESULTADOS

En una prueba de solubilidad previa a la realización de la extracción por cromatografía de columna, se disolvió una pequeña porción del extracto etanólico en hexano y la solubilidad fue del 100%, lo que indicó que el extracto era netamente un componente apolar, ya que a simple vista era fluido y de aspecto oleoso. La fracción hexánica recogida de la columna presentaba el mismo aspecto que el extracto crudo etanólico original.

El extracto etanólico bruto de las partes aéreas de *S. granuloso-leprosum* no inhibió el crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 en las concentraciones ensayadas. Sin embargo, gentamicina, que es un antibiótico aminoglucósido con acción bactericida muy eficiente contra gramnegativos también actúa sobre grampositivos, como se visualiza en los resultados: en las concentraciones de 2000, 1000, 500 y 250 µg.mL<sup>-1</sup> produjo halos de inhibición de 27,7 mm, 23,9 mm, 23,0 mm y 22,2 mm, respectivamente, sin embargo no es de elección para tratar grampositivos.

En el caso de *Staphylococcus aureus* se dio la misma situación que para *S. epidermidis*, ya que ninguna de las concentraciones del extracto vegetal en estudio tuvo efectividad frente a la proliferación bacteriana. En tanto que, los antimicrobianos empleados sí presentaron efectividad inhibiendo el crecimiento de las bacterias, por ejemplo, gentamicina presentó halos desde 16,2 mm hasta 21,7 mm; eritromicina halos de entre 18,1 mm y 24,3 mm y; neomicina halos de 12,8 mm a 16,5 mm, para las concentraciones máxima y mínima, respectiva-

**Tabla 1.** Comparación de las medias de los diámetros de los halos de inhibición generados en las diferentes cepas utilizadas (mm)

	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella typhimurium</i>	
	ATCC 12228	ATCC 25923	ATCC 27853	ATCC 25922	ATCC 13311					
Extracto etanólico ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	N	Media (mm)	N	Media (mm)	N	Media (mm)	N	Media (mm)	N	Media (mm)
2000	3	0,00	3	0,00	3	0,00	3	0,00	3	0,00
1000	3	0,00	3	0,00	3	0,00	3	0,00	3	0,00
500	3	0,00	3	0,00	3	0,00	3	0,00	3	0,00
250	3	0,00	3	0,00	3	0,00	3	0,00	3	0,00
Gentamicina										
2000	3	27,74	3	21,72	3	19,06	3	17,7	3	22,71
1000	3	23,87	3	18,58	3	16,93	3	14,13	3	21,03
500	3	22,99	3	18,53	3	13,85	3	13,17	3	18,62
250	3	22,15	3	16,23	3	11,62	3	9,67	3	16,98
Eritromicina										
2000	3	23,47	3	24,34	3	20,35	3	0,00	3	2,53
1000	3	21,96	3	21,44	3	14,91	3	0,00	3	0,00
500	3	21,65	3	21,11	3	11,68	3	0,00	3	0,00
250	3	20,03	3	18,05	3	7,35	3	0,00	3	0,00
Neomicina										
2000	3	20,79	3	16,45	3	13,75	3	11,13	3	17,67
1000	3	18,85	3	14,11	3	10,99	3	9,71	3	16,9
500	3	17,67	3	12,66	3	9,14	3	8,65	3	14,07
250	3	16,76	3	12,75	3	6,30	3	8,17	3	12,47

N: número de réplicas para cada tratamiento

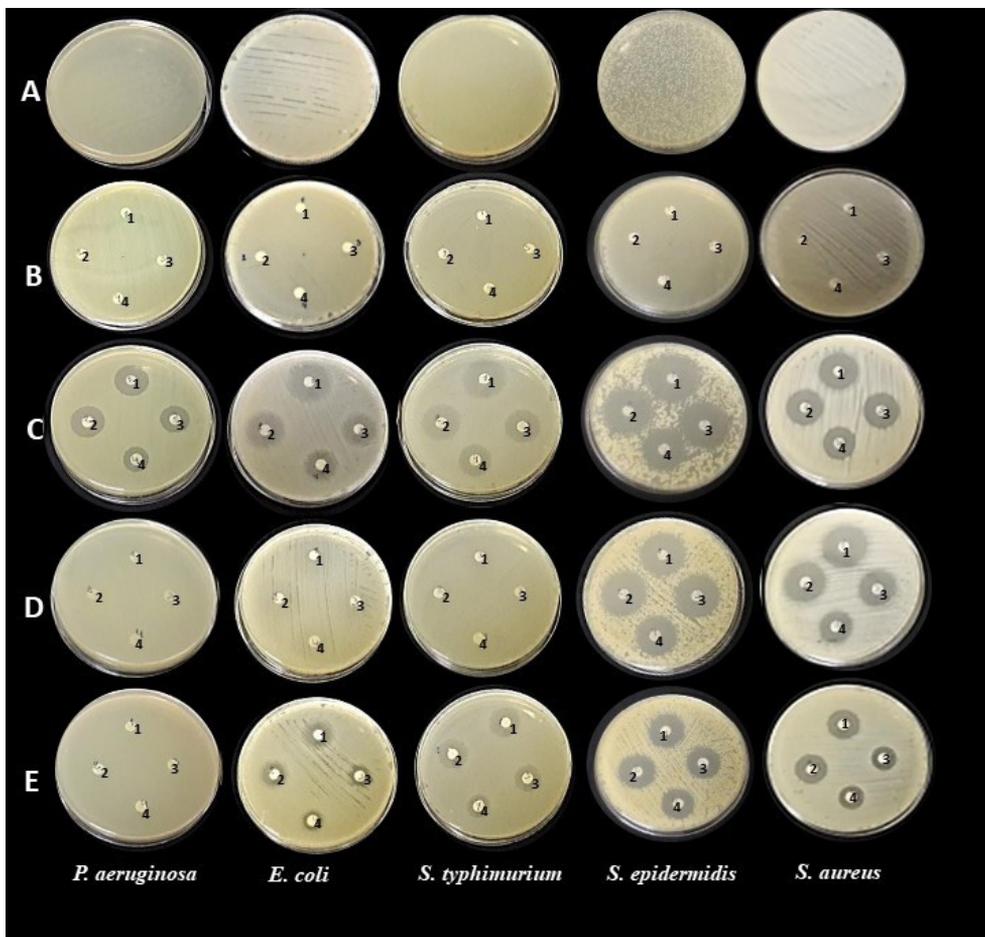
mente (**Tabla1**).

Así también, el uso del extracto etanólico crudo de las hojas de *S.granuloso-leprosum* no presentó efecto inhibidor de las bacterias Gramnegativas *E. coli*, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa*, pero aquí algunos de los antibióticos utilizados tampoco presentaron actividad

ante algunas cepas.

La eritromicina no generó halos de inhibición frente a *E. coli* y frente a *S. typhimurium* apenas presentó inhibición de 2,5 mm de diámetro para la concentración mayor de 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , resultado esperado ya que funciona preferentemente como bacteriostático y actúa más

eficazmente frente a grampositivos. No obstante, la gentamicina y neomicina si generaron halos de inhibición en todas las colonias de bacterias gramnegativas utilizadas, corroborando con su amplio espectro bactericida (Tabla 1, Figura 1)



**Figura 1:** Comportamiento de las diferentes cepas de bacterias utilizadas  
**A:** Control (agar + inóculo bacteriano); **B:** Extractos etanólicos de *S. granuloso-leprosum*; **C:** Gentamicina; **D:** Eritromicina; **E:** Neomicina: Concentraciones: 1=2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 2=1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 3=500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  y 4=250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

## DISCUSIÓN

Eritromicina, que actúa principalmente como bacteriostático, también demostró ser efectivo para *S. epidermidis*, ya que los halos de inhibición fueron desde 20,03 mm, para la concentración

más baja de 250  $\mu\text{g/mL}$ , hasta 23,47 mm para la concentración de 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Frente a la neomicina también se obtuvieron halos de inhibición bacteriana que variaron de 16,8 mm a 20,8mm, para la concentración mínima y máxima empleada, respectivamente (Tabla 1).

La actividad antibacteriana nula del extracto vegetal de *Solanum granuloso-leprosum* resultante puede ser atribuido a la solubilidad del extracto etanólico bruto y su compleja composición, que puede llegar a presentar interferencia entre sus componentes, así como también la técnica utilizada para evaluación de la actividad antimicrobiana y sus innumerables factores de influencia (Balouiri *et al.*, 2016; Ostrosky *et al.*, 2008).

Sin embargo, no se han encontrado estudios similares que utilicen como material de estudio a esta planta, aunque existen publicaciones que refieren el uso de otras especies del mismo género en las cuales se menciona que, dependiendo de los compuestos presentes en el material vegetal, de las concentraciones de los extractos ensayados de las partes vegetales utilizadas, de la naturaleza de los solventes, de las técnicas y finalmente del tipo de cepas contra las cuales fueron testados los extractos, la actividad antibacteriana fue observable en valores variables o nula (Negri *et al.*, 2014; Ostrosky *et al.*, 2008).

Tal es el caso de Sheeba (2010), cuyo trabajo evaluó la actividad antimicrobiana de *Solanum surattense* mediante el extracto etanólico de sus hojas en concentraciones de 500, 250, 100, 50 y 25  $\mu\text{g}$  contra las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*; *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* y *Vibrio cholerae*, la mejor actividad antibacteriana fue presentada en la concentración de 500  $\mu\text{g}$  para todas las bacterias excepto para *Shigella dysenteriae*, que no fue susceptible al extracto de *S. surattense* visualizado

por la nula formación de halo de inhibición. Además, se concluyó que la mayor concentración presentó actividad bactericida. No obstante, en el trabajo de investigación con *S. granuloso-leprosum*, a pesar de que se utilizó la misma parte vegetal e incluso el mismo solvente de extracción ni a la mayor concentración de 2000  $\mu\text{g}$  se observó actividad frente a las mismas especies bacterianas ensayadas en el estudio con *S. surattense*.

Si bien *S. granuloso-leprosum* forma parte del género *Solanum* no demostró actividad antibacteriana frente a ninguna de las bacterias ensayadas, en cambio estudios similares con otras especies del mismo género si demostraron tener propiedades antimicrobianas (Koduru *et al.*, 2006; Latha y Kannabiran, 2006). Las posibles causas de estas diferencias podrían ser que, a pesar de que en la mayoría de los casos las hojas son el órgano principal donde se hallan los principios activos, en esta planta particular *S. granuloso-leprosum*, se podrían encontrar en otras partes, como las flores, el tallo, los frutos o las semillas.

Sobre este punto, se menciona que esa marcada variabilidad de los efectos derivados del contenido de los principios activos podría deberse a varios factores como la estación del año en que la planta fue colectada, la zona, las condiciones de crecimiento y la parte de la planta utilizada. Es importante mencionar que las raíces, absorben del suelo el agua, las sales minerales y los nitratos, que constituyen la savia bruta que posteriormente es impulsada y repartida a través del tallo a toda la planta, incluyendo a las hojas, que son uno de los órganos principales en relación a los procesos metabólicos

de elaboración de principios activos, sin embargo, si no hay una suficiente formación y distribución de la savia bruta, la biotransformación de esos principios activos pueden ser perjudicados (Gosmann et al., 2011; Muñoz Lopez de Bustamante, 1996).

Con respecto a las hojas de *S. granuloso-leprosum*, hasta el momento el trabajo de Toledo Picoli et al., (2013) es el único donde se relatan resultados obtenidos con esta parte de la planta. En el mismo se analizaron las características anatómicas, histoquímicas y micromorfológicas y el análisis de su composición con respecto a alcaloides y compuestos de fenol la cual fue nula. La ausencia de estos componentes podría explicar en parte la falta de actividad antimicrobiana observada de los extractos obtenidos a partir de ella, ya que es sabido que los alcaloides y fenoles poseen propiedades antimicrobianas (Gosmann et al., 2011; Thakur et al., 2020).

En cuanto a los solventes que se utilizaron para la extracción de los compuestos activos de la planta en estudio, el etanol es de naturaleza polar, pero considerado como un solvente universal por su alta versatilidad en solubilizar compuestos de polaridades altas, medias y bajas, lo que lo hace ideal para la extracción de un alto porcentaje de los fitoconstituyentes de las plantas, como Poliacetilenos, flavonoles, esteroides, taninos, terpenoides, saponinas y polifenoles (Gosmann et al., 2011; Negri et al., 2014; Sharapin, 2000; Thakur et al., 2020).

Concuerda con el trabajo de Rojas et al., 2009 y Sharapin (2000), ya que ellos afirman que este solvente posee una gran

capacidad para la extracción de compuestos de una amplia gama de polaridades, adicionando que es más económico y menos tóxico que otros solventes orgánicos. Es por lo que, el etanol resultó ideal para la extracción de los componentes de las hojas de la especie en estudio, ya que éstas contenían compuestos netamente apolares.

Por otro lado, con base al aspecto fluido y oleoso del extracto etanólico, se realizó una prueba de solubilidad en hexano, y el extracto se disolvió por completo, el mismo comportamiento fue observado con la fracción hexánica obtenida. Hecho que concuerda, pues el hexano es un solvente selectivo, de menor polaridad, que preferentemente extrae de la planta las grasas vegetales y otros componentes apolares (Sharapin, 2000).

Siendo así se puede concluir que la composición principal del extracto bruto de las hojas son ácidos grasos y ésteres (compuestos apolares) y, estos factores podrían ser la causa probable de que el material vegetal estudiado no haya presentado la actividad antibacteriana esperada sobre las cepas de bacterias utilizadas.

## CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos, se concluye que el extracto etanólico crudo de las hojas de *Solanum granuloso-leprosum* demostró actividad antibacteriana nula frente a las bacterias ensayadas para las diferentes concentraciones testadas en el estudio, no obstante, cabe destacar que este trabajo constituye la primera investigación en Paraguay que

aborda el estudio de las propiedades antibacterianas de *S. granuloso-leprosum* y que se debe seguir investigando con otros extractos de diferentes polaridades y otros modelos biológicos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Recursos Vegetales del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción por la identificación taxonómica del ejemplar vegetal y también por el espacio concedido para realizar la parte fitoquímica del trabajo. Al Instituto Nacional de Tecnología, Normalización y Metrología del Paraguay, por la donación de las cepas puras de bacterias. Al Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas – CEMIT de la Universidad Nacional de Asunción, por brindar el espacio suficiente para llevar a cabo el experimento en sus instalaciones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amat, A. G., Yajia, M. E., Gonzalez, C. F., Lorca, G. L., Gonzalez, F. S., Riglos, A. G., & Veron, J. R. (2002). Evaluation of cytological parameters induced by aqueous extracts of seven plants used as antihypertensive agents in Argentine folk medicine. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 21(1), 37–42.
- Basualdo, I., y Soria, N. (2014). Plantas medicinales comercializadas en el mercado municipal de la ciudad de Pilar, Dpto. Ñeembucu, Paraguay. *Dominguezia*, 47–53.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Böhme, M., & Pinker, I. (2016). Solanaceae Diversity In Vietnam: A Preliminary Taxonomic Inventory for Conservation and Utilization. *Agriculture & Forestry*, Vol. 62 Issue 4: 45-55, 2016, Podgorica. DOI: 10.17707/AgricultForest.62.4.06
- Chandra, M. (2013). Antimicrobial activity of medicinal plants against human pathogenic bacteria. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4(7), 653–658.
- de Toledo Picoli, E. A., dos Santos Isaias, R. M., Ventrella, M. C., & de Miranda, R. M. (2013). Anatomy, histochemistry and micromorphology of leaves of *Solanum granuloso-leprosum* Dunal. *Bioscience Journal*, 29(3).
- Fogel, R., Céspedes, C., López, L., y Valdez, S. (2016). Propiedades medicinales de plantas. Conocimiento tradicional y patentes.-.
- Gosmann, G., Simoes, C. M. O., & Schenkel, E. P. (2011). *Farmacognosia - Da Planta ao Medicamento* (6th ed.). UFSC - Universidade Federal De Santa Catarina.
- Haya, J., Guerra, J. A., y Guirao, G. (2008). *Consensos en fitoterapia ginecológica*. Editorial Médica Panamericana.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Ami-

- ni-Khoei, H. (2018). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmед Pharmacology*, 7(1).
- Kaunda, J. S., & Zhang, Y.-J. (2019). The genus *Solanum*: an ethnopharmacological, phytochemical and biological properties review. *Natural Products and Bioprospecting*, 9(2), 77–137.
- Koduru, S., Grierson, D. S., & Afolayan, A. J. (2006). Antimicrobial Activity of *Solanum aculeastrum*. *Pharmaceutical Biology*, 44(4), 283–286.
- Latha, P. S., & Kannabiran, K. (2006). Antimicrobial activity and phytochemicals of *Solanum trilobatum* Linn. *African Journal of Biotechnology*, 5(23).
- Mahady, G. B. (2005). Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Current Pharmaceutical Design*, 11(19), 2405–2427.
- Manandhar, S., Luitel, S., & Dahal, R. K. (2019). In vitro antimicrobial activity of some medicinal plants against human pathogenic bacteria. *Journal of Tropical Medicine*, 2019.
- Martínez, M., Mancuello, C., Ramond, F., & de Oliveira, V. B. (2015). La Actividad antioxidante in vitro del extracto etanólico de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler por el método de captura del radical libre 1, 1-difenil-2-picril-hidrazilo. *Steviana*, 7: 48–56.
- Matos, F. J. de A. (2009). Introdução à fitoquímica experimental. Imprensa Universitária / Edições UFSC.
- Muñoz Lopez de Bustamante, F. (1996). Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Mundi-Prensa Libros.
- NCCLS. (2003). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition (Vol. 23, Issue 2). NCCLS document M7-A6.
- Negri, M., Salci, T. P., Shinobu-Mesquita, C. S., Capoci, I. R. G., Svidzinski, T. I. E., & Kioshima, E. S. (2014). Early state research on antifungal natural products. *Molecules*, 19(3), 2925–2956. <https://doi.org/10.3390/molecules19032925>
- OMS Organización Mundial De La Salud. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional.
- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E. L., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(2), 301–307.
- Perez de Molas, F. L. (2016). Manual de familias y géneros de árboles del Paraguay. San Lorenzo, Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura. 227p.
- Pin, A., Cretton, S., y Roguet, D. (2009). Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción. Asociación Etnobotánica Paraguaya Asunción.

- Prakash, B., Kumar, A., Singh, P. P., & Songachan, L. S. (2020). Antimicrobial and antioxidant properties of phytochemicals. In *Functional and Preservative Properties of Phytochemicals* (pp. 1–45). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818593-3.00001-4>
- Rojas, L. C., Uribe, Y. H., Martínez, N. S., y Niño, D. R. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Colombia Forestal*, 12(1), 161–170.
- Sánchez, R., Fernández, M., & Nolasco, S. (2015). Aceite de canola: estudio exploratorio de extracción con etanol. Argentina. Recuperado 06-12-21. v. 27
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (Vol. 78). CAB.
- Sheeba, E. (2010). Antibacterial activity of *Solanum surattense* Burm. F. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 6(1), 1–4.
- Soria, N., y Ramos, P. (2015). Uso de plantas medicinales en la Atención Primaria de Salud en Paraguay: algunas consideraciones para su uso seguro y eficaz. *Mem. Inst. Invest. Cienc. Salud (Impr.)*, 13(2): 8–17. <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v13n2/v13n2a01.pdf>
- Soria, N., Ramos, P., Viveros, G., Estigarribia, G., Ríos, P., & Ortíz, A. (2020). Ethnobotany and use of medicinal plants family health units of Caaguazú, Paraguay. *Caldasia*, 42(2), 263–277. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v42n2.76907>
- Thakur, M., Singh, K., & Khedkar, R. (2020). Phytochemicals: extraction process, safety assessment, toxicological evaluations, and regulatory issues. In *Functional and Preservative Properties of Phytochemicals* (Issue i, pp. 341–361). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818593-3.00011-7>
- Tropicos. (2021). Name - *Solanum granulosoleprosum* Dunal. Retrieved September 18, 2021, from <https://tropicos.org/name/29601478>
- Vanaclocha, B. V., & Folcara, S. C. (2003). *Fitoterapia: vademécum de prescripción* (Vol. 12). Masson Barcelona.

# Evaluación del perfil químico de metabolitos secundarios del hongo silvestre comestible *Oudemansiella cubensis* (Berk. & M. A. Curtis) R. H. Petersen, Nova Hedwigia, Beih.; su cultivo y factibilidad de producción indoor

Veloso Paredes, B<sup>1\*</sup>; Campi Gaona, M<sup>1</sup>; Maubet Cano, Y<sup>1</sup>; Mancuello Chaparro, C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Recursos Vegetales-Área Micología. San Lorenzo – Paraguay

\*E-mail del autor: brevelpa@gmail.com

---

**Evaluación del perfil químico de metabolitos secundarios del hongo comestibles *Oudemansiella cubensis* silvestre y cultivado y factibilidad de producción indoor.** *Oudemansiella cubensis* es una especie de hongo comestible de la Funga del Paraguay. Este estudio se centró en caracterizar el perfil químico de basidiomas silvestres y producidos “indoor” y la estandarización del proceso productivo. El perfil químico cualitativo de extractos etanólicos indicó la presencia de metabolitos tipo terpenos y esteroides, y negativos para los alcaloides. La concentración de compuestos fenólicos totales, compuestos antioxidantes y actividad antioxidante fue similar para basidiomas silvestres y producidos indoor. El sustrato de cultivo con mayor rendimiento de producción (13,97%) fue la mezcla chala y marlo de maíz en proporción 1/1.

**Palabras clave:** Basidioma silvestre, cultivo, compuestos fenólicos, domesticación

**Evaluation of the chemical profile of secondary metabolites of the wild and cultivated edible fungus *Oudemansiella cubensis* and indoor production feasibility.** *Oudemansiella cubensis* is an edible mushroom species of the Funga of Paraguay. This study focused on to characterizing the chemical profile of wild and “indoor” produced grown basidiomata and the standardization of the production process. The qualitative chemical profile of ethanolic extracts indicated the presence of terpenes and steroid-like metabolites, and was negative for alkaloids. The concentration of total phenolic compounds, antioxidant compounds, and antioxidant activity was similar for wild and indoor- produced grown basidiomata. The cultivation substrate with the highest production yield (13.97%) was the maize hush and corn cob mixture in a 1/1 proportion.

**Keywords:** cultivation, domestication, phenolic compounds, wild basidiomata

---

## INTRODUCCIÓN

Los hongos comestibles han desarrollado un gran interés en la población mundial por ser una fuente alimenticia alternativa con aporte de nutrientes de alto valor biológico y perfil sensorial de gran aceptación, además del potencial de producción de varias especies silvestres (Sánchez y Mata, 2012). Se ha

clasificado a los hongos en cuatro categorías según su uso: comestibles, medicinales, tóxicos o miscelánea (Chang y Miles, 2004). Además, son productores de compuestos bioactivos con perfil para el desarrollo de suplementos dietéticos y medicamentos (Fukushima, 2020; Xu *et al.*, 2020). Estos bioactivos, producidos por gran variedad de hongos, son productos del metabolismo secundario y

son originados como respuesta al estrés ocasionado por el nicho ecológico, y la adaptación del organismo al ambiente (Arango, 2008; Zaidman *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2013).

Los compuestos fenólicos son la mayor fuente de antioxidantes naturales, ya que poseen potencial de reducir agentes donadores de hidrógeno y eliminar radicales libres; son muy diversos químicamente y pueden ser simples hasta altamente polimerizados, dándose como resultados de las rutas metabólicas del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos, siendo esta segunda la más importante en hongos (Barros *et al.*, 2007; Avalos y Pérez, 2009).

Nutricionalmente las setas comestibles son un grupo valioso de alimentos con perfil nutracéutico que se han utilizado tanto en la gastronomía como en la medicina, demuestran ser ricos en hidratos de carbono, bajos en calorías, además de ser ricos en aminoácidos esenciales, fibra, vitaminas y minerales (Lakhanpal y Rana, 2005).

Se estima que el volumen de producción anual de hongos comestibles a nivel mundial es aproximadamente de 40 millones de toneladas, destacándose en la producción China, EEUU, Holanda, Polonia, Francia, España, Italia, Irlanda, Canadá y Reino Unido; tendencia que va en aumento debido a la optimización de los métodos de producción (Thakur, 2020).

En el Paraguay, el consumo de hongos (setas) es abastecido por productos importados, los registros nacionales de importación del 2010 al 2020 evidencian que el consumo de los mismos se centra en los champiñones (*Agaricus bisporus*)

procedentes principalmente de China, España y Brasil.

El género *Oudemansiella* presenta algunas especies comestibles, pero cuyo cultivo se encuentra poco desarrollado, algunas de sus especies se están estudiando en los últimos años (Silveira *et al.*, 2001; Alberti *et al.*, 2021). *Oudemansiella* tiene más de 20 especies registradas a nivel mundial (He *et al.*, 2019), sin embargo, algunas de ellas presentan delimitaciones conflictivas. Recientemente, Alberti *et al.*, (2020) mediante análisis morfológicos, filogenéticos y de cultivo, han identificado dos especies morfológicamente similares en el neotrópico: *O. canarii* y *O. cubensis*. *Oudemansiella cubensis* es cultivada en Argentina. Para la optimización de su producción como sustrato de crecimiento se han utilizado paja de trigo, aserrín de eucalipto, álamo y pino, además de implementar varias técnicas de cultivo utilizadas alrededor del mundo, como: bolsas con perforaciones, bloques, bolsas abiertas, frascos de vidrio, y bolsas abiertas con recubrimiento (Alberti *et al.*, 2021).

El objetivo del presente trabajo es estudiar el perfil químico de *O. cubensis* en estado silvestre y cultivado bajo condiciones de laboratorio, así también, la domesticación de la cepa silvestre y la optimización del rendimiento de cultivo, mediante la utilización de residuos agroindustriales locales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El hongo comestible *Oudemansiella cubensis* fue colectado en el Campus Universitario de la Universidad Nacional de Asunción e identificada por es-

pecialistas del Laboratorio de Recursos Vegetales (LAREV) área Micología, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción.

### Identificación del material

El material estudiado fue identificado taxonómicamente en base a caracteres macro y microscópicos, siguiendo los lineamientos propuestos por Alberti *et al.*, (2020).

### Características de cultivo

Se evaluó el crecimiento miceliar de la cepa en tres medios de cultivo sólido: Extracto de Malta Agar (EMA), Sabouraud (Sab) y Agar Papa Dextrosa (PDA), en placas de Petri de 90 mm de diámetro, el inóculo de 5 mm de diámetro fue ubicado en el centro de las placas, posteriormente incubadas a 28 °C. Las medidas de crecimiento se realizaron a diario a la misma hora con un escalímetro de Vernier, hasta que el crecimiento miceliar completo de la totalidad de las placas. Se seleccionó el medio de cultivo sólido con mayor rapidez de crecimiento para luego producir semillas miceliadas.

### Producción de basidiomas

Para el cultivo del hongo comestible *O. cubensis* se utilizó la cepa con código de entrada al cepario FC23 y código de aislamiento C132 del material colectado e identificado (MC124). Los sustratos utilizados para la evaluación del rendimiento y eficiencia biológica fueron: 100% marlo, 100% chala y la mezcla de ambos en proporción 50/50. Los mismos fueron triturados y deshidratados a 45°C hasta alcanzar una humedad del 15%. Se

rehidrató con un 70% de agua, el pH se ajustó a 7 con CaCO<sub>3</sub> al 2% con respecto a peso seco del sustrato, se esterilizó en autoclave a 121°C por 120 minutos en bolsas de polipropileno. Para el análisis de metabolitos secundarios se utilizó basidiomas obtenidos de sustrato 100% paja seca (Gatton panic) bajo mismas condiciones de cultivo que sustratos anteriores.

Se prepararon bolsas por triplicado y se incubaron a una temperatura de 28°C hasta la colonización completa del sustrato. Para estimular la formación de primordios, se mantuvo una temperatura de 28°C a 80% de humedad. Se determinó el rendimiento usando la fórmula  $R = \left[ \frac{\text{Peso fresco de basidiomas}}{\text{Peso fresco de sustrato}} \times 100 \right]$  la eficiencia biológica  $EB\% = \left[ \frac{\text{Peso fresco de basidiomas}}{\text{Peso de sustrato seco}} \times 100 \right]$  (Silveira, et al., 2001). Se evaluaron los datos de producción para establecer diferencias significativas entre medias a través de análisis de varianza (ANOVA). Los cálculos se realizaron usando el software estadístico Past (Hammer *et al.*, 2001).

### Análisis de metabolitos secundarios

Para el análisis comparativo se procesaron muestras obtenidas por recolección en estado silvestre y cultivadas en paja (Gatton panic).

Se maceró 20g de hongo deshidratado y pulverizado en etanol al 96% por 3 días, seguidamente la muestra fue llevada a un lavador ultrasónico (CGOLDENWALL PS-50A) durante 1 hora y media, se filtró por gravedad, con 3 lavados con solvente. El filtrado se concentró en un rotavapor (RE-200A Rotary Evaporator) a 60°C y posterior exposi-

ción a vapor.

El extracto crudo obtenido de la evaporación fue almacenado en frascos de vidrio y conservados bajo refrigeración entre 2 °C y 5 °C (Ringuelet y Viña, 2013; Tiwari, *et al.*, 2011).

### Ensayos cualitativos

Se realizó la identificación de familias de metabolitos secundarios preparando soluciones las cuales se sometieron a múltiples pruebas: Dragendorff, Wagner y Mayer para alcaloides; Liebermann-Burchard y Salkowski para triterpenos y esteroides (Arango, 2008; Xiong *et al.*, 2007). Cada prueba se realizó por triplicado y se comparó con una muestra de control positiva (+) y negativa. Como criterio de evaluación de los resultados en relación al control positivo, se utilizó lo siguiente: (+) = coloración débil, (++) = coloración media, (+++) = coloración intensa, (-) = ausencia.

### Compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos totales se midieron mediante el método descrito por Turkoglu *et al.*, (2007) con modificaciones. A partir de los extractos crudos, se prepararon soluciones metanólicas con una concentración de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, a cada 200 µL de solución metanólica de los extractos se le agregó 2 mL de agua destilada y 200 µL del reactivo Folin Ciocalteu 2N (grado analítico, Merck), se homogeneizó y se dejó reposar durante 5 minutos, se añadieron 1,5 ml de carbonato de sodio al 20% y se llevó a un volumen de 10 ml con agua destilada.

Como blanco se usó 200 µL de metanol con el mismo tratamiento. Después de 1 hora de reposo en la oscuridad se

leyó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro. Para construir la curva de calibración se usó una solución de ácido gálico (Sigma-Aldrich®) de 1000 µg.mL<sup>-1</sup>, a partir de cual se tomaron alícuotas 5 – 100 µL que recibieron el mismo tratamiento que las muestras. Las concentraciones equivalentes de ácido gálico de cada extracto de muestra se determinaron a partir de la curva. Los resultados se expresaron como el promedio de los triplicados de las absorbancias en miligramos de equivalente de ácido gálico por gramos de extracto crudo (mg.g<sup>-1</sup>) ± desviación estándar (DE).

### Concentración y actividad antioxidante

Fue determinada con el método de absorbancia de radicales DPPH• según Campi *et al.*, (2021) con modificaciones. Se prepararon soluciones metanólicas de 1 mg.mL<sup>-1</sup> a partir de los extractos crudos, de los cuales se tomaron 100 µL y se hicieron reaccionar con 3,9 mL de solución metanólica del radical DPPH• (Merck) (0,02 mg.mL<sup>-1</sup>), como blanco se utilizó 100 µL de metanol con el mismo tratamiento. Las muestras se homogeneizaron y se dejaron reposar en oscuridad durante 1 hora. La reducción del reactivo se evidenció por el cambio de coloración de violeta oscuro a amarillo claro que se midió con un espectrofotómetro UV-VIS (modelo Thermo Fisher SCIENTIFIC GENESIS 1XX) a 517 nm. Para la curva de calibración, se utilizó una solución metanólica de 1 mg.mL<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, a partir de la cual se prepararon diluciones de 10 -100 µg.mL<sup>-1</sup>, de cada dilución se tomaron 100 µL que recibieron el mismo

tratamiento que las muestras. A partir de los resultados de la curva, se determinó la concentración equivalente de ácido ascórbico. Los resultados se expresaron como el promedio de los triplicados en miligramos de equivalente de ácido ascórbico por gramos de extracto crudo ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )  $\pm$  desviación estándar (DE). Para calcular el porcentaje de actividad, se utilizó la siguiente fórmula: % de actividad = [(absorbancia del blanco – absorbancia de la solución) / absorbancia del blanco]  $\times$  100.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación del material

*Oudemansiella cubensis* (Berk. & M. A. Curtis) R. H. Petersen, Nova Hedwigia, Beih. 137: 283. 2010.

Basidioma gregario, xilófago (**Figura 1**). Píleo de hasta 83 mm de diám. convexo a plano-convexo cuando maduro, centro deprimido; viscido cuando joven, seco cuando maduro; superficie castaña oscura cuando joven, tornándose de crema a beige en la madurez, cubierta de escamas prominentes, erectas, blanquecinas a castañas, agrupadas en el centro. Margen blanquecino, liso, con resto de velo en muestras jóvenes. Contexto delgado, blanquecino, de hasta 3 mm de grosos, olor farináceo. Láminas adnatas a libres, blanquecinas, apretadas, con lamélulas. Estípites central a excéntrico, 32–90 mm  $\times$  5–10 mm, blanquecino, fibriloso, pruinoso, con restos de velo en la porción superior, base subbulbosa. Esporada blanquecina, abundante.

Comentarios: Las especies de *Oudemansiella* del neotrópico presentan similitudes morfológicas, por lo que durante

años *O. cubensis* fue considerada sinónimo de *O. canarii*. Estudios recientes basados en datos moleculares (Alberti et al., 2020) mostraron a estas dos especies como linajes independientes. La diferencia principal es la coloración castaño claro a blanquecino del píleo y la composición de la pileipellis la cual forma una polícistodermis en la *Oudemansiella cubensis* (Alberti et al., 2020).



**Figura 1.** Basidioma silvestre *Oudemansiella cubensis* (MC 124). A. Detalle de las escamas del píleo. B. Detalle del himenóforo laminar. C. vista general *in situ*

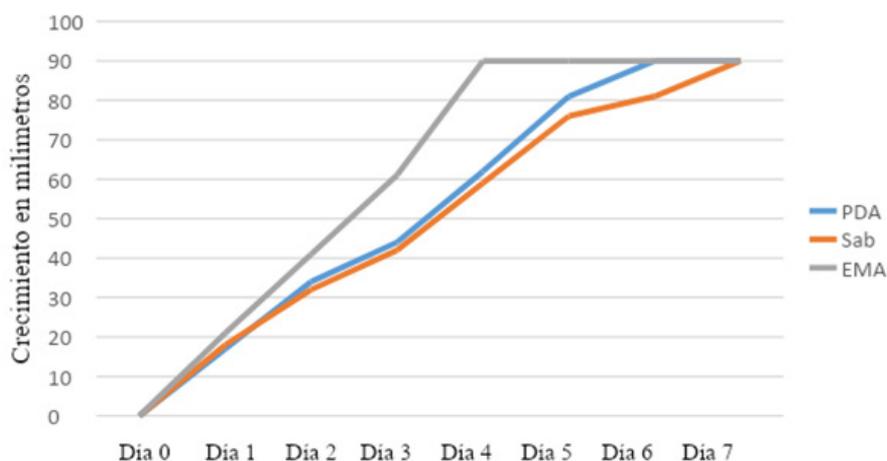
### Características de cultivo

El medio de cultivo de mejor perfil fue EMA (**Tabla 1, Figura 2**), al cuarto día de incubación colonizó enteramente a la placa, seguido por el PDA (quinto día) y Sab (noveno día). Estos resultados concuerdan con Carreño, et al., (2014) quienes demostraron que el crecimiento de la cepa en EMA a 26 °C se ve favorecido ante PDA bajo mismas condiciones de cultivo.

**Tabla 1:** Diámetro de Crecimiento de *O. cubensis* (C132) en distintos medios de cultivo incubados a 28°C, con valores expresados en milímetros por día

Medio de cultivo	Diámetro de crecimiento en milímetros							
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Sab	0	17,73	31,64	42,02	58,88	76,11	81,74	90,00
PDA	0	16,47	34,43	43,52	62,02	82,81	90,00	90,00
EMA	0	20,82	40,81	60,12	90,00	90,00	90,00	90,00

**Crecimiento de *O. cubensis* en distintos medios de cultivo**



**Figura 2.** Crecimiento (diámetro del cultivo en mm a lo largo del tiempo) de *O. cubensis* en diferentes medios de cultivo: Sab=Saboraud, PDA= Agar papa, EMA=Extracto de Malta Agar

### Producción de basidiomas

El sustrato marlo y chala en proporción 50/50 fue de mejor rendimiento ( $13,97 \pm 0,53\%$ ), seguido por 100% marlo ( $12,08\%$ ) y 100% chala ( $11,8\%$ ) (**Figura 3, Figura 5**). Estos valores son mayores a los obtenidos por Silveira *et al.*, (2001) para *O. canarii*, quienes obtuvieron un rendimiento de  $4,47\% \pm 1,34$  utilizando de sustrato bagazo de caña de azúcar aserrín de eucalipto suplementado con salvado de trigo.

En cuanto a la eficiencia biológica (**Figura 4**) fue calculada en base a la primera oleada, el sustrato marlo y chala en proporción 50/50 fue de mayor eficiencia biológica con un  $46,57 \pm 1,76\%$ , seguido de 100% marlo ( $40,27\%$ ) y 100% Chala ( $39,32\%$ ). Estos valores inferiores a los obtenidos por Alberti *et al.*, (2021) para *O. canarii* quienes obtuvieron una eficiencia biológica del 132% utilizando paja de trigo, pero mayores a los sustratos de pino ( $30,29\%$ ) y eucalipto

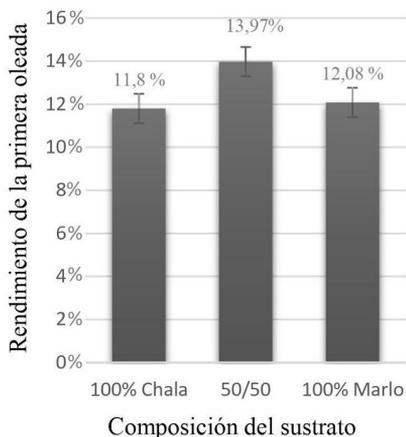
(28,43%) evaluados hasta su agotamiento.

### Análisis de metabolitos secundarios.

#### Ensayos cualitativos

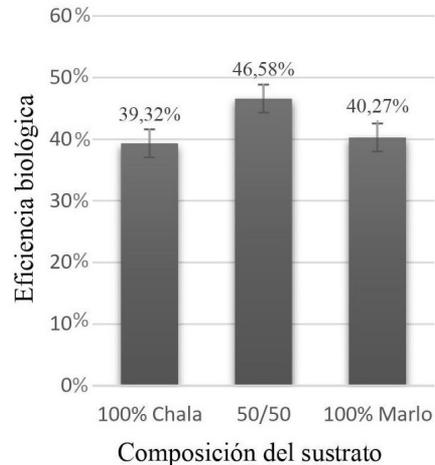
Los terpenoides son los metabolitos secundarios más abundantes del Reino Fungi, los sesquiterpenoides, diterpenoides y triterpenoides son los compuestos más comúnmente aislados dentro del grupo de los Basidiomycota (Sandargo et al., 2019). En cuanto al género *Oudemansiella*, se han aislado pigmentos naranja-amarillos de naturaleza terpenoidal: dihidroxixerulina, xerulina y ácido xerulínico (Kuhn et al., 1990). Con respecto a los alcaloides, si bien los resultados cualitativos arrojaron resultados negativos, Xu et al., (2020) confirmaron la presencia del alcaloide hexahidropirrol [1, 2- $\alpha$ ] pirazina-1, 4-diona, en aislamientos de *Oudemansiella mucida* (Schrad.) Höhn.

#### Rendimiento de producción de basidiomas en la primera oleada.

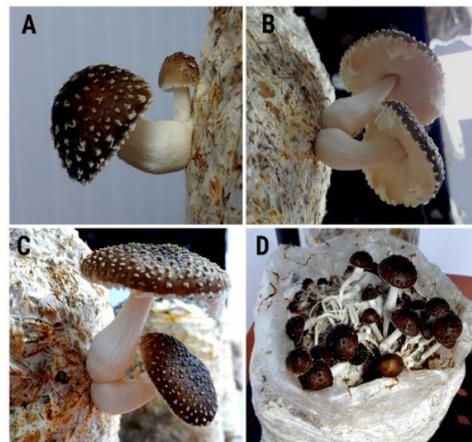


**Figura 3:** Rendimiento de producción de basidiomas de la primera oleada en las distintas proporciones de sustratos

#### Eficiencia biológica de la primera oleada.



**Figura 4:** Eficiencia biológica de producción de basidiomas de la primera oleada en las distintas proporciones de sustratos



**Figura 5. A-D.** Basidiomas producido indoor de *Oudemansiella cubensis* (C132)

**Tabla 2:** Resultados de análisis cualitativo de metabolitos secundarios del basidioma silvestre. (+), coloración tenue (++) coloración media (+++) coloración intensa (-) ausencia

Test	Cambio de coloración
<b>Alcaloides</b>	
Dragendorff	(-)
Wagner	(-)
Mayer	(-)
<b>Terpenos</b>	
Liebermann-Burchard	(+++)
Salkowski	(+++)

**Tabla 3:** Valores de CFT, DPPH• y porcentaje de actividad antioxidante de basidiomas silvestres y cultivados de *O. cubensis*

	Compuestos Fenólicos (mg GAE.g <sup>-1</sup> )	Compuestos antioxidantes (mg.g <sup>-1</sup> AAE)	Actividad antioxidante (%)
Basidioma silvestre	9,98	15,43	3,19
Basidioma cultivado	10,38	16,72	3,37

### Ensayo cuantitativo

Los ensayos correspondientes a la cuantificación de compuestos fenólicos

totales (CFT), compuestos antioxidantes (CA) y actividad antioxidante (AA) de los extractos etanólicos de los basidiomas silvestres y obtenidos por cultivo “in door” fueron analizados (**Tabla 3**).

No se observaron diferencias entre las concentraciones de CFT del basidioma silvestre y cultivado (9,98 mg GAE.g<sup>-1</sup>, 10,38 mg GAE.g<sup>-1</sup> respectivamente). Estos resultados son mayores a los resultados de Acharya *et al.*, (2019), quienes describieron  $5.38 \pm 0.55$  mg GAE g<sup>-1</sup> para basidiomas silvestres de *O. canarii*. Vale mencionar que los autores utilizaron metanol como solvente de extracción. Los compuestos fenólicos son considerados antioxidantes con potencial redox, lo que permite reducir agentes donadores de hidrógeno, eliminan radicales libres y oxígeno en estado sing lete (Pietta, 2000; Teissedre y Landrault, 2000; Barros *et al.*, 2007).

Los compuestos antioxidantes tienen la habilidad de eliminar los radicales libres e inhibir los mecanismos oxidativos que causan enfermedades degenerativas; están distribuidos en varios productos como granos, frutas, vegetales, té, especias, hierbas y hongos (Dubost *et al.*, 2007; Kozarski *et al.*, 2011, Campi *et al.*, 2019, 2021). Se observaron diferencias sutiles en cuanto a la concentración de estos compuestos entre el basidioma silvestre y el cultivado (15,43 mg.g<sup>-1</sup> equivalentes de ácido ascórbico EAA, 3,19% AA y 16,72 mg.g<sup>-1</sup> EAA, 3,37% AA respectivamente. **Tabla 3**). Los valores de EEA obtenidos coinciden con los reportados para para basidiomas silvestres de *O. canarii*  $15.33 \pm 0,67$  mg.g<sup>-1</sup> EAA (Acharya *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONES

La especie comestible *O. cubensis* presenta buen perfil gastronómico al ser muy palatable; y biológico al ser fuente de compuestos fenólicos y antioxidantes.

Los análisis cualitativos demuestran resultados negativos para alcaloides y positivos para terpenos.

Se ha demostrado que no existen diferencias en la concentración de los compuestos fenólicos, antioxidantes y porcentaje de actividad antioxidante entre los basidiomas silvestres y producidos indoor, también se ha demostrado la factibilidad en la domesticación de la cepa silvestre para el cultivo extensivo de la misma, utilizando residuos agroindustriales locales como ser la chala y el marlo de maíz.

Se recomiendan más ensayos químicos, con distintos métodos de extracción y también ensayos en la suplementación de los sustratos de cultivo.

Este trabajo representa el primer perfil químico y biológico de la especie comestible *O. cubensis*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto PINV 18-31 "Bioremediación de efluentes de la industria textil mediante la aplicación de enzimas lignocelulolíticas por hongos causantes de pudrición blanca nativos del Paraguay" financiado por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT). Agradecemos al Lic. Elvio Gayozo por el análisis estadístico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberti, M. M., Pérez-Chávez, A. M., Niveiro, N., & Albertó, E. (2021). Towards an Optimal Methodology for Basidiomes Production of Naturally Occurring Species of the Genus *Oudemansiella* (Basidiomycetes). *Current Microbiology*, 78(4), 1256-1266. DOI: 10.1007/s00284-021-02391-2
- Albertí, M., Niveiro, N., Cunha Zied, D., & Albertó, E. (2020). Identification of *Oudemansiella canarii* and *O. cubensis* (Basidiomycota, Physalacriaceae) in Argentina using morphological, culture and molecular analysis. *Harvard Papers in Botany*, 25(2), 131-143. DOI: 10.3100/hpib.v25iss2.2020.n1.
- Arango, A.G.J. 2008. Alcaloides y compuestos nitrogenados. Universidad de Antioquia. Colombia. 1 - 88 p.
- Acharya, K., Nandi, S., & Dutta, A. K. (2019). Microanatomical and physicochemical characterization and antioxidative activity of methanolic extract of *Oudemansiella canarii* (Jungh.) Höhn. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(1), 76. DOI: 10.4274/tjps.19981
- Avalos, A., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *Serie Fisiología Vegetal* 2 (3): 119-145.
- Barros, L., Calhelha, R. C., Vaz, J. A., Ferreira, I. C., Baptista, P., y Estevinho, L. M. (2007). Antimicrobial activity and bioactive com-

- pounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology*, 225(2), 151-156. DOI: 10.1007/s00217-006-0394-x
- Campi, M., Mancuello, C., Ferreira, F., Maubet, Y., Cristaldo, E., & Benítez, D. (2019). Preliminary evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioactive compounds in some species of basidiomycetes fungi from Paraguay. *Steviana*. 11(1), 26-41.
- Campi, M., Mancuello, C. R., Ferreira, F. P., Maubet, Y., Cristaldo, E., y Robledo (2021). G. Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Bioactive Compounds of Four Native Species of Ganodermataceae Family (Agaricomycetes) from Paraguay. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. DOI:10.1615/IntJMedMushrooms.2021039298
- Carreño-Ruiz, S. D., Cappello-García, S., Gaitán-Hernández, R., Cifuentes-Blanco, J., & Rosique-Gil, E. (2014). Crecimiento de tres hongos comestibles tropicales en medios de cultivo y residuos agrícolas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(8), 1447-1458.
- Chang, S. T., & Miles, P. G. (2004). *MUSHROOMS Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact* (2da ed.). United States of America: CRC Press LLC.
- De Silva, D. D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Alias, S. A., y Hyde, K. D. (2013). Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity*, 62(1), 1- 40. DOI: 10.1007/s13225-013-0265-2
- Dubost, N. J., Ou, B., y Beelman, R. B. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105(2), 727-735. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.01.030
- Fukushima-Sakuno, E. (2020). Bioactive small secondary metabolites from the mushrooms *Lentinula edodes* and *Flammulina velutipes*. *The Journal of Antibiotics*, 73(10), 687-696. DOI: 10.1038/s41429-020-0354-x
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaentologia electrónica*, 4(1), 9.
- He, M. Q., Zhao, R. L., Hyde, K. D., Bergerow, D., Kemler, M., Yurkov, A. & Kirk, P. M. (2019). Notes, outline and divergence times of Basidiomycota. *Fungal diversity*, 99(1), 105-367. DOI: 10.1007/s13225-019-00435-4
- Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J. P., & Van Griensven, L. J. (2011). Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food chemistry*, 129(4), 1667-1675. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.06.029

- Kuhnt D., Anke T., Besl H., Bross M., Herrmann R. Mocek U., Steffan B., Steglich W. (1990): Antibiotics from Basidiomycetes. XXXVII. New inhibitors of cholesterol biosynthesis from cultures of *Xerula melanotricha* Dörfelt. *Journal of Antibiotics*, 43: 1413–1420. DOI: 10.7164/antibiotics.43.1413
- Lakhanpal, T. N., & Rana, M. (2005). Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. *Plant Genetic Resources*, 3(2), 288-303. DOI: 10.1079/PGR200581
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042. DOI: 10.1021/np9904509
- Ringuelet, J. y Viña, S. (2013). *Productos Naturales Vegetales*. 1ra ed. Edit. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- Sandargo, B., Chepkirua, C., Chenga, T., Chaverra, L., Thongbai, B., Stadler, M., & Hüttela, S. (2019). Biological and chemical diversity go hand in hand: Basidiomycota as source of new pharmaceuticals and agrochemicals. *Elsevier. Agrochemicals Biotechnology*.
- Sánchez, J. E., & Mata, G. (2012). *Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica*. Limusa, México, 145-154.
- Silveira, M., Tauk, S., Ramos, V., & Capelari, M. (2001). Cultivation of the edible mushroom *Oudemansiella canarii* (Jungh.) Hohn in lignocellulosic substrates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32 211-214.
- Teissedre, P. L., & Landrault, N. (2000). Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Research International*, 33(6), 461-467. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00070-3
- Thakur, M. P. (2020). Advances in mushroom production: Key to food, nutritional and employment security: A review. *Indian Phytopathology*, 73, 377-395. DOI: 10.1007/s42360-020-00244-9
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica scientia*, 1(1), 98-106.
- Turkoglu, A., Duru, M. E., Mercan, N., Kivrak, I., y Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101(1), 267-273. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.01.025
- Xiong, Q., Wilson, W. K., & Pang, J. (2007). The Liebermann–Burchard reaction: sulfonation, desaturation, and rearrangement of cholesterol in acid. *Lipids*, 42(1), 87-96. DOI: 10.1007/s11745-006-3013-5
- Xu, D., Li, R., & Deng, S. (2020, March). Study on Separation and Purification the Secondary Metabolites of *Oudemansiella mucida*. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 782 (2), 022008. IOP Publishing.
- Zaidman, B. Z., Yassin, M., Mahajna, J., & Wasser, S. P. (2005). Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics.

Applied Microbiology and Biotechnology, 67(4), 453-468. DOI:  
10.1007/s00253-004-1787-z

# Toxicidad del extracto acuoso de *Sida cordifolia* L. mediante el ensayo de micronúcleo en ratones

Caballero, H<sup>1</sup>; Paredes, K<sup>1</sup>; Torres, E<sup>2</sup>; Segovia, E<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Laboratorio de Biotecnología

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental

E-mail del autor: edith.segovia@cemit.una.py; edaluz@gmail.com

---

## Toxicidad del extracto acuoso de *Sida cordifolia* L. mediante el ensayo de micronúcleo en ratones.

Las plantas medicinales son de amplio uso en el Paraguay, la mayoría de las especies carecen de información científica sobre su uso, es por ello necesario estudiar sus efectos sobre la fisiología general, a fin de determinar sus posibles efectos secundarios. La planta *Sida cordifolia* (Malva blanca), hierba perenne de la familia Malvaceae, se utiliza popularmente para tratar la gripe, infecciones urinarias, inflamaciones del ovario, como emoliente, contra el enfriamiento y también se describe una actividad antiinflamatoria. El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del extracto acuoso de la Malva blanca en eritrocitos de médula ósea de *Mus musculus*. Se realizó el recuento de 2.000 eritrocitos por animal para la evaluación de genotoxicidad y 500 eritrocitos por animal para la evaluación de citotoxicidad. En la evaluación de genotoxicidad del extracto acuoso de *Sida cordifolia* en eritrocitos de médula ósea de *Mus musculus* (ratones), a las concentraciones 0,01% y 0,02% no se observaron resultados significativos, en cuanto a la concentración del 0,04% se registró un nivel de significancia en comparación al control negativo. En la evaluación de citotoxicidad, se observó que todas las concentraciones utilizadas no registraron resultados significativos. El extracto acuoso de *S. cordifolia* resultó genotóxica en la concentración de 0,04% pero no fue citotóxica en todas las concentraciones evaluadas.

**Palabras clave:** plantas medicinales, genotoxicidad, citotoxicidad

## Oxicity of the aqueous extract of *Sida cordifolia* L. by the micronucleus test in mice.

Medicinal plants are widely used in Paraguay, however most species lack scientific information on their use. It is therefore necessary to study their effects on general physiology in order to determine their possible side effects. *Sida cordifolia* (flannel weed), a perennial herb of the Malvaceae family, is popularly used to treat influenza, urinary infections, ovarian inflammation, as an emollient, against cooling, and anti-inflammatory activity is also described. The objective of this work was to determine the effects of the flannel weed aqueous extract on erythrocytes of the bone marrow of *Mus musculus*. For the genotoxicity evaluation, 2,000 erythrocytes per animal were counted; while 500 erythrocytes per animal were counted for the cytotoxicity evaluation. In the genotoxicity evaluation, at concentrations 0.01% and 0.02%, no significant results were observed; regarding the concentration of 0.04 % a level of significance was recorded compared to the negative control. In the cytotoxicity evaluation, it was observed that all the concentrations used did not register significant results. the aqueous extract of *S. cordifolia* was genotoxic at a concentration of 0.04%, but it was not cytotoxic at any of the concentrations evaluated.

**Key words:** medicinal plants, genotoxicity, cytotoxicity

---

## INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales en la salud es muy popular en muchas partes del mundo y este conocimiento es transmitido de generación a generación (Muñoz, 2001). En el Paraguay esta tradición es frecuente y el uso de plantas medicinales se ha ido incrementando como resultado de la unión de varias culturas (Soria y Ramos, 2015), en nuestro país han sido reconocidas alrededor de 296 especies de uso medicinal preventivo, curativo o paliativo (Basualdo *et al.*, 2004), entre las cuales las nativas son las menos estudiadas, y cuya eficacia carece de un control de respaldo (Soria y Ramos, 2015). El uso de plantas medicinales o partes de estas, como antiinflamatorios, es una práctica que se realiza desde la antigüe-

dad (Thi Tran *et al.*, 2019) y entre estas especies, encontramos a la *Sida cordifolia*. La *Sida cordifolia* L. conocida como Malva Blanca (**Figura 1**), es una hierba perenne con tallo erecto, ramificado, cubierto de pelos blancos, las flores con coloración salmón o amarillas, dispuestas en inflorescencias axilares y terminales, con frutos (Pin *et al.*, 2009). Se cita el uso de las hojas, tallos y flores contra el catarro (Degen de Arrúa *et al.*, 2011). También se utiliza popularmente para tratar la gripe, como expectorante, las infecciones urinarias, inflamaciones del ovario, como emoliente, y el extracto de la raíz, en el mate, se utiliza contra el enfriamiento (Pin *et al.*, 2009; Degen de Arrúa *et al.*, 2011; Degen de Arrúa y González, 2014).



**Figura 1:** *Sida cordifolia* L. (Jardín Botánico de Asunción-foto del autor)

Por otro lado, también se han evaluado el potencial farmacológico del extracto de la *S. cordifolia*. En el 2005, Dhawal *et al.*, estudiaron el potencial antioxidante comparativo de extractos etanólicos de *Sida cordifolia* y demostraron que el extracto de la raíz de esta planta posee una propiedad antioxidante significativa. Se ha observado además que presenta actividades analgésicas y antiinflamatorias en extractos acuosos de la parte aérea, mientras que extractos etanólicos han mostrado ser hipoglucemiante (Ravi Kanth, V. y Diwan, P. V., 1999). Se ha descrito que el extracto metanólico de raíces de *S. cordifolia* presentaron alta actividad antioxidante (Subramanya *et al.*, 2015), actividad antimicrobiana y actividad contra células tumorales *in vitro*, entre otras varias actividades (Dinda *et al.*, 2015).

El ensayo de micronúcleos se evalúa en los eritrocitos de la médula ósea de roedores y fue incluido en la batería de ensayos para evaluación de genotoxicidad de productos químicos (Hayashi, 2016). La médula ósea de los roedores adultos jóvenes es el tejido diana del daño genético en esta prueba (OECD, 2016). Los micronúcleos se forman a partir de fragmentos de cromosomas o cromosomas rezagados en la división celular, como consecuencia de un efecto tóxico de un agente físico o químico (Sommer *et al.*, 2020). Un aumento en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en los animales tratados es una indicación de genotoxicidad (Dhawan y Bajpayee, 2019). El objetivo de este trabajo fue evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad del extracto acuoso de *Sida cordifolia* en células de médula

ósea de ratones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Extracto acuoso:** La planta se colectó de la colección del Jardín Botánico de Asunción (JBA) y su posterior identificación se realizó en el herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN). Depósito de planta identificado como *Voucher* número 01 de Hernán Caballero. Se seleccionó toda la planta y se procedió al lavado de las mismas con agua potable para remover residuos y luego se dejó secar por lo menos una semana a temperatura ambiente, en el laboratorio, donde se mantuvo la circulación de aire constante. Luego se procedió a triturar y pesar el material vegetal, se llevó a ebullición 20 gramos en 500 mL de agua destilada para la obtención del extracto, posteriormente se efectuó el proceso de filtración, con algodón y con papel de filtro *Whatman*, se congeló el extracto en balones para su posterior liofilización y se prepararon las distintas concentraciones de uso.

**Animales:** Para el ensayo de micronúcleos en médula ósea se utilizaron ratones de la cepa swiss albino, de 6 a 12 semanas de vida, que se adquirieron del Bioterio del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS). Fueron aclimatados por una semana en la Sala de Mantenimiento de Animales del laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT). Los animales se mantuvieron en condiciones de temperatura de 22°C ± 2°C, fotoperiodo de 12h luz/12 h oscuridad, con dieta de balanceado y agua *ad libitum*. Se siguie-

ron las recomendaciones de la Guía de Principios Internacionales para Investigaciones Biomédicas que envuelven animales, elaborados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS, 2007). Se utilizó la cantidad mínima posible de animales y se tomaron todas las precauciones para evitarles sufrimientos innecesarios.

**Tratamiento:** Se prepararon concentraciones del extracto acuoso del 0,01%; 0,02% y 0,04%, para su posterior uso en el tratamiento. Los ratones se agruparon conforme a su peso y se los distribuyó en cinco grupos, cada grupo con cinco individuos. El primer grupo se identificó como el control negativo en el cual los ratones fueron tratados con agua potable. El segundo, tercero y cuarto grupos fueron tratados con tres concentraciones de: 0,01%; 0,02% y 0,04% del extracto acuoso de *Sida cordifolia*. El quinto grupo correspondió al control positivo en el cual los ratones fueron tratados con ciclofosfamida (CP), 50mg/1.000g animal.

**Test de micronúcleo:** Se realizaron administraciones consecutivas de los extractos y el control negativo, con intervalos de 24 hs por 14 días (lunes a viernes) durante dos semanas, por vía oral, y por vía intraperitoneal el control positivo 24 hs antes del sacrificio. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical en el día 15 del tratamiento. El procedimiento empleado para la obtención de las preparaciones de la médula ósea, fue realizado de acuerdo a la metodología propuesta por Schmid (1975) y el número de células analizadas fue de acuerdo a la guía de procedimientos de la OECD (2016). Se cortaron las epífisis de cada

fémur con tijeras quirúrgicas para obtener la médula ósea. Se tomó 1,5 ml de suero fetal bovino (SFB) previamente calentado a 37° C, en una jeringa de 5 ml. Se insertó la aguja en canal medular y se enjuago la médula ósea mediante lavados suaves y se transfirió todo el material a un tubo de ensayo. Luego se centrifugo la suspensión celular resultante a 1000 rpm durante 10 min. Después de la centrifugación, se desechó el exceso de sobrenadante. Se resuspendió el botón de células con suero y se prepararon las muestras. Se colocó una gota de la muestra en un portaobjetos limpio y seco, se realizó el frotis y se dejó secar. A continuación, las células se fijaron en metanol 100% durante 10 minutos. La tinción de las muestras se realizó con Giemsa al 4%. Se realizó el recuento de 2.000 eritrocitos por animal para el análisis genotóxico, incluido los que presentaron micronúcleos. Para el análisis citotóxico, se contaron 500 eritrocitos por animal y se determinaron las ratios entre Eritrocitos Policromáticos (EPC) y Eritrocitos Normocromáticos (ENC) de cada grupo. Diferencias significativas de las *ratios* de los grupos de tratamiento con la ratio del control indican toxicidad.

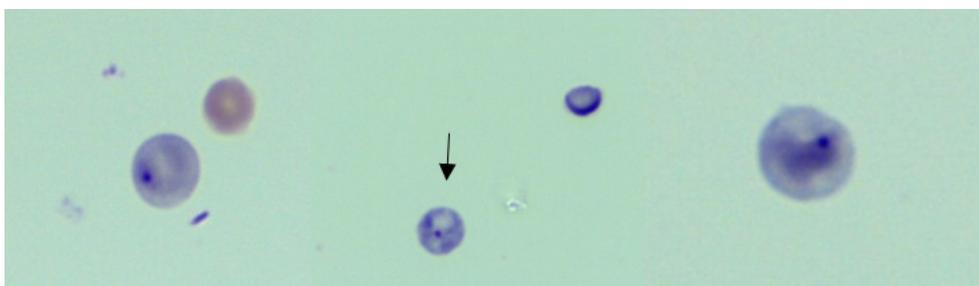
**Análisis estadístico:** Los Análisis estadísticos realizados fueron Anova y test de Tukey, utilizando el programa SPSS (21).

## RESULTADOS

Para evaluar los posibles efectos genotóxicos y citotóxicos de la plantas de uso medicinal *Sida cordifolia* se trataron ratones con tres concentraciones del extracto acuoso de la misma. Las concen-

traciones utilizadas se eligieron tomando como referencia al uso de la planta por una persona de 60 Kg y se trataron los ratones en proporción al peso. Los resultados obtenidos en la evaluación del potencial genotóxico y citotóxico se muestran en la **Tabla 1**. Se contaron 2000 eritrocitos policromáticos por animal tratado, en donde se observó la cantidad de eritrocitos policromáticos con y sin micronúcleos (**Figura 2**); también se muestra la ratio obtenida entre el total de eritrocitos policromáticos y normocromáticos en el análisis de citotoxicidad. Los resultados obtenidos con el extrac-

to acuoso de malva blanca fueron dosis dependiente, siendo la dosis mayor evaluada, estadísticamente significativa, cuando comparada las frecuencias con el control negativo. Con relación al análisis del potencial citotóxico, se observó que los tratamientos realizados con malva blanca no fueron citotóxicos en las concentraciones evaluadas en este estudio. El control positivo, ciclofosfamida, resultó significativo, al compararse con la frecuencia de eritrocitos micronucleados y con la ratio encontradas en el control negativo, lo que valida el ensayo.



**Figura 2:** Eritrocitos policromáticos micronucleados observados en el control positivo (flecha)

**Tabla 1:** eritrocitos policromáticos micronucleados y la *ratio* entre eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocromáticos

Tratamientos	Total de células		
	EPC	EPCMN	Ratio EPC/ENC
Control negativo	9996	04	1,495
Control positivo	9948	52*	1,142*
0,01%	9991	09	1,535
0,02%	9987	13	1,485
0,04%	9981	19*	1,487

EPC: Eritrocitos policromáticos, EPCMN: eritrocitos policromáticos con micronúcleo. ENC: eritrocitos normocromáticos. %: concentración utilizada. \* $p < 0,05$

## DISCUSIÓN

La toxicidad de las medicinas tradicionales a base de hierbas no se ha evaluado por completo en la mayoría de los casos y las plantas medicinales pueden ser extremadamente dañinas para la salud humana (Sponchiado *et al.*, 2016). Para el uso seguro de las plantas de las plantas de uso medicinal, las validaciones científicas son obligatorias (Mehreen *et al.*, 2016). Se recomienda una batería de ensayos para detectar posibles agentes genotóxicos, y entre estos se encuentra el ensayo de micronúcleos in vivo (Kramer, 1997). En este estudio se investigó el potencial genotóxico del extracto acuoso de *S. cordifolia*, utilizando como biomarcador la formación de micronúcleo en eritrocitos de médula ósea de ratones. Los micronúcleos se forman como resultado al daño estructural en los cromosomas y/o el retraso del cromosoma entero durante la anafase (Doherty *et al.*, 2012). Esta técnica es una de más utilizadas para evaluar extractos de plantas de uso medicinal (Sponchiado *et al.*, 2016). Las dosis utilizadas en este ensayo se referenciaron en las cantidades utilizadas por un ser humano de 60 kg de peso corporal. En la evaluación realizada en este trabajo de investigación, se observó que la concentración de 0,01% no fue significativa, así como la concentración de 0,02%, que se seleccionó de acuerdo al uso en humanos. La respuesta obtenida en este trabajo fue de tipo dosis dependiente. Otros autores como Montero *et al.*, (2001), han reportado que seis plantas medicinales analizadas por esta técnica, no mostraron un efecto genotóxico, a pesar de haber evaluado

dosis de 2.000g/peso del animal, a pesar de las bajas concentraciones evaluadas en este trabajo, nuestro extracto resultó genotóxico en la concentración más alta analizada, esto podría indicar, que, esta planta puede ser genotóxica para el uso humano. Otros estudios realizados, utilizando la técnica de evaluación de MN en ratones, en plantas de uso medicinal como la *Luehea divaricata*, se observó que el extracto de la misma no presentó actividad mutagénica al ser comparada con su control negativo (Segovia *et al.*, 2016). Además de los usos que se le da al extracto de esta planta, se describen otras, como en el tratamiento de disentería crónica, asma, gonorrea, blenorrea, desordenes nerviosos y otros (Dinda *et al.*, 2015). Este trabajo tuvo como resultado la obtención de información sobre los efectos secundarios del extracto acuoso de *S. cordifolia*, y se ha observado que presenta un potencial genotóxico, por lo que se debe considerar su uso con precaución. En el control positivo se registró un valor significativo al igual que Fernández *et al.*, (2005), que también utilizaron Ciclofosfamida para dicho control.

En la evaluación del efecto citotóxico del extracto de *S. cordifolia* en células de médula ósea. Los resultados registrados con el extracto acuoso no demuestran valores significativos, de igual manera con los valores de Mella-García *et al.*, (2016), donde evaluaron una especie comercial de *Allium* sp. mediante el ensayo de MN en células de ratones, ensayo en el cual tampoco registraron valores significativos en cuanto a la disminución de *ratio* EPC/ENC. Una disminución en la *ratio* EPC/

ENC, de los grupos tratados comparados con el control negativo, indica toxicidad para la médula ósea (Suzuki *et al.*, 1989, Rabello-Gay *et al.*, 1991). Las *ratios* de los tratamientos con *S. cordifolia* fueron iguales al control negativo, por lo que podemos sostener que esta planta, en estas condiciones experimentales, tiene un potencial genotóxico pero no citotóxico.

## CONCLUSIÓN

Se evaluó el efecto genotóxico y citotóxico del extracto acuoso de *Sida cordifolia* en eritrocitos de médula ósea de *Mus musculus*. Para el control genotóxico las concentraciones del 0,01% y 0,02% no presentaron significancia, en cuanto a la concentración del 0,04% se registró un nivel significativo en comparación al control negativo. El extracto acuoso no registró un nivel significativo en la evaluación de su efecto citotóxico, en las concentraciones evaluadas. Considerando el efecto observado, se hace necesario realizar otras evaluaciones del extracto de *Sida cordifolia*, en células humanas y/o en hepatocitos de modelos murinos, con el objetivo de establecer el nivel de toxicidad de esta planta de uso medicinal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Basualdo I., Soria, N. Ortíz M. & Degen R. (2004). Plantas comercializadas en los mercados de Asunción y Gran Asunción. *Rojasiana* (PY). 6 (1): 95 - 114.
- Degen de Arrúa R. L., Céspedes de Zárate C. I., González Y.P., Delmás de Rojas G.E., & González de García M.G. (2011). Catálogo Ilustrado de 80 plantas medicinales del Paraguay. FCQ-UNA, JICA (Editores).
- Degen de Arrúa R.L. & González Y. (2014). Plantas utilizadas en la medicina popular paraguaya como antiinflamatorias. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 13 (3): 213 – 231.
- Dhalwal K., Deshpande Y. S., Purohit A. P., & Kadam, S. S. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of *Sida cordifolia*. *Pharmaceutical Biology*, 43(9), 754–761. <https://doi.org/10.1080/138802005004064385>.
- Dhawan A. & Bajpayee M. (2019). Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. 2031, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9_7), © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019.
- Dinda B., Das N., Dinda S., Dinda M., & Silsarma I. (2015). The genus *Sida* L. - A traditional medicine: Its ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological data for commercial exploitation in herbal drugs industry. *J Ethnopharmacol.* 2015 Dec 24;176:135-76. doi: 10.1016/j.jep.2015.10.027. Epub 2015 Oct 21. PMID: 26497766 Review.
- Doherty A. T., Baumgartner A., & Anderson D. (2012). Cytogenetic In Vivo Assays in Somatic Cells. *Genetic Toxicology: principles and Methods*. Parry JM y Parry EM.

- Editors. Humana press. 450pp.
- Fernández, I., Menéndez, R. G., Martínez, A. G., & Cambián, H. G. (2005). Evaluación Genotóxica in vivo del D-004 en el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea en Ratonés. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 36
- Hayashi, M. (2016). The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes and Environment*, 38(1). doi:10.1186/s41021-016-0044-x.
- Kramer P.J. (1999) Genetic toxicology. *J-Pharm-Pharmacol* 4. 395-405.
- Mehreen A., Waheed M., Liaqat I., & Arshad N. (2016). Phytochemical, Antimicrobial, and Toxicological Evaluation of Traditional Herbs Used to Treat Sore Throat. *Biomed Res Int.* :8503426. doi: 10.1155/2016/8503426. Epub 2016 Jun 26.
- Mellado-García P., Puerto M., Prieto A. I., Pichardo S., Martín-Cameán A., Moyano, R & Cameán, A. M. (2016). Genotoxicity of a thiosulfonate compound derived from *Allium* sp. intended to be used in active food packaging: In vivo comet assay and micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 800, 1-11.
- Montero A. R., Arnáez G. P., Esperón N. F., Barro A. B., Pérez M. A., & Rodríguez A. M. (2001). Estudio genotóxico in vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. *Revista de Toxicología*, 18(2), 75-78.
- Muñoz, O. (2001). Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología. Santiago, Chile: Universitaria. 330 p.
- OECD (2016). Test No. 474: mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD Publishing
- Pin A., González G., Marín G., Céspedes G., Cretton S., Christen P., & Roguet D. (2009). Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción. Asunción, PY: Asociación Etnobotánica Paraguaya
- Rabello-Gay M. N., Rodrigues M. A. L. R., & Monteleone-Neto R. (Eds.). (1991). *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avalizacao*. Ribeirao Preto: Sociedade Brasileira de Genética.
- Ravi kanth V., & Diwan, P. V. (1999). Analgesic, antiinflammatory and hypoglycaemic activities of *Sida cordifolia*. *Phytotherapy Research*, 13(1), 75–77. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199902\)13:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199902)13:1).
- Schmid W. (1975). The micronucleus test for cytogenetic analysis. *Chemical Mutagens* 4.31.
- Segovia E.A., Arrúa R.A., Barrozo N.C., Duré R.D., Nakayama H.D. & Peralta I. (2016). Evaluación de los efectos mutagénicos/antimutagénicos de *Luehea divaricata* en ratones. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 14(3).
- Sommer S., Buraczewska I., & Kruszewski M. (2020). Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol*

- Sci. 2020 Feb 24;21(4):1534. doi: 10.3390/ijms21041534.
- Sponchiado G., Adam M. L., Silva C.D., Soley B. S., de Mello-Sampayo C., Cabrini D. A., Correr C.J., & Otuki MF. (2016). Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *J Ethnopharmacol.* 2016 Feb 3;178:289-96. doi: 10.1016/j.jep.2015.10.026. Epub 2015 Dec 8. PMID: 26680588.
- Soria, N. & Ramos, P. (2015). Uso de plantas medicinales en la atención primaria de salud en Paraguay: algunas consideraciones para su uso seguro y eficaz. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (PY).* 13 (2): 8 - 17.
- Subramanya M. D., Pai S. R., Upadhyaya V., Ankad G. M., Bhagwat S. S. & Hegde H. V. (2015). Total polyphenolic contents and in vitro antioxidant properties of eight *Sida* species from Western Ghats, India. *J Ayurveda Integr Med.* 2015 Jan-Mar;6(1):24-8. doi: 10.4103/0975-9476.146544.
- Thi Tran H., Gao X., Kretschmer N., Pferschy-Wenzig E. M., Raab P., Pirker T., Temml V., Schuster D., Kunert O., Huynh L., & Bauer R. (2019). Anti-inflammatory and antiproliferative compounds from *Sphaeranthus africanus*, *Phytomedicine.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152951>
- Suzuki Y., Nagae Y., Li J., Sakaba H., Mozawa K., Takahashi A., & Shimizu, H. (1989). The micronucleus test and erythropoiesis. *Effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio).* *Mutagenesis,* 4(6), 420–424. doi:10.1093/mutage/4.6.420.

**CONTENIDO POR SECCIONES**

**Biotecnología Vegetal**

- 5-12** Propagación vegetativa de *Pongamia pinnata* (L.) Pierre (Algarrobo aceitero) mediante mini esquejes de raíz  
*Cantero García, I.; Benítez Núñez, J.; Enciso, M.; Samudio Oggero A.*

**Ficología**

- 13-24** Floraciones de *Cyanotetras sp.* en cuerpos de agua salobres eutrofizados del Paraguay durante el 2020  
*Dos Santos, M., Morel, R., Ávalos, C, Méndez M. S., Benítez, G. A.*

**Fitoquímica**

- 25-37** Evaluación de *Campyloneurum phyllitidis* y de *Asplenium serratum* sobre el desarrollo embrionario de *Danio rerio*  
*Benítez Acuña, J.A; Ibarra, P; López, Ty Segovia, E.*

**38-49**

- Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto vegetal de las hojas de *Solanum granuloso-leprosum* Dunal  
*Aguilar, S. ; Mc Donald, A.; Diaz, A.; Martínez, M.; Moura-Mendes, J.*

**Micoquímica**

- 50-61** Evaluación del perfil químico de metabolitos secundarios del hongo comestible *Oudemansiella cubensis* silvestre y cultivado y, factibilidad de producción indoor  
*Veloso Paredes, B.; Campi Gaona, M.; Maubet Cano, Y. ; Mancuello Chaparro, C.*

**Toxicología**

- 62-70** Toxicidad del extracto acuoso de *Sida cordifolia* L. mediante el ensayo de micronúcleo en ratones  
*Caballero, H.; Paredes, K.; Torres, E.; Segovia, E.*