

Vol. 11(1) – 2019  
ISSN 2304-2907 (on line)

# *Steviana*



*Haematomma flexuosum* Hillman. Talo en fresco, con apotecios. Parque Nacional Ybycu'i, Paraguarí, Paraguay



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:

**Dr. Vinícius Bednarczuk de Oliveira**  
Fitoquímica y Química Analítica  
UNIANDRADE - Centro Universitário  
Campos de Andrade - Curitiba, Paraná, Brasil.  
UNINTER - Centro Universitário Internacional  
- Curitiba, Paraná, Brasil.

**Dr. Gilberto Antonio Benítez Rodas**  
Microbiología y Parasitología  
CEMIT. Universidad Nacional de Asunción

**Prof. Dr. Fernando J.C. Magalhães Filho, Eng.**  
Programas de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária; y em Desenvolvimento Local  
Universidade Católica Dom Bosco - UCDB

**Dra. Andrea Michlig**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (FACENA-UNNE)  
Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE)

**Dr. Juan Manuel Rodriguez.**  
Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.

**Dra. Gloria Rodrigo Lira**  
Unidad de Vigilancia Ambiental y Genotoxicología. Instituto de Biología Molecular y Biotecnología.  
Universidad Mayor de San Andrés

**Prof. Dr. Marc Stadler**  
Department Microbial Drugs  
Helmholtz Centre for Infection Research  
Bldg. B, Room 175a  
Inhoffenstrasse 7  
38124 Braunschweig, Germany

**MSc. Deidamia Franco**  
Coordinadora del Laboratorio de Genética toxicológica. Facultad de Ciencias de la Salud Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción

**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**

María Vera Jiménez

**Asistentes de edición**

Claudia Mancuello (FACEN – UNA)

**Diseño y diagramación**

María Vera Jiménez

**Fotografía de tapa**

***Haematomma flexuosum* Hillman.**

Talo en fresco, con apotecios. Parque Nacional Ybycu'í, Paraguari, Paraguay. Autor: Lorena Martínez.

**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

**Claudia Pereira S.**

FACEN-UNA, Paraguay

**Miguel Angel Martínez**

FACEN-UNA, Paraguay

**Christian Vogt P.**

FACEN-UNA, Paraguay

**Michelle Campi G.**

FACEN-UNA, Paraguay

**Gloria Yaluff M.**

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**

- 3-14 Desempeño de humedales construidos a escala piloto para el tratamiento de agua residual urbana utilizando *Cyperus giganteus* Vahl y *Typha domingensis* Pers.  
*López, T.R., Duré G.M., Doldán, M.T., Galeano, E.F., Marín, D.*

**Fitoquímica**

- 15-25 Efecto antimutagénico del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* Link (Pata de buey) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática  
*Marín Insfrán, L.; Gayozo, E. & Zamorano-Ponce, E.*

**Micología**

- 26-41 Preliminary evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioactive compounds in some species of basidiomycetes fungi from Paraguay  
*Campi, M.; Mancuello, C.; Ferreira, F.; Maubet, Y.; Cristaldo, E.; Benítez, D.*

**Sistemática y Taxonomía**

- 42-54 Contribución al estudio de líquenes corticícolas del Parque Nacional Ybycuí, Departamento de Paraguari  
*Martínez Bernié, L.; Mereles, F.; Estrabou, C.*

# Desempeño de humedales construidos a escala piloto para el tratamiento de agua residual urbana utilizando *Cyperus giganteus* Vahl y *Typha domingensis* Pers.

López, T.R.<sup>1\*</sup>, Duré G.M.<sup>2</sup>, Doldán, M.T.<sup>3</sup>, Galeano, E.F.<sup>2</sup>, Marín, D.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biotecnología Ambiental.

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología.

<sup>3</sup> Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Agrarias. Ingeniería Ambiental.

<sup>4</sup> Empresa de Servicios Sanitarios del Paraguay (ESSAP S.A)

\*E-mail del autor: tlopez@facen.una.py

---

**Desempeño de humedales construidos a escala piloto para el tratamiento de agua residual urbana utilizando *Cyperus giganteus* y *Typha domingensis*.** El vertido de aguas residuales de origen industrial y urbano sin previo tratamiento es un problema creciente en el Paraguay. La búsqueda de tecnologías para disminuir los impactos ambientales generados por esta problemática se constituye un área de interés en los últimos tiempos. La fitorremediación es una alternativa de remediación que propone la aplicación de humedales artificiales o construidos, donde un complejo sistema constituido por plantas, microorganismos y sustrato actúa en conjunto para remover los contaminantes. El objetivo del presente trabajo fue describir el desempeño y la eficiencia de dos macrófitas en humedales construidos tipo flujo subsuperficial horizontal para el tratamiento de aguas residuales urbanas en la ciudad de San Lorenzo, Paraguay. Como tratamiento primario se utilizó un tanque séptico, seguido de dos humedales, una con *Cyperus giganteus* (CG), y otra con *Typha domingensis* (TD). Los resultados de los análisis de las aguas muestran que ambos humedales construidos a escala piloto resultaron ser efectivas para el tratamiento empleado demostrando una reducción importante para cada parámetro estudiado respecto a la entrada al sistema. La remoción (%) de nitrógeno amoniacal fue de 42% (CG) y 65% (TD); para fósforo total fue de 45% (CG) y 58% (TD), la demanda bioquímica de oxígeno 64% (CG) y 81% (TD), mientras que para la demanda química de oxígeno la eficiencia fue de 40% (CG) y 61% (TD) respectivamente. **Palabras clave:** agua residual urbana, biorremediación, helófitas

**Performance of wetlands constructed on a pilot scale for the treatment of urban wastewater using *Cyperus giganteus* and *Typha domingensis*.** The discharge of industrial and urban wastewater without prior treatment is a growing problem in Paraguay. The search of technologies to reduce the environmental impacts generated by this problem, is an area of interest in recent times. Phytoremediation is a remediation alternative that proposes the application of artificial or constructed wetlands where a complex system of plants, microorganisms, and substrate act together to remove contaminants. The objective of this work was to describe the performance and efficiency of two macrophytes in constructed wetlands of horizontal subsurface flow for the treatment of urban wastewater in the city of San Lorenzo. A septic tank was used as primary treatment, followed by two wetlands, one with *Cyperus giganteus* and other with *Typha domingensis*. The results of water analyzes show that both wetlands built at pilot scale proved to be effective for the treatment used, demonstrating a significant reduction for each parameter studied with respect to the entrance to the system. The removal (%) of ammoniacal nitrogen was 42% (CG) and 65% (TD); for total phosphorus it was 45% (CG) and 58% (TD), the biochemical oxygen demand was 64% (CG) and 81% (TD), while for chemical oxygen demand efficiency it was 40% (GC) and 61% (TD), respectively.

**Keywords:** Urban wastewater, bioremediation, helophytes

---

## INTRODUCCIÓN

El vertido de aguas residuales de origen industrial y urbano sin previo tratamiento se constituye en un problema creciente en países como el Paraguay. Su consecuencia inmediata es la liberación de compuestos químicos y materia orgánica en concentraciones elevadas deteriorando los cuerpos de aguas con graves efectos ambientales (Salas Dueñas, 2015; Silvero & Kunze, 2013). Las aguas residuales deben cumplir con ciertos requerimientos y estándares legales antes de su vertido, precisando para ello algún tipo de tratamiento. El tratamiento necesario, depende en gran medida de la composición y calidad del agua que se desea obtener. El tratamiento puede realizarse por diversos procesos fisicoquímicos y biológicos. Dentro de estos últimos destacan los métodos que emulan procesos naturales, constituyéndose los mismos en alternativas de tratamiento de aguas residuales eficaces y extensamente recomendadas (Arias & Brix, 2003).

La fitorremediación consiste en la utilización de plantas y los microorganismos que habitan en el sistema radical, para la limpieza de ambientes contaminados. Es una alternativa ecológica comparada con los métodos convencionales de tratamiento (Sánchez Yáñez, 2011). Una de las tecnologías fitorremediadoras se consigue mediante la aplicación de humedales artificiales o construidos (HC). Son sistemas biogeoquímicos diseñados que imitan el humedal natural en el proceso de remediación, donde un complejo sistema de plantas, microorganismos y sustrato del suelo actúan en conjunto para tratar las aguas residuales. Los humedales han sido reconocidos en todo el mundo como un

método rentable para tratar aguas residuales de fuentes domésticas e industriales, escorrentías de aguas pluviales de carreteras, drenajes de minas de carbón, desechos agrícolas y lixiviados de vertedero (Vymazal, 2010).

Existen dos tipos de sistemas de humedales construidos utilizados para el tratamiento de agua residual en las que el flujo de agua es horizontal, los denominados humedales de flujo libre (HFL) y los sistemas de flujo subsuperficial (HFSS) (Morales, López, Vera, & Vidal, 2013). Los HFSS proponen el uso de macrófitas enraizadas sobre un lecho sólido impermeabilizado. Estos sistemas se caracterizan porque la lámina de agua no es visible, y el flujo atraviesa el lecho relleno con arena, grava o suelo, donde crecen las plantas, que sólo tienen las raíces y rizomas en contacto con el agua (Metcalf & Eddy, 1998). Los humedales HFSS deben ser construidos con una leve pendiente en el fondo, pero manteniendo en lo posible condiciones hidráulicas de flujo laminar. Los lechos deben ser aislados del suelo subyacente para evitar la contaminación de suelos y de las aguas subterráneas, la profundidad de los lechos no suele superar los 0,60 metros (Arias & Brix, 2003).

El papel de la vegetación en los humedales está determinado fundamentalmente por las raíces y rizomas enterrados, tienen la capacidad de transferir oxígeno a través de sus tejidos internos desde la atmósfera hasta la parte subterránea (García Serrano & Corzo Hernández, 2008). Dos plantas palustres con capacidad de ser utilizadas en los humedales construidos son *Cyperus giganteus* y *Typha domingensis*. La primera es comúnmente conocida por su nombre vernáculo en Guaraní como “*piri*”, se caracteriza por ser perenne, acuática y con

raíz fija al lecho, posee grandes rizomas y espigas cilíndricas. Estas plantas conforman asociaciones en las comunidades acuáticas conocidas como pirizales (Mereles, 2004). *T. domingensis* es una especie comúnmente encontrada en humedales naturales de ambas regiones del Paraguay, conocida de forma vernácula como “totora”. Esta última es una de las macrófitas acuáticas más comúnmente utilizadas en sistemas de humedales construidos junto a *Typha angustifolia*, *Phragmites australis*, *Schoenoplectus californicus* y *Scirpus americanus*, (Morales et al., 2013). *T. domingensis* ha mostrado ser efectiva como cultivo mono-específico en humedales construidos para el tratamiento terciario de afino de efluente de la industria metalúrgica (Alarcon, Zurita, Lara-Borrero, & Vidal, 2018); efluentes cloacales e industriales (Kadlec & Wallace, 2009; Vymazal, 2010) y para el tratamiento de lodos (Magri, Gorrezen, Francisco, & Sezerino, 2016).

En la literatura se registran pocos antecedentes con *C. giganteus*. Los investigadores Travaini-Lima, Andreia, Silva, & Sipaúba-Tavares (2015), estudiaron la capacidad de remoción de metales con *C. giganteus*, *T. domingensis* y *E. crassipes* en aguas de acuicultura y agricultura de regiones tropicales. Ellos encontraron que *C. giganteus* presentó buena capacidad de formación de biomasa incluso en época seca, pero arrojó los menores niveles de remoción en comparación con las dos plantas, y recomiendan a *T. domingensis* y *E. crassipes* para remoción de metales. En general en humedales construidos las especies más utilizadas dentro del género *Cyperus* son *Cyperus ligularis* y *Cyperus alternifolia* y *Cyperus papyrus* (Alarcon et al., 2018; da Silva, Reis, Medeiros,

Oliveira, & Gouveia, 2009; Pelissari et al., 2017)

El objetivo del presente trabajo fue describir el desempeño y eficiencia en la remoción de dos macrófitas en humedales construidos tipo flujo subsuperficial horizontal (FSSH), para el tratamiento de aguas residuales urbanas de la ciudad de San Lorenzo-Paraguay, utilizando *C. giganteus* y *T. domingensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio de estudio

Los humedales a escala piloto se construyeron en el predio de la Estación de Tratamiento de Aguas Residuales de la Ciudad de San Lorenzo perteneciente a la Empresa de Servicios Sanitarios del Paraguay (ESSAP S.A). La planta de tratamiento está en el límite del barrio Santa María, a unos cincuenta metros del Arroyo San Lorenzo, con las coordenadas 25°19'41.5" S y 57°29'25.1" W.

### Diseño y construcción de los humedales piloto

Para el diseño se siguieron las propuestas establecidas por varios autores (Alarcon et al., 2018; Delgadillo, Camacho, Pérez, & Andrade, 2010; EPA, 1993), asumiendo el criterio de la desnitrificación. Se supuso comportamiento de un reactor de flujo ideal en pistón, y que el contaminante se degrada siguiendo modelos cinéticos de primer orden (Ecuación 1).

$$\frac{C_e}{C_0} = \exp(-K_T \times t) \quad (1)$$

$$A_s = \frac{Q \times \ln\left(\frac{C_{Ne}}{C_{No}}\right)}{K_T \times y \times n} \quad (2)$$

El área superficial ( $A_s$ ) se determinó según la ecuación (2), donde  $Q$  es el caudal promedio del humedal en  $\text{m}^3 \text{d}^{-1}$ ,  $C_{Ne}$  y  $C_{No}$  la concentración de nitratos en el efluente y afluente respectivamente;  $K_T$ , la constante de reacción de primer orden dependiente de la temperatura ( $\text{d}^{-1}$ );  $t$  el tiempo de retención hidráulico;  $y$ , la profundidad de agua en el humedal;  $n$ , la porosidad del medio. El tiempo de retención hidráulico (TRH) fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$TRH = \frac{A_s \times y \times n}{Q} \quad (3)$$

El dimensionado hidráulico permitió determinar el largo y ancho una vez conocida  $A_s$ . Los valores asumidos fueron los siguientes: pendiente ( $p$ )=0,03 % decimal;  $n$ =0,45% decimal;  $h$ =0,6 m y relación largo: ancho de 3:1 y profundidad del lecho de grava de 0,35 m. Las dimensiones finales de cada humedal fueron obtenidas al aplicar las ecuaciones (2) y (3) quedaron en:  $A_s=12\text{m}^2$ ;  $L \times a=6 \times 2$  m y TRH del sistema de 2,03 d. En la Tabla 1 se resumen las condiciones de operación de los humedales durante el estudio.

Se construyeron dos humedales, el primero para *C. giganteus* (CG), el segundo para *T. domingensis* (TD). Para el efecto el suelo fue excavado, nivelado y posteriormente impermeabilizado con un material aislante de polietileno de 250 $\mu\text{m}$  de espesor. Cada humedal contaba con una

**Tabla 1.** Condiciones de operación de los humedales construidos

Condiciones de operación	Valor
Duración, meses	3
Temperatura del aire, °C	24
Caudal, $\text{m}^3 \text{d}^{-1}$	1
Carga orgánica, g DQO $\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$	2,2
Carga hidráulica, $\text{mm d}^{-1}$	83

zona de entrada y otra de salida, cada una con 1m de longitud. Como medio granular se utilizó arenisca de 3-5 cm en la zona con plantas, y de 7-10 cm de diámetro en las zonas de entrada y salida (Fig. 1). El agua residual fue propulsada hasta el tanque con una bomba sumergible portátil para agua sucia de 0,5 Hp marca PEDROLLO (TOP 2), de capacidad máxima de  $10 \text{m}^3 \text{h}^{-1}$ . El efluente crudo que ingresa al sistema recibió un tratamiento preliminar en un tanque séptico (TS, P1). De esta última el agua pasa a los humedales dispuestos en paralelo CG (P2) y TD (P3).

Los ejemplares de *C. giganteus* y de *T. domingensis* fueron colectados de la zona de humedales del Lago Ypacarai, y posteriormente fueron trasladadas al lugar de estudio y aclimatadas por 30 días antes del inicio del monitoreo. La identificación taxonómica fue realizada en el Laboratorio de Recursos Vegetales de la FACEN. Fueron depositados originales de cada especie en el herbario perteneciente al mencionado laboratorio. *C. giganteus* (G. Duré & C. Vogt, 01) y *T. domingensis* (G. Duré & C. Vogt, 02)

### Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos

Se tomaron diez muestras simples del efluente de cada humedal en un periodo de tres meses, comprendido entre diciembre de 2015 y febrero de 2016, durante la esta-





**Figura 1.** Humedales construidos. (A) Aspecto de los humedales, en primer plano *C. giganteus*. (B) Aspecto de los humedales a los 70 días con la celda *T. domingensis* en primer plano.

ción de verano. Los análisis fisicoquímicos se determinaron en el Laboratorio de Efluentes de la ESSAP, estos son: nitrógeno amoniacal ( $N-NH_4^+$ ), fósforo total (P-total), demanda biológica de oxígeno a los cinco días (DBO), y demanda química de oxígeno (DQO). Los análisis se determinaron siguiendo las especificaciones de APHA (1998). Otros parámetros como temperatura, pH, oxígeno disuelto (OD) fueron determinados *in situ* con un equipo multiparamétrico HANNA serie HI9828 (HANNA Instruments, Alemania) perteneciente al Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la FACEN. Los parámetros microbiológicos analizados fueron los siguientes: mohos y levaduras (ML), recuento de aerobios mesófilos (RAM) ambos por el método Petrifilm (3M Placas Petrifilm™); coliformes fecales (CF/S.M 9222D), coliformes totales (CT/S.M 9222B) mediante la técnica de filtración por membrana según el método APHA (1998). Las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la FACEN.

La eficiencia de los humedales construidos fue calculada, en términos de eficiencia de la remoción según la ecuación 4.

$$EF (\%) = \frac{C_o - C_e}{C_o} \times 100 \quad (4)$$

Donde *EF* es la eficiencia en término porcentaje (%); *C<sub>e</sub>* y *C<sub>o</sub>* son las concentraciones del contaminante en el efluente y afluente del sistema, respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los análisis de las aguas del efluente del tanque séptico (P1), los humedales construidos a escala piloto con *C. giganteus* (P2), *T. domingensis* (P3) se presentan en la Tabla 2, con el promedio  $\pm$  SD para cada parámetro. El trabajo se enfoca en el estudio del desempeño de los humedales, por lo que no se analiza el comportamiento del tanque séptico.

### Variación del potencial de hidrógeno y oxígeno disuelto

La media de los valores de pH del efluente del tanque séptico fue de 6,97 UpH, con una ligera disminución a la Salida de los humedales con 6,71 para CG y 6,62 para TD (Tabla 2). La resolución 222/02 de MADES, establece como parámetro de vertido de efluentes que el valor

**Tabla 2.** Valores medios y desviación estándar de la concentración de los parámetros medidos en efluente del tanque séptico y los humedales construidos.

Determinaciones	TS (P1)	CG (P2)	TD (P3)
pH, UpH	6,97 ± 0,28	6,71 ± 0,42	6,62 ± 0,38
OD, mgO l <sup>-1</sup>	0,10 ± 0,14	1,07 ± 0,72	2,03 ± 0,91
N-amoniacal, mgN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> l <sup>-1</sup>	10,46 ± 3,92	6,98 ± 3,41	3,64 ± 2,55
Fósforo Total, mgP l <sup>-1</sup>	1,68 ± 1,08	1,22 ± 0,60	0,70 ± 0,36
DBO, mgO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup>	10,77 ± 3,72	4,42 ± 3,05	2,03 ± 0,82
DQO, mgO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup>	26,40 ± 3,41	18,10 ± 6,95	10,36 ± 3,25
CF, UFC100 ml <sup>-1</sup>	1,69E+05 ±1,33E+05	6,31E+03 ±6,46E+03	4,69E+03 ±5,27E+03
CT, UFC 100 ml <sup>-1</sup>	2,14E+06 ±8,78E+05	2,09E+05 ±1,79E+05	2,23E+05 ±2,09E+05
RAM, UFC 100 ml <sup>-1</sup>	3,79E+06 ± 2,47E+06	1,64E+06 ±1,56E+06	1,64E+06 ±1,80E+06
ML, UFC ml <sup>-1</sup>	157 ± 70	36 ± 36	44 ± 32

TS: tanque séptico, CG: humedal con *C. giganteus*, TD: humedal con *T. domingensis*; OD: oxígeno disuelto; DBO: Demanda Biológica de Oxígeno 5 días; DQO: Demanda Química de Oxígeno; CF: coliformes fecales; CT: coliformes totales; RAM: recuento de aerobios mesófilos totales; ML: corresponde a mohos y levaduras.

del pH debe estar comprendido entre 5 y 9 UpH, por lo que podemos concluir que ambos humedales permiten cumplir con la normativa nacional vigente para el lanzamiento a cuerpos hídricos.

Los valores de pH obtenidos en este trabajo son ligeramente inferiores a lo reportado en un estudio similar con efluentes domésticos, con valores promedios comprendidos entre 7,39 y 7,42 UpH utilizando *T. domingensis* con diferentes tipos de grava (Jovania, Colares, & Sandri, 2013).

El OD medido a la salida del humedal con *C. giganteus* fue de 1,07 mgO<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>; mientras que en el sistema con *T. domingensis* fue de 2,03 mgO<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> (Tabla

2). En ambos casos se observa un incremento de la concentración de OD a la salida de los humedales respecto a la entrada al sistema (0,1 mgO<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>). En los humedales tipo FSSH (flujo subsuperficial horizontal) generalmente se presentan bajas concentraciones de OD, por lo que la concentración de este gas presente en ambos humedales estaría relacionado con la baja carga de materia orgánica presente en el agua residual que ingresa al sistema (10,77 mgO<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> de DBO). Nuestro trabajo contrasta con las mediciones obtenidas en humedales construidos con *Phragmites australis*, donde se reportan valores extremadamente bajos de OD, variando entre 0,11 a 0,12 mgO<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> (García et al., 2004).

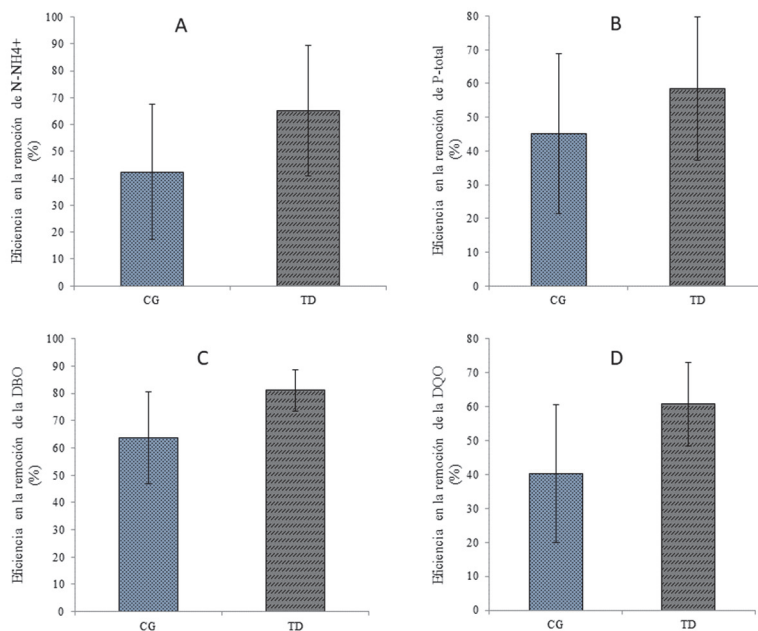
### Remoción de nutrientes

Las concentraciones de nitrógeno amoniacal fueron de 10,46; 6,98 y 3,64 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup> l<sup>-1</sup> a la salida de tanque séptico, y en los humedales con CG y TD respectivamente. En Paraguay la normativa establece como nivel máximo de N-amoniacal es de 5 mg l<sup>-1</sup> en efluentes vertidos tras su tratamiento. El humedal con TD produjo un efluente que cumple con la Resolución 222/02 del Ministerio del Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADES, 2002).

La remoción de N-amoniacal arrojó valores medios de 42±25 % para CG y 65±27 % para el humedal con TD (Fig. 2.a). Estos resultados son superiores a los obtenidos por García *et al* (2004), trabajando a escala piloto con *P. australis* en el cual obtuvieron remociones entre 24-30 %. Por su parte, Zhong *et al.*(2015) determinaron valores de remoción entre 18-20 % utilizando *Iris sibirica* y *Thalia dealbata*; y demostraron que N-amoniacal es removido mejor si se produce microaireación del sistema. La remoción de este parámetro suele ser alrededor del 30% en sistemas FSSH, y ocurre por los procesos de nitrificación y desnitrificación, siendo una condición limitante la disponibilidad de OD en el medio, así como la concentración de materia orgánica (García Serrano & Corzo Hernández, 2008). Trabajando con *Cyperus articulatus*, en un estudio en el que se evaluó el efecto de plantas nativas de Colombia para la remoción de materia orgánica y nitrógeno, los investigadores reportaron un valor excepcional alto de 90% de remoción de N-NH<sub>4</sub> (Carga hidráulica de 460 mm d<sup>-1</sup>) (Caselles-Osorio, Vega, Camilo, Casierra-Martínez, & Euliser, 2017).

Los valores promedio de fósforo (P-total) fueron de 1,68; 1,22 y 0,7 mgP l<sup>-1</sup> a la salida de tanque séptico, CG y TD respectivamente (Tabla 2). Las concentraciones que ingresaron al sistema fueron bajas, siendo incluso menores al límite máximo de vertido de 5 mgP l<sup>-1</sup> que establece MADES.

Las remociones obtenidas a lo largo del estudio para de P-total, fueron de 45±24 %, 58± 21% para CG y TD (Fig. 2.b). La depuración del fósforo en humedales FSSH no suele superar el 10-20% (Kadlec & Wallace, 2009), sin embargo en este trabajo fueron sobrepasados dichos márgenes. García y Corzo Hernández (2008) indican que en los humedales FSSH la eliminación de nutrientes es modesta cuando se tratan aguas residuales urbanas de tipo medio (eliminan entre un 10% del N y un 20% del P), no obstante en aguas residuales diluidas su contribución es mayor (> del 50%). Como la remoción de fósforo es baja en los humedales construidos, estos no suelen ser diseñados para el efecto (Hoffmann, Platzer, Winker, & Muench, 2011). La acción biológica en la remoción del fósforo es pequeña, siendo su vía de eliminación por procesos de sorción y precipitación. Además, la composición mineralógica es importante, dependiendo principalmente de su contenido de calcio, hierro y aluminio (Vohla, Kõiv, Bavor, Chazarenc, & Mander, 2011). Maine, Suñe, Hadad, Sánchez, & Bonetto, (2009) estudiaron la relación entre el cambio de vegetación dominante en un humedal a escala planta (TRH= 7-12 d; L×a=50×40) y su efecto en la remoción de nutrientes y metales; encontraron que *T. domingensis* remueve P-total un 14% en promedio, de los cuales el 38% de la disminución de fosforo es causada por la macrófita y el 62% retenido por el



**Figura 2.** Gráficos barra-error para la eficiencia en la remoción del P-total, N- amoniacal, DQO y DBO. CG (humedal con *C. giganteus*), TD (humedal con *T. domingensis*)

sedimento.

### Remoción de materia orgánica

Para la DBO, el humedal TD presentó valores promedios de remoción de  $81 \pm 8\%$ , y  $64 \pm 17\%$  para CG (Fig. 2 C). Los resultados muestran concordancia con lo reportado en estudios similares realizados en Paraguay para *T. domingensis*, donde la reducción para la DBO fue  $76,97\%$  (Kemper y Mendoza 2009 en De Barros Barreto y Barrios 2011) y  $82,25\%$  (de Barros Barreto & Barrios, 2011). En otro estudio, Vera *et al.* (2011), determinaron que hubo mayor reducción de DBO en el humedal con *T. domingensis* en comparación al control, los valores obtenidos de eficiencia en el humedal con vegetación fueron de  $30\%$

( $18\%$  en control) en el primer periodo de estudio y  $31\%$  ( $16\%$  en el control) en el segundo periodo de la investigación.

Al igual que la DBO, la concentración de entrada de la DQO fue baja con valores promedios de  $26,4$ ;  $18,1$  y  $10,36 \text{ mgO}_2 \text{ l}^{-1}$  a la salida del tanque séptico, y los humedales TD y CG (Tabla 2). Los valores medios de remoción de  $61 \pm 12\%$ , y  $40 \pm 20\%$  para TD y CG, respectivamente (Fig. 2 D). En un trabajo en el que estudian la remoción de agua residual doméstica en un sistema con tanque séptico seguido de humedales con *T. domingensis* en diferentes sustratos (grava, brita y grava lavada), reportan valores de remoción entre  $56$  y  $57\%$  (Jovania *et al.*, 2013), rendimientos muy similares a lo obtenido en nuestro estudio.

En un humedal operado a una carga de 10,6 gDQO m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, Maine *et al.* (2009), determinaron la remoción de la DQO en 70 % para *T. domingensis* en humedales de flujo libre.

### **Remoción de microorganismos**

En cuanto a los parámetros microbiológicos, los porcentajes de remoción fueron elevados para cada grupo microbiano (Tabla 3). La reducción en términos de log<sub>10</sub> para CF fue de 1,43 (CG) y 1,56 (TD); estos valores son similares a lo indicado en EPA (1993), que menciona que los humedales construidos son capaces de una reducción de CF de uno a dos unidades logarítmicas. No obstante en muchos casos esto no es suficiente para el cumplimiento de los requerimientos reglamentarios. La reglamentación vigente en la República del Paraguay establece que la concentración máxima de coliformes fecales en los efluentes tratados no debe superar las 4000 NMP/100ml (MADES, 2002), en la Tabla 2 se observa que la carga promedio para CF superan el nivel máximo permitido. En consecuencia, las aguas residuales urbanas tratadas con humedales construidos sean con TD o CG, precisarían de un mecanismo de desinfección antes de liberación al ambiente.

Para CT, la reducción fue de 1,01 y 0,98 log<sub>10</sub> para CG y TD respectivamente, con un elevado porcentaje de remoción para ambos casos. Para *Cyperus sp.*, la reducción de CT en humedales de flujo subsuperficial horizontal suele variar entre 1,26 y 1,35 unidades logarítmicas en sistemas a escala piloto y TRH de 1,6 d; mientras que para *Typha sp.* con TRH de 5d se reportan valores de 2,5 unidades (Wu, Carvalho, Müller, Remony & Dong, 2016). Estos

valores son superiores a los obtenidos en nuestro estudio.

Los menores niveles de reducción se presentaron para RAM y ML (Tabla 3). CG y TD redujeron 0,36 unidades logarítmicas para RAM, mientras que para ML la reducción fue de 0,64 y 0,55 respectivamente. El efecto de humedales construidos en la reducción de microorganismos está demostrado, principalmente para el caso de los patógenos; no obstante el papel de las plantas aún no es muy claro y su ventaja no es una conclusión universalmente aceptada (Kadlec & Wallace, 2009)

### **CONCLUSIONES**

En el trabajo se comprueba la capacidad de construcción de humedales utilizando *T. domingensis* y *C. giganteus*, que estas resisten el traslado, se adaptan fácilmente fuera de su ambiente natural y crecen apropiadamente en presencia del agua residual urbana. Es importante mencionar también la facilidad para ubicar a estas especies en humedales naturales como el de la Cuenca del Lago Ypacaraí, Paraguay.

Los humedales plantados con ambas especies demostraron buena capacidad de remoción de nutrientes y materia orgánica presentes en el agua residual estudiada. Las eficiencias de remoción en *C. giganteus* fueron de 42%, 45%, 64% y 40% para N-NH<sub>4</sub>, P-total, DBO y DQO respectivamente. Mientras que para *T. domingensis* se obtuvieron valores de remoción de 65%, 58%, 81% y 61% para N-NH<sub>4</sub>, P-total, DBO y DQO.

La reducción de coliformes fecales fue 1,43 (*C. giganteus*) y 1,56 (*T. domingensis*) unidades logarítmicas, no obstante la disminución no permite cumplir con los parámetros de vertido establecidos en la re-

**Tabla 3.** Valores promedios de log10 de la concentración y eficiencia en la remoción de parámetros microbiológicos.

Parámetro microbiológico	TS (P1)	CG (P2)	TD (P3)
CF	5,23	3,8 (96%)	3,67 (97%)
CT	6,33	5,32 (90%)	5,35 (89%)
RAM	6,58	6,22 (64%)	6,21 (65%)
ML	2,2	1,52 (76%)	1,64 (72%)

Log10 UFC de la concentración, los valores entre paréntesis (%) representan la eficiencia en la remoción para cada parámetro; TS: tanque séptico; CG: *C. giganteus*; TD: *T. domingensis*; CF: coliformes fecales; CT, coliformes totales; RAM: recuento de aerobios mesófilos totales; ML corresponde a mohos y levaduras

glamentación nacional.

Los humedales de flujo subsuperficial horizontal son relativamente sencillos de construir y operar, por cual proponemos su utilización como sistema descentralizado para el tratamiento de efluentes urbanos y/o domésticos.

## REFERENCIAS

- Alarcon, M. T., Zurita, F., Lara-Borrero, J., & Vidal, G. (2018). *Humedales de tratamiento: alternativa de tratamiento de aguas residuales aplicable en América Latina* (Primera). Bogota: Pontificia Universidad Javeriana.
- APHA. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (20th ed.). Nueva York: Amer. Publ. Health Assoc.
- Arias, C., & Brix, H. (2003). Humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales. *Revista Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 13, 17–24.
- Caselles-Osorio, A., Vega, H., Camilo, J., Casierra-Martínez, H. A., & Euliser, J. (2017). Horizontal subsurface-flow constructed wetland removal efficiency using *Cyperus articulatus* L. *Ecological Engineering*, 99, 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.062>
- da Silva, T. L., Reis, A., Medeiros, R., Oliveira, A. C., & Gouveia, L. (2009). Oil production towards biofuel from autotrophic microalgae semicontinuous cultivations monitored by flow cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159(2), 568–578. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8443-5>
- de Barros Barreto, G., & Barrios, R. J. (2011). *Actualización del análisis sobre la eficiencia de los humedales artificiales, en meses de calor, para su utilización como sistema de tratamiento de aguas residuales*. Universidad Católica “Nuestra Señora de la Asunción.”
- Delgadillo, O., Camacho, A., Pérez, L., & Andrade, M. (2010). *Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales*. Cochabamba, Bolivia: Centro AGUA. Retrieved from [http://www.infoandina.org/sites/default/files/publication/files/depuracion\\_de\\_aguas\\_residuales\\_por\\_medio\\_de\\_humedales\\_artificiales.pdf%5Cnhttp://www](http://www.infoandina.org/sites/default/files/publication/files/depuracion_de_aguas_residuales_por_medio_de_humedales_artificiales.pdf%5Cnhttp://www)

- aguasresiduales.info/revista/libros/depuracion-de-aguas-residuales-por-medio-de-humedales-artificiales
- EPA. (1993). Guía para el diseño y construcción de un humedal construido con flujos subsuperficiales. Dallas, Texas: U.S. EPA- Región 6.
- García, J., Aguirre, P., Mujeriego, R., Huang, Y., Ortiz, L., & Bayona, J. M. (2004). Initial contaminant removal performance factors in horizontal flow reed beds used for treating urban wastewater. *Water Research*, 38(7), 1669–1678.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.011>
- García Serrano, J., & Corzo Hernandez, A. (2008). Depuración con Humedales Construidos. *Universidad Politecnica de Cataluña*, 1–96. Retrieved from [http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/2474/JGarcia\\_and\\_ACorzo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/2474/JGarcia_and_ACorzo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Hoffmann, H., Platzer, C., Winker, M., & Muench, E. (2011). *Revisión Técnica de Humedales Artificiales de flujo subsuperficial para el tratamiento de aguas grises y aguas domésticas*. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Revisión+Técnica+de+Humedales+Artificiales+de+flujo+subsuperficial+para+el+tratamiento+de+aguas+grises#0>
- Jovania, C., Colares, G., & Sandri, D. (2013). Eficiência do tratamento de esgoto com tanques sépticos seguidos leitos cultivados com diferentes meios de suporte Efficiency of sewage treatment with septic tanks followed by constructed wetlands with different support materials. *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 8(1), 172–185.  
<https://doi.org/10.4136/1980-993X>
- Kadlec, R., & Wallace, S. (2009). *Treatment wetlands (2°)*. Boca Ratón: CRC Press.
- MADES. Resolución por la cual se establece el padrón de calidad de las aguas en el territorio Nacional, Pub. L. No. Resolución N° 222, 6 (2002). Paraguay.
- Magri, M. E., Gorrezen, J., Francisco, Z., & Sezerino, P. H. (2016). Constructed wetlands for sludge dewatering with high solids loading rate and effluent recirculation: Characteristics of effluent produced and accumulated sludge. *Ecological Engineering*, 95, 316–323.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.085>
- Maine, M. A., Suñe, N., Hadad, H., Sánchez, G., & Bonetto, C. (2009). Influence of vegetation on the removal of heavy metals and nutrients in a constructed wetland. *Journal of Environmental Management*, 90, 355–363.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2007.10.004>
- Mereles, F. (2004). Los humedales del Paraguay: principales tipos de vegetación. In M. Fátima, D. Salas Dueñas, & A. Yanosky (Eds.), *Humedales del Paraguay* (pp. 67–68). Asunción, Paraguay: Comité Nacional de Humedales del Paraguay.
- Metcalf & Eddy. (1998). *Ingeniería sanitaria: tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales. Tercera edición, Vol.II, México*., 1485 p. (Tercera). México: McGRAW-HILL.
- Morales, G., López, D., Vera, I., & Vidal, G. (2013). Humedales construidos con plantas ornamentales para el

- tratamiento de materia orgánica y nutrientes contenidos en aguas servidas. *Theoria*, 22(1), 33–46.
- Pelissari, C., Ávila, C., Maria, C., García, J., Dultra, R., Armas, D., & Heleno, P. (2017). Science of the Total Environment Nitrogen transforming bacteria within a full-scale partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland treating urban wastewater. *Science of the Total Environment*, 574, 390–399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.207>
- Salas Dueñas, D. (2015). Análisis de la problemática del agua en Paraguay Analysis of the water problem in Paraguay. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 13(1), 97–103. [https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2015.013\(01\)97-103](https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2015.013(01)97-103)
- Sánchez Yáñez, J. M. (2011). *Biorremediación. Estrategia contra la contaminación ambiental*. México: Libros en red.
- Silvero, J., & Kunze, F. (2013). Informaciones sobre las actividades humanas que condicionan la calidad del agua del Río Paraguay, Lago Ypacarai y otros afluentes. Asunción, Paraguay: Secretaría del Ambiente.
- Travaini-lima, F., Andreia, M., Silva, M., & Sipaúba-tavares, L. H. (2015). Constructed Wetland for Treating Effluent from Subtropical Aquaculture Farm. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2322-9>
- Vera, A., Nuñez, M., Andrade, C., Cárdenas, C., & Morales Avendaño, E. (2011). Removal of nutrients and organic matter in a constructed wetland, in function of the development of the macrophyte *Typha domingensis* Pers. *Revista Técnica de La Facultad de Ingeniería Universidad Del Zulia*, 34(3), 246–254. Retrieved from [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0254-07702011000300007&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702011000300007&lng=en&tlng=en)
- Vohla, C., Kõiv, M., Bavor, H. J., Chazarenc, F., & Mander, Ü. (2011). Filter materials for phosphorus removal from wastewater in treatment wetlands-A review. *Ecological Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.08.003>
- Vymazal, J. (2010). Constructed Wetlands for Wastewater Treatment. *Water*, 2(3), 530–549. <https://doi.org/10.3390/w2030530>
- Wu, S., Carvalho, P. N., Müller, J. A., Remony, V. & Dong, R. (2016). A review on the removal of human pathogens and fecal indicators. *Science of the Total Environment*, 541, 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.047>
- Zhong, F., Wu, J., Dai, Y., Xiang, D., Cheng, S., & Ji, H. (2015). Performance evaluation of wastewater treatment using horizontal subsurface flow constructed wetlands optimized by micro-aeration and substrate selection. *Water Science & Technology*, 71(9), 1317–1324. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.090>



# Efecto antimutagénico del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* Link (Pata de buey) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática

Marín Insfrán, L.<sup>1\*</sup>; Gayozo, E.<sup>1</sup> & Zamorano-Ponce, E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología. Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental.

<sup>2</sup>Universidad del Bío-Bío. Facultad de Ciencias. Departamento de Ciencias Básicas. Laboratorio de Genética Toxicológica (GENETOX).

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

---

**Efecto antimutagénico del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* Link (Pata de buey) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática.** En Paraguay la cultura de la fitoterapia, para el tratamiento de numerosas afecciones, se encuentra muy arraigada a la población. *Bauhinia forficata* es consumida en decocciones e infusiones para tratar afecciones de piel, garganta, pecho y estómago principalmente. El objetivo de este trabajo fue evaluar las acciones mutagénicas y antimutagénicas del extracto etanólico de hojas de *B. forficata* empleando el test SMART en *Drosophila melanogaster*. Para ello, se realizó el extracto etanólico de hojas de *B. forficata* obteniéndose un rendimiento de 5,05% en extracto crudo. La evaluación antimutagénica se llevó a cabo en larvas trans-heterocigotas *mwh+/*flr*<sup>3</sup>* mediante cuatro procedimientos, (1) el tratamiento simple, que comprobó que el extracto etanólico de hojas de *B. forficata* a 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> no posee efecto genotóxico, en comparación con el Peróxido de Hidrógeno 0,96 M, que presentó dicho efecto, (2) tratamiento combinado (Peróxido de Hidrógeno al 0,96 M + extracto 52,01 mg.mL<sup>-1</sup>) evidenció reducción del 57,89% en el total de clones mutantes; (3) el post-tratamiento (Peróxido de Hidrógeno 0,96 M por una hora + extracto 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> por 48 horas) presentó una reducción del 57,89%; (4) el pretratamiento (extracto 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> por 72 horas + tratamiento con el Peróxido de Hidrógeno 0,96 M por 48 horas) demostró una disminución del 78,94% de clones mutantes inducidos. Dichos resultados fueron analizados mediante el test de Kastenbaum-Bowman  $\alpha=\beta=0,05$ , evidenciando resultados positivos para el potencial antimutagénico del extracto de *B. forficata* 52,01 mg.mL<sup>-1</sup>, demostrando también su acción protectora en la reducción del daño genético ocasionado por eventos mutagénicos inducidos.

**Palabras claves:** *Drosophila melanogaster*, SMART, *Bauhinia forficata*, antigenotoxicidad, mutaciones

**Antimutagenic effect of the ethanolic extract of *Bauhinia forficata* Link (Ox paw) in *Drosophila melanogaster* by the Mutation and Somatic Recombination Test.** In Paraguay, phytotherapy culture, for treatment of numerous affections, is deeply rooted in the population. *Bauhinia forficata* is consumed in decoctions and infusions to treat mainly skin, throat, chest and stomach affections. The objective of this investigation was to evaluate the mutagenic and antimutagenic action of ethanolic leaf extract of *B. forficata* using SMART test in *Drosophila melanogaster*. For this, the ethanolic extract of *B. forficata* leaves was obtained, with a yield of 5.05% in crude extract. The antimutagenic evaluation was carried out on trans-heterozygous larvae *mwh+/*flr*<sup>3</sup>* by four procedures, (1) the simple treatment, which proved that the ethanolic extract at 52.01 mg.mL<sup>-1</sup> doesn't possess genotoxic effect, compared to the Hydrogen Peroxide 0.96 M, which showed this effect, (2) combined treatment (Hydrogen Peroxide 0.96 M + extract 52.01 mg.mL<sup>-1</sup>) showed a reduction of 57, 89 % in the total of mutant clones; (3) post-treatment (Hydrogen Peroxide 0.96 M for one hour + extract 52.01 mg.mL<sup>-1</sup> for 48 hours) showed a reduction of 57.89 %; (4) pretreatment (extract 52.01 mg.mL<sup>-1</sup> for 72 hours + Hydrogen Peroxide 0.96 M for 48 hours) showed a decrease of 78.94 % in induced mutant clones. These results were analyzed by the Kastenbaum-Bowman test

*Steviana*, Vol. 11(1), 2019 pp. 15 – 25.

Original recibido el 30 de julio de 2019.

Aceptado el 09 de setiembre de 2019

$\alpha = \beta = 0.05$ , showing positive results for antimutagenic potential of *B. forficata* extract 52.01 mg.mL<sup>-1</sup>, also demonstrating its protective action in reducing genetic damage caused by induced mutagenic events.

**Keywords:** *Drosophila melanogaster*, SMART, *Bauhinia forficata*, antigenotoxicity, mutations

---

## INTRODUCCIÓN

En Paraguay existe una cultura arraigada en la utilización de plantas medicinales procedentes de los guaraníes, conocedores de las propiedades beneficiosas de plantas nativas y que emplearon acertadamente en la prevención y tratamiento de enfermedades que afectan al hombre (Melgarejo, 2014).

La *B. forficata*, conocida popularmente como “pata de buey” es empleada en decocción o con el tereré para el tratamiento de afecciones de piel, garganta, pecho, estómago, hígado y riñón; se conoce sus efectos como hipoglucemiante, antiinflamatorio, hipocolesterolemiante y diurético (Menezes *et al.*, 2007; de Sousa Lino *et al.*, 2004; Volpato *et al.*, 2008; Pin *et al.*, 2009).

La elevada concentración de flavonoides y compuestos fenólicos (Oliveira *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2006; Sartorelli & Correa 2007; Menezes *et al.*, 2007; Düsman *et al.*, 2013) permiten a esta planta poseer un potencial efecto antioxidante y consecuentemente preventivo a procesos mutagénicos inducidos por especies oxígeno-reactivas y que pueden conllevar a cambios genéticos conducente a procesos de transformación celular y subsecuentemente cáncer.

El extracto acuoso de *B. forficata* puede inactivar química o enzimáticamente e inhibir la formación de mutaciones en el ADN, también puede inhibir la activación metabólica de agentes promutágenos o pueden recoger moléculas reactivas, ya que pueden actuar directamente sobre los re-

ceptores de los mismos (Kada *et al.*, 1978; Kojima *et al.*, 1992; Kuroda *et al.*, 1992).

La actividad antioxidante que presenta el extracto acuoso de *B. forficata* se debe especialmente a la presencia de polifenoles y flavonoides, los cuales fueron encontrados en el trabajo de Salgueiro *et al.* (2016), mediante la reducción de la peroxidación lipídica y los niveles de tioles totales (SH) no proteicos en eritrocitos humanos.

Los polifenoles, especialmente los flavonoides, al poseer una estructura ideal para la eliminación de radicales libres y para la interacción con los grupos activos mutágenos o para la protección de los sitios de ADN podrían ser afectados por el mutágeno (Droge, 2002; Ratnam *et al.*, 2006; Toloza & Fernández, 2015).

Se ha demostrado que el efecto causado por la generación de los radicales hidroxilos y por otras especies reactivas de oxígeno sobre la estructura del ADN es nocivo, ya que promueve la ruptura entre los fosfatos de la doble cadena debido a la inestabilidad de la misma, ocasionando mayores daños a nivel de cromatina, generando transcripciones erróneas de información genética y subsecuentes alteraciones a la estructura general de las células y los tejidos (Conde, 2004).

El Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es un agente genotóxico, que es capaz de producir modificaciones de las características particulares del ADN, capaz de dar lugar a múltiples reacciones, llegando a producir un daño celular al encontrarse en elevadas cantidades, ocurre sobre diferentes macromoléculas, tal es el caso de

lípidos, proteínas y ADN, conociéndose a este daño como estrés oxidativo. En el ADN, el estrés oxidativo puede dar lugar a fenómenos como mutaciones y carcinogénesis. Los linfocitos humanos periféricos representan una población celular donde el ADN está predominantemente en la etapa presintética del ciclo celular, fase G0 (Camacho *et al.*, 2010).

Con los antecedentes expuestos y atendiendo a la riqueza de flavonoides en la planta, en esta investigación se propone como objetivo general evaluar el efecto antimutagénico de *B. forficata* utilizando el Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en *D. melanogaster* y debido a que la planta es utilizada como terapia alternativa para la prevención de patologías asociadas a estrés oxidativo celular, esta técnica permitirá la detección de la actividad antioxidante in vivo (antimutagénica) y la seguridad para su uso.

## MATERIALES & MÉTODOS

### Material vegetal estudiado

Las muestras vegetales fueron colectadas del vivero de plantas medicinales (coordenadas: -25.253529, -57.567852), del Jardín Botánico y Zoológico de Asunción (JBZA). Paraguay. Ciudad de Asunción. JBZA. Arbol, con frutos secos. Las muestras fueron depositadas en el Herbario del Laboratorio de Recursos Vegetales de la FACEN (Marín, L. 01) para la identificación botánica por especialistas con claves taxonómicas y base de datos de Fortunato (1986).

### Preparación del extracto etanólico de hojas de *B. forficata* Link

Las hojas fueron secadas a temperatura ambiente de entre 19-21° C. Estas fueron trituradas con ayuda de un molino manual

de granos hasta que quedaron pulverizadas. De esta se pesó 500 gramos y se disolvió en 2 litros de etanol destilado al 70% durante 30 días (cada 48 horas se procedió al agitación) a temperatura ambiente, posteriormente, el macerado se filtró con ayuda de un equipo filtrador. La concentración del extracto etanólico se hizo mediante un evaporador rotativo QUIMIS® a 80° C, luego de esto se procedió al calentamiento con ayuda de baño maría para eliminar totalmente el solvente de la muestra, obteniéndose el extracto crudo. El rendimiento fue de 5,05% y fue conservada a 4° C hasta su utilización. Para la preparación del extracto etanólico se utilizó Tween 80 0,1%.

### Test de Mutación Somática y Recombinación (SMART) para determinar el efecto antimutagénico del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* frente al Peróxido de Hidrógeno

Previa a la determinación de la actividad antimutagénica de la planta se procedió al análisis de su posible efecto mutagénico y debido a que no se encontró efecto mutagénico en diferentes concentraciones (10,01 mg.mL<sup>-1</sup>, 25,50 mg.mL<sup>-1</sup>, 52,01 mg.mL<sup>-1</sup>, 75,41 mg.mL<sup>-1</sup> y 101,76 mg.mL<sup>-1</sup>) y en la concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> se encontraron menor cantidad de pelos mutados y por tal motivo, se decidió a elegir esa concentración como la ideal para determinar la antimutagenicidad de la planta.

Para esta parte se obtuvieron hembras vírgenes de *Drosophila melanogaster* (cepa *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>sep</sup> I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> y Bd<sup>S</sup>*) en condiciones normales de temperatura ambiente (22°-24° C). Las hembras obtenidas se cruzaron con machos de *Drosophila melanogaster* (cepa *mwh/mwh*), todas las cruces fueron

depositadas en un medio ovopositor (Graf *et al.*, 1984). Se procedió a la extracción de 600 larvas de tercer estadio (tercer instar), de las cuales 500 fueron expuestas a diferentes tratamientos crónicos (A, B, C, D, E), 100 fueron tratadas por una hora con el agente mutágeno (F), pasada esa hora se procedió a lavarlas con agua destilada a modo de deshacer restos del mutágeno y fueron transferidas a otro medio que contenía el extracto etanólico. También se extrajeron 100 larvas de segundo estadio (segundo instar) para ser sometidas por 72 horas con el extracto etanólico (G), después de ese tiempo se lavaron las larvas con agua destilada, para de esa manera eliminar los restos del extracto y fueron trasladadas a otro medio, para ser sometidas por 48 horas con el agente mutágeno. Todos los medios fueron preparados con 1,5 g de puré de papa instantáneo Knorr®, rehidratados con las diferentes sustancias testadas.

Se procedió también al análisis de toxicidad del Tween 80 0,1 % (C) debido a que este compuesto se empleó para la preparación de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de la planta.

Como control positivo se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 0,96 M resultante de la prueba de determinación de dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), esto debido a que dicho compuesto genera con facilidad radicales libres.

Como control negativo se utilizó agua destilada (Tabla 1.)

### **Procedimientos para el análisis de las láminas**

Una vez eclosionadas las moscas adultas, se procedió sacrificarlos por sobredosis con Éter Etilico, y se seleccionaron al azar 10 individuos transhetero-

cigotas *mwh+/+flr<sup>3</sup>* de cada tratamiento (5 individuos de cada sexo), de las cuales se extrajeron las alas con ayuda de una Lupa estereoscópica Carl Zeiss® y se montaron en una lámina con Solución de Faüre (Goma arábica 300 gramos, Glicerol 20 mL, Hidrato de Cloral 50 gramos, y Agua destilada 50 mL). La observación de las láminas con las alas correspondientes se realizó con ayuda del microscopio óptico Olympus® a un aumento de 400X, los sectores o regiones de las alas analizadas fueron las regiones A, B, C', C, D', D y E según lo descrito por Rodrigues de Andrade *et al.* (2004).

Se cuantificó el índice de aparición de las manchas mutantes, se clasificó los clones mutantes según los criterios descritos por Rodrigues de Andrade *et al.* (2004).

Se determinó el porcentaje de inhibición ejercida por el extracto etanólico de *B. forficata* a la acción del agente mutágeno, empleando la siguiente ecuación:

$$\left\{ \frac{\text{TM con el AM} - (\text{TM con el extracto} + \text{AM})}{\text{TM con el AM}} \right\} * 100$$

Dónde:

**TM:** Total de mutaciones

**AM:** Agente mutágeno

### **Análisis estadístico de datos**

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante tablas propuestas por Frei y Würigler (1988) que corresponde a un modelo estadístico Binomial Condicional (Test de Kastenbaum-Bowman) (Kastenbaum & Bowman, 1970)  $\alpha = \beta = 0,05$ . Los gráficos estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 6.00, La Jolla California USA.

**Tabla 1.** Diseño metodológico de los tratamientos

Unidad Experimental	Número de larvas	Tratamientos	Pretratamiento	Postratamiento
<b>Tratamiento simple</b>	100	5 mL de Agua destilada ( <b>A</b> )		
	100	5 mL de extracto etanólico (52,01 mg.mL <sup>-1</sup> ) ( <b>B</b> )	—	—
	100	5 mL de Tween 80 al 0.1% ( <b>C</b> )		
	100	5 mL Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) ( <b>D</b> )		
<b>Tratamiento combinado</b>	100	5 mL Extracto etanólico (52,01 mg.mL <sup>-1</sup> ) junto con el Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) ( <b>E</b> )	—	—
<b>Pretratamiento con el agente mutágeno y post tratamiento con el extracto</b>	100		5 mL de Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) tratado por una hora	5 mL de Extracto etanólico (52,01 mg.mL <sup>-1</sup> ) por 48 horas ( <b>F</b> )
<b>Pre tratamiento con el extracto y postratamiento con el mutágeno</b>	100 (2do. Estadio)		5 mL de Extracto etanólico (52,01 mg.mL <sup>-1</sup> ) por 72 horas	5 mL de Peróxido de Hidrógeno (0,96 M) tratado por 48 horas ( <b>G</b> )

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados hallados en el tratamiento simple con el extracto etanólico de *B. forficata* (52,01 mg.mL<sup>-1</sup>) (**B**), evidenciaron 6 clones para manchas simples y pequeñas, con una frecuencia de 0,3, ningún clon para manchas simples grandes al igual que para manchas gemelas; a su vez, en el tratamiento con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,96 M (**D**) se contaron 19 clones para manchas simples y pequeñas, con una frecuencia de 0,95 ningún clon para manchas simples y grandes, al igual que para manchas gemelas; en cuanto al tratamiento con Agua des-

tilada (**A**) se contaron 7 clones para manchas simples y pequeñas, 2 clones para manchas simples y grandes; y ningún clon para manchas gemelas, con frecuencias de 0,35, 0,1, respectivamente; el tratamiento con Tween 80 a 0,1% (**C**) se contabilizaron 9 clones para manchas simples y pequeñas, ningún clon para manchas simples y grandes, al igual que los clones gemelos, con frecuencias de 0,45 para las primeras - Tabla 2, Fig. 1.

Este tratamiento demuestra que el extracto etanólico a la concentración evaluada (52,01 mg.mL<sup>-1</sup>) resultó negativo para su acción genotóxica ( $P=0,0308$ ); en

**Tabla 2.** Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto etanólico de *B. forficata*. Cruce estándar.

Tra- ta- mien- -tos	Número de alas	MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 2	a	MSG (>2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 5	a	MG <i>m</i> = 5	a	TM <i>m</i> = 2	a	Inhibi- ción (%)
<b>A</b>	20	0,35 (07)		0,10 (02)		0,00 (00)		0,45 (09)		-
<b>B</b>	20	0,30 (06)	<b>i</b>	0,00 (00)	<b>i</b>	0,00 (00)	<b>i</b>	0,30 (06)	-	-
<b>C</b>	20	0,45 (09)	<b>i</b>	0,00 (00)	<b>i</b>	0,00 (00)	<b>i</b>	0,45 (09)	<b>i</b>	-
<b>D</b>	20	0,95 (19)	<b>+</b>	0,00 (00)	<b>i</b>	0,00 (00)	<b>i</b>	0,95 (19)	<b>+</b>	-
<b>E</b>	20	0,40 (08)	<b>i</b>	0,00 (00)	<b>i</b>	0,00 (00)	<b>i</b>	0,40 (08)	<b>i</b>	<b>57,89</b>
<b>F</b>	20	0,40 (08)	<b>i</b>	0,00 (00)	<b>i</b>	0,00 (00)	<b>i</b>	0,40 (08)	<b>i</b>	<b>57,89</b>
<b>G</b>	20	0,15 (03)	-	0,05 (01)	<b>i</b>	0,00 (00)	<b>i</b>	0,20 (04)	-	<b>78,94</b>

**a** (Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler, 1988): + (positivo); - (negativo); i (inconclusivo). **m** (factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = \beta = 0,05$ )

<sup>b</sup> Incluso las manchas simples *flr*<sup>3</sup> raras.

**A:** Agua destilada, **B:** Extracto etanólico a 52,01 mg.mL<sup>-1</sup>, **C:** Tween 80 0,1%, **D:** Peróxido de Hidrógeno a 0,96M, **E:** Extracto etanólico a 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> + Peróxido de Hidrógeno a 0,96M, **F:** Postratamiento con el extracto etanólico a 52,01 mg.mL<sup>-1</sup>, **G:** Pretratamiento con el extracto etanólico a 52,01 mg.mL<sup>-1</sup>.

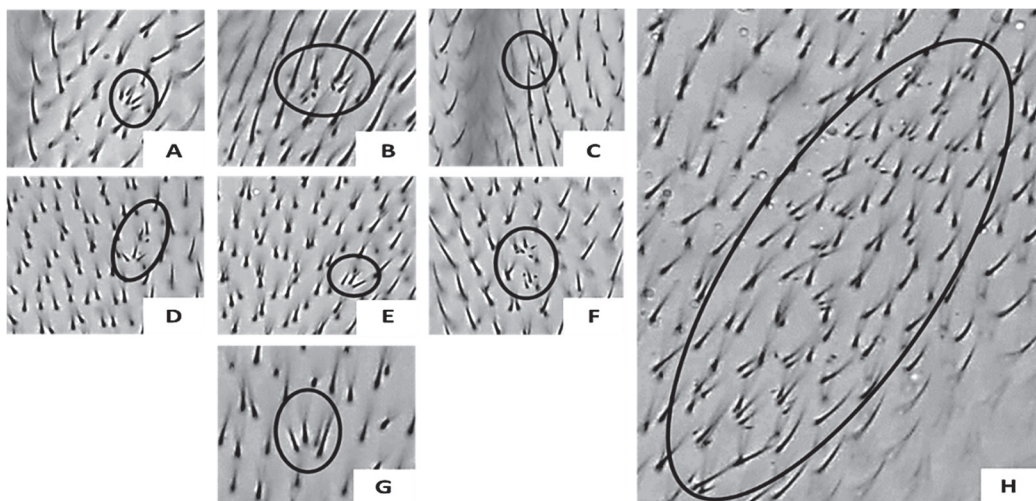
comparación con las registradas con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,96 M que si presentaron acciones mutagénicas ( $P = 0,6228$ ) (Tabla 2).

Pereira *et al.* (2014) demostraron que el extracto hidroalcohólico de las hojas no presentaba actividad mutagénica, mediante el test de micronúcleos en ratones albinos (Swiss) usando concentraciones de 1000, 1500 y 2000 mg.kg<sup>-1</sup>. Camparoto *et al.* (2002) empleando células de la médula ósea de rata Wistar (*Rattus norvegicus*), tampoco encontraron actividad citotóxica para el extracto acuoso de *B. forficata* en una concentración de 4,65 g.L<sup>-1</sup>. Pepato *et al.* (2004), recurriendo a ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina y post tratadas con el extracto acuoso de hojas de *B. forficata* a una concentración de 150 g.L<sup>-1</sup>,

han demostrado que el extracto acuoso disminuye la actividad diabética, sin causar daño tisular.

En el tratamiento combinado del extracto a 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> junto con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,96 M (**E**), se contaron 8 clones para manchas simples y pequeñas, con una frecuencia de 0,8, ningún clon para manchas simples y grandes, al igual que para manchas gemelas (Tabla 2, Fig. 1).

El tratamiento combinado muestra resultados inconclusos, a pesar de tener menos cantidad de clones, en este caso 8 clones, con frecuencia de 0,40 comparado con los 19 clones, con frecuencia de 0,95 del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,96 M, registrándose una reducción de 57,89% de inhibición mutagénica (Tabla 2)



**Figura 1.** Clones encontrados en alas de *D. melanogaster* tratadas para la determinación del potencial antimutagénico del extracto etanólico de *B. forficata* frente al Peróxido de Hidrógeno. **Tratamiento simple:** Mancha Simple y Pequeña (MSP) del tipo *mwh* (A y B). **Tratamiento combinado:** Mancha Simple y Pequeñas (MSP) del tipo *mwh* (C y D). **Post tratamiento:** Mancha Simple y Pequeñas (MSP) del tipo *mwh* (E y F). **Pretratamiento:** Mancha Simple y Pequeñas (MSP) del tipo *mwh* (G) y Mancha Simple y Grande (MSG) del tipo *mwh* (H). Aumento (400X). Microscopio Óptico Compuesto Motic®.

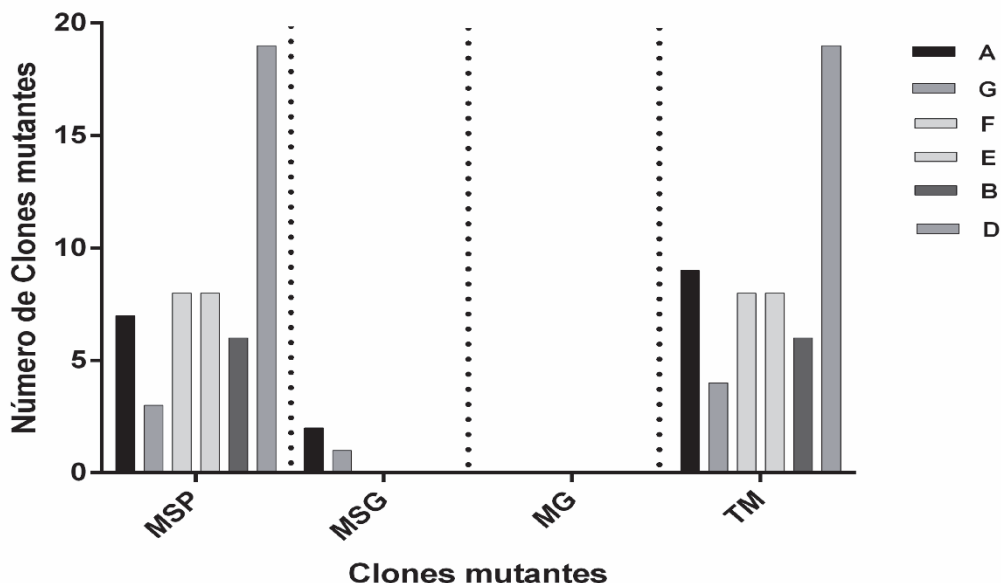
La disminución en la cantidad de clones mutantes comparadas con las observadas en el tratamiento con el agente mutágeno, podría deberse, según Graf *et al.* (1984) y Jiménez (2013), a que la sustancia evaluada tiene un efecto general sobre la actividad de la genotoxina. A su vez, Ribeiro *et al.* (2013) demostraron también actividad antimutagénica del extracto etanólico de *B. holophylla* a concentración de  $7,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en células del carcinoma hepatocelular (HepG2) registrándose una disminución del 76% en la frecuencia de micronúcleos inducidos por Benzopireno y Düsman *et al.* (2013) utilizando ratas Wistar y un extracto acuoso de hojas frescas de *B. forficata*, a la concentración de  $4,65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , encontraron una reducción del 91,4% en las alteracio-

nes cromosómicas inducidas por la Ciclofosfamida.

En el pretratamiento del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $0,96 \text{ M}$  con el extracto etanólico (F) se contaron 8 clones para manchas simples y pequeñas, con una frecuencia de 0,4, ningún clon para manchas simples y grandes, al igual que para manchas gemelas (Tabla 2, Fig. 1).

El pretratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $0,96 \text{ M}$  muestra resultado inconcluso, pero contiene menos cantidad de clones, en este caso 8 clones con frecuencia de 0,40 comparado con 19 clones con frecuencia de 0,95 del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $0,96 \text{ M}$  del tratamiento con el agente mutágeno, evidenciándose una reducción de 57,89% en la acción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Tabla 2).

La disminución en la cantidad de clones



**Figura 2:** Número de Clones mutantes observados en los ensayos por tratamiento. (A): Agua destilada. (B): Extracto etanólico de *B. forficata* 52,01 mg.mL<sup>-1</sup>. (D): Peróxido de Hidrógeno 0,96 M (E): Peróxido de Hidrógeno 0,96 M junto con el extracto etanólico de *Bauhinia forficata* (52,01 mg.mL<sup>-1</sup>). (F): Peróxido de Hidrógeno 0,96 M (1 hora) post tratado con el extracto etanólico de *B. forficata* 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> (48 horas). (G)= Extracto etanólico de *B. forficata* 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> (72 horas) post tratado con el Peróxido de hidrógeno 0,96 M (48 horas).

con el pretratamiento podría deberse según Graf *et al.* (1984) y Jiménez (2013), a que la sustancia probada detiene las lesiones fijadas o inducidas por la genotoxina, lo cual también fue registrado por Düsman *et al.* (2013) mediante la utilización de un post-tratamiento con extracto acuoso de hojas frescas de *B. forficata*, a una concentración de 4,65 g.L<sup>-1</sup> en ratas Wistar, quienes evidenciaron una reducción del 94,6% en las alteraciones cromosómicas inducidas por la Ciclofosfamida.

El pretratamiento con el extracto etanólico de *B. forficata* 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> (72 horas) junto con un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,96 M (48 horas) (G) se contaron 3 clones para manchas simples y pequeñas, con frecuencia igual a 0,15, 1 clon para mancha simple y grande, con frecuencia de

0,05, ningún clon para manchas gemelas, en total se contaron 4 manchas, con frecuencias igual a 0,20 (Tabla 2, Fig. 1).

El pretratamiento con el extracto etanólico de *B. forficata* a 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> demuestra que hay una disminución en la cantidad de clones mutados, 4 clones con frecuencia de 0,20, siendo negativo para su acción genotóxica ( $P=0,0088$ ) comparado con los 19 clones con frecuencia de 0,95 que sí evidenció actividad mutagénica ( $P=0,6228$ ) en el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,96 M, evidenciando una reducción de 78,94% en la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabla 2)

Con este resultado queda demostrado que el extracto etanólico de *B. forficata* podría ser un buen agente protector, ya que fue capaz de prevenir la formación de clones mutados, según Graf *et al.* (1984) y



Jiménez (2013) el extracto podría actuar antes que las lesiones sean inducidas por la genotoxina, esto por su alto contenido de antioxidantes naturales, encontrados en los extractos ensayados por Salgueiro, *et al.* (2016) y Khalil *et al.* (2008). Düsman *et al.* (2013), empleando ratas Wistar, encontraron una reducción del 71,1% de mutaciones inducidas por Ciclofosfamida, utilizando extracto acuoso de hojas frescas de *B. forficata* a concentración 4,65 g.L<sup>-1</sup>.

Al realizar una comparación entre todos los tratamientos realizados, se observa que se obtiene un mejor resultado en el pretratamiento con el extracto (Tabla 2, Fig. 2).

Las disminuciones de las alteraciones, podría ser causada por sustancias antimutagénicas que impiden la formación de la mutación o induce a la reparación del ADN, la cual fue comprobada también por Kada *et al.* (1978) mediante el ensayo de mutagenicidad con la cepa de Salmonella TA98 de Ames, Kojima *et al.* (1992) usando células V79 de hámster chino y Kuroda *et al.* (1992) usando cultivos celulares de mamíferos.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que el extracto etanólico de *B. forficata* a la concentración de 52,01 mg.mL<sup>-1</sup> no presenta efecto mutagénico, sino que evidencian una acción antimutagénica, inhibiendo la acción genotóxica del Peróxido de Hidrógeno, con reducciones alentadoras de entre 57,89-78,94%.

Se recomienda seguir realizando estudios con metabolitos secundarios separados según la afinidad química de las mismas empleando otros ensayos como el test

cometa para estudiar la capacidad de reparación del ADN en *D. melanogaster*, el ensayo in vitro de micronúcleos, ensayo de mutación del receptor de células T para controlar la exposición genotóxica humana y el test genotoxicológico con marcadores moleculares (RAPD) para observar daños genéticos mediante cambios en perfiles electroforéticos.

## REFERENCIAS

- Camacho, G.; Morán, J.; Betancourt, N.; Monreal K. & Benítez, M. (2010). Evaluación por ensayo cometa de daño celular inducido con Peróxido de Hidrógeno a linfocitos de sangre periférica *In vitro*. Departamento de Biología Celular. Universidad Autónoma de Aguas Calientes, México.
- Camparoto, M. L.; Teixeira de Oliveira, R.; Mantovani, M. S. & Vicentini, V. E. P. (2002). Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genetics and Molecular Biology*, 25(1), 85-89.
- Conde Pérez-Prina, J.C. (2004). Daño al ADN en sangre periférica de ratones mutantes de catalasa.
- De Sousa Lino, C.; Diógenes, J. P. L.; Pereira, B. A.; Faria, R. A. P. G.; Neto, M. A.; Alves, R. S.; De Queiroz, M. G.; De Sousa, F. C. & Viana, G. S. B. (2004). Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(1), 125-127.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- Düsman, E., Almeida, I. V. D.; Coelho, A. C.; Balbi, T. J.; Düsman Tonin, L. T., &

- Vicentini, V. E. P. (2013). Antimutagenic effect of medicinal plants *Achillea millefolium* and *Bauhinia forficata* in vivo. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013.
- Frei, H.; Würgler, F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects 203(4): 297-308. doi:10.1016/0165-1161(88)90019-2.
- Fortunato, R. H. (1986). Revisión del género *Bauhinia* (Cercideae, Caesalpinioidea, Fabaceae) para la Argentina. Darwiniana, 527-557.
- Graf, U.; Würgler F. E.; Katz, A.J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C. B. & Kale, P. G. (1984). Somatic Mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environmental mutagenesis, 6(2), 153-188.
- Jiménez, M. R. 2013. Estudio antigenotóxico y de citotoxicidad de plantas medicinales de uso cotidiano y de sus fenoles más característicos (Doctoral dissertation, Universidad de Córdoba).
- Kada, T.; Morita, K., & Inoue, T. (1978). Anti-mutagenic action of vegetable factor (s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 53(3), 351-353.
- Kastenbaum, M.A.; Bowman, K.O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 9(5): 527-549. doi:10.1016/0027-5107(70)90038-2.
- Khalil, N. M.; Pepato, M. T. & Brunetti, I. L. (2008). Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. Biological research, 41(2), 165-171.
- Kojima, H.; Konishi, H. & Kuroda, Y. (1992). Combined mutagenicity of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate in Chinese hamster V79 cells. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 266(2), 171-180.
- Kuroda, Y.; Jain, A. K.; Tezuka, H. & Kada, T. (1992). Antimutagenicity in cultured mammalian cells. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 267(2), 201-209.
- Lim, H.; Lim, Y.; Cho, Y. H. & Lee, C. H. (2006). Induction of apoptosis in the HepHepG2 cells by HY53, a novel natural compound isolated from *Bauhinia forficata*. Journal of microbiology and biotechnology, 16(8), 1262-1268.
- Melgarejo, A. O. (2014). Contribución a la medicina natural: Pohã Ñana, un Manuscrito inédito en Guaraní (Paraguay, S. XVIII). *Corpus. Archivos virtuales de la alteridad americana*, 4(2). doi: 10.4000/corpusarchivos.1301.
- Menezes, F.D.S.; Minto, A.B.M.; Ruela, H.S.; Kuster, R.M.; Sheridan, H. & Frankish, N. (2007). Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. Rev. Bras. Farmacogn. 17: 8-13.
- Oliveira, C. Z.; Maiorano, V. A.; Marcussi, S.; Santana, C. D.; Januario, A. H.; Lourenco, M. V.; Sampaio Suely, V.; Fanca Suzelei, C.; Pereira, P. S. & Soares, A. M. (2005). Anticoagulant

- and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *J. Ethnopharmacol.* 98: 213-216
- Pepato, M. T.; Baviera, A. M.; Vendramini, R. C. & Brunetti, I. L. (2004). Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 4(1), 7.
- Pereira, A. C. S.; Ribeiro, G. E.; Souza, L. C. R.; Rufino, L. R. A.; Cabral, I. S. R.; Boriollo, M. F. G. & Fiorini, J. E. (2014). Biologic activity of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia forficata* Link on *Herpetomonas samuelpessoai* (Galvão.) Roitman. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(3), 585-592
- Pin, A.; González, G.; Marín, G.; Céspedes, G.; Cretton, S.; Christen Thnopharmacol, P. & Roguet, D. (2009). Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción. AGR Servicios Gráficos. Paraguay. p 229.
- Ratnam, D. V.; Ankola, D. D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D. K. & Kumar, M. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of controlled release*, 113(3), 189-207.
- Ribeiro, D. L.; Ciliao, H. L. & Specian, A. F. (2013). Protective effect and absence of apoptotic, cytotoxic and mutagenic effects of the extract of *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud in HePG2 cells. In *Proceedings of the 11th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM'13)* (p. 163).
- Rodrigues de Andrade, H.H.; Reguly, M.L. & Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test. In *Drosophila Cytogenetics Protocols*, Ed. D. S. Henderson, 389- 412. Humana Press. Totowa. New Jersey.
- Salgueiro, A. C. F.; Folmer, V.; Da Silva, M. P.; Mendez, A. S. L.; Zemolin, A. P. P.; Posser, T.; Franco, J.L. & Puntel, G. O. (2016). Effects of *Bauhinia forficata* tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice. *Oxidative medicine and*
- Sartorelli, P. & Correa. D.S. (2007). Constituents of essential oil from *Bauhinia forficata* Link. *J. Essent. Oil Res.* 19: 468-469.
- Tolozza-Zambrano, P.; Avello, M. & Fernández, P. (2015). Determinación de rutina y trigonelina en extractos de hojas de *Bauhinia forficata* subsp. Pruinosa y evaluación del efecto hipoglucemiante en humanos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1). pp.21-32.
- Version, G. P. (2014). 6.00 for Windows [computer program]. *Version. San Diego CA. GraphPadSoftware.*
- Volpato, G.T.; Damasceno, D.C.; Rudge, M.V.C.; Padonavi, C.R. & Calderon, I.M.P. (2008). Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 116:131-137.

# Preliminary evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioactive compounds in some species of basidiomycetes fungi from Paraguay

Campi, M.<sup>1\*</sup>; Mancuello, C.<sup>1</sup>; Ferreira, F.<sup>2</sup>; Maubet, Y.<sup>1</sup>; Cristaldo, E.<sup>1</sup>; Benítez, D.<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio Instrumental, área Química.

<sup>3</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Microbiología.

\*E-mail del autor: geraldine\_campi@hotmail.com

---

**Evaluación preliminar de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y compuestos bioactivos de algunas especies de hongos basidiomicetes de Paraguay.** Se realizó la identificación cualitativa de metabolitos secundarios y se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos y el potencial antioxidante de extractos etanólicos de ocho géneros de macrohongos *Amyloporus*, *Gloeophyllum*, *Hydnopolyporus*, *Inonotus*, *Laccaria*, *Lentinus*, *Pisolithus* y *Trametes* por primera vez para el Paraguay. Los análisis químicos cualitativos revelaron la presencia de varios metabolitos secundarios tales como compuestos fenólicos, esteroides y terpenos. La especie *Inonotus splitgerberi* presentó valores de  $64,81 \pm 2,70$  mg GAE.g<sup>-1</sup> de compuestos fenólicos totales comparables con la especie medicinal *Inonotus obliquus*. También se proporcionan datos noveles para la especie *Amyloporus guaraniticus*.

**Palabras claves:** hongos, metabolitos secundarios, micoquímica.

**Preliminary evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioactive compounds in some species of basidiomycetes from Paraguay.** The qualitative identification of secondary metabolites was carried out along with the quantification of the content of total phenolic compounds and the antioxidant potential of ethanolic extracts of eight genera of fungi *Amyloporus*, *Gloeophyllum*, *Hydnopolyporus*, *Inonotus*, *Laccaria*, *Lentinus*, *Pisolithus* and *Trametes* for the first time in Paraguay. Qualitative chemical analyses revealed the presence of several secondary metabolites, such as phenolic compounds, sterols and terpenes. The species *Inonotus splitgerberi* showed values of  $64.81 \pm 2.70$  mg GAE. g<sup>-1</sup> of total phenolic compounds comparable with the medicinal species *Inonotus obliquus*. Novel data for the species *Amyloporus guaraniticus* are also provided.

**Key words:** fungi, secondary metabolites, mycochemistry.

---

## INTRODUCTION

Secondary metabolites can be considered as natural products originating as response to the stress caused by the ecological niche, the adaptation of an organism to the environment, and are

produced by a variety of mushrooms (Arango, 2008; Zaidman *et al.*, 2005; De Silva *et al.*, 2013). These arise from intermediates of primary metabolism, but they can be classified according to their biosynthetic pathway into five main metabolic sources: (1) polysaccharides and pep-

*Steviana*, Vol. 11(1), 2019 pp. 26 – 41.

Original recibido el 11 de junio de 2019.

Aceptado el 25 de setiembre de 2019

tidopolysaccharides, (2) the mevalonic acid pathway from acetyl coenzyme A which functions in primary metabolism for the synthesis of sterols, (3) amino acid-derived pathways in the secondary metabolism, (4) the shikimic acid pathway for the biosynthesis of aromatic amino acids, (5) the acetate–malonate pathway from acetyl coenzyme A (Zaidman *et al.*, 2005). Fungi (as well as plants) accumulate a wide variety of secondary metabolites, including phenolic compounds, polyketides, terpenes and steroids (De Silva *et al.*, 2013; Stadler and Hoffmeister, 2015; Sandargo, 2019).

**Phenolic compounds** contain one or more aromatic rings and one or more hydroxyl groups. They include phenolic acids, flavonoids, hydroxybenzoic acids, lignins, tannins and oxidized polyphenols (Côté, Caillet & Doyon, 2010; D'Archivio, Filesi & Vari, 2010; Sánchez, 2017). **Terpenoids** are fairly common among mushroom metabolites, with sesquiterpenoids, diterpenoids and triterpenoids being the most commonly isolated metabolites from Basidiomycota. Among these, triterpenes are a predominant class of secondary metabolites, especially for the wood-inhabiting polypore species, where they are often present in large quantities in the basidiomata (Sandargo *et al.*, 2019). **Alkaloids** are a large family of more than 15,000 secondary metabolites; they are nitrogenous substances, basic, of natural origin and restricted distribution. Alkaloids have a complex structure and share three characteristics in common: they are soluble in water, contain at least one atom of nitrogen in the molecule, and exhibit biological activity (Ávalos & Pérez, 2009).

Oxidative stress can be defined as the state where there is an imbalance between prooxidants and antioxidants, this distur-

bance results in the increase of oxidative stress and molecular damage of proteins, lipids, carbohydrates and DNA, leading to diseases such as cancer, rheumatoid arthritis, and associated cellular degeneration (Dubost *et al.*, 2007; Lung & Huang, 2012). Antioxidant compounds have the important ability to eliminate free radicals and inhibit the oxidative mechanisms that lead to degenerative diseases; these are distributed in various products from living organisms such as grains, fruits, vegetables, teas, spices, herbs, and fungi (Dubost *et al.*, 2007; Klaus *et al.*, 2011). Numerous wild mushroom species were reported to have antioxidant activity and these properties have been studied extensively (Song and Yen 2002; De Silva *et al.*, 2013). For example, basidiomata of *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. and *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. show powerful antioxidant capacity related to low molecular weight compounds, in particular those from the phenolic fractions (Ferreira *et al.*, 2009; Heleno *et al.*, 2011; Mohsin *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2011; Akata *et al.*, 2012).

Mushrooms seem to be particularly talented in producing unique terpenoids, for example **pleuromutilin**, a tricyclic diterpenoid, is a naturally occurring antibiotic from the culture of the mushroom *Clitopilus passeckerianus* (Pilát) Singer (Kavanagh, 1947; Stadler and Hoffmeister, 2015; Sandargo *et al.*, 2019). Other examples are **strobilurins**, one of the most successful class of agrochemical fungicides; and **illudins** from *Lampteromyces* Singer and *Omphalotus* Fayod species (Omphalotaceae) which are sesquiterpenes featuring an unusual cyclopropane as source of potential anticancer drugs and agrochemical pesticides (Tanasova and Sturla, 2012).

In recent years, a number of alkaloids have been discovered in Basidiomycota; fungi produce natural alkaloids, the most studied groups are the indoles and isoxazoles, two simple indole alkaloids: psilocin (3- [2 (dimethylamino) ethyl] -4-indolol) and psilocybin ([3- (2-dimethylaminoethyl) - 1H-indol4-yl] dihydrogen phosphate) are present in many mushroom species (Wieczorek *et al.*, 2015; Sandargo, 2019). Other isolated alkaloids are the **Erinacerines** commonly isolated from both the cultures and fruiting bodies of *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. (Sandargo, 2019), and the **Rosellins A and B**, red diketopiperazine alkaloids, isolated from the fruiting bodies of the mushroom *Mycena rosella* (Fr.) P. Kumm. (Lohmann *et al.*, 2018), the **Phlebopines A–C** pyrrole alkaloids isolated from fruit bodies of *Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) (Sun *et al.*, 2018; Sandargo, 2019).

Research applied to the chemical profile and biological potential of the native species of macroscopic fungi is underdeveloped in Paraguay. Many novel biologically active compounds have been reported as a result of research on medicinal mushrooms (De Silva *et al.*, 2013, Staniszewska *et al.*, 2017). The search for secondary metabolites of natural products in Paraguay is limited to the Plantae Kingdom, thus restricting the discovery and application of new sources of secondary metabolites with possible biological activities of the Fungi Kingdom, which has been cataloged as the second most diverse group of organisms (2,2 to 3,8 million species) around the world (Hawksworth & Lücking, 2017), exceeding that of terrestrial plants by one order of magnitude (Blackwell, 2011; Dai, 2010), and with immense diversity of species in the different ecoregions of our

country. Two records of the mycochemical and biological profile of a species of the genus *Laetiporus* are reported in Paraguay, ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol) was isolated, crystallized and elucidated for the first time (Vila *et al.*, 2015; Campi, 2017). Herein the chemical profile of nine species of native mushrooms is studied, thus providing novel information for the area of chemistry of natural products with mycological profile in Paraguay.

## MATERIALS AND METHODS

**Collection and ethanol extraction:** Basidiomata were collected in the Departments of Alto Paraguay, Alto Paraná, Central and Cordillera. A sample of each species was deposited in the FACEN Herbarium. The samples were determined taxonomically in the *Laboratorio de Recursos Vegetales- Área de Micología* following the alignments of Robledo & Urcelay (2009) and Wright and Albertó (2002) (Table 1), 20 g of each dried mushroom powder underwent thorough maceration with ethanol 96% for a period of 48 hours, and then every 24 hours until third extractions were completed under periodic agitation. The solution was filtered by gravity and then concentrated with subsequent evaporation of the solvent in a rotary evaporator (Rotav, China). The crude extracts were coded (Table 1) and stored in glass containers at  $4 \pm 0.5$  °C until use (Tiwari *et al.*, 2011 with modifications).

**Qualitative assays of secondary metabolites and reducing sugars:** To identify secondary metabolites and reduce sugars of fungal extracts, solutions were prepared and subjected to multiple tests: Dragendorff, Wagner and Mayer for alkaloids;

**Campi, M. et al. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioactive compounds in fungi**

**Table 1.** Collection of information and codification of each studied species.

Species/Code	Origin	Collection number	Determination
<i>Amylosporus guaraniticus</i> Campi & Robledo /(AG001)	Central Department, San Lorenzo city, university campus	M. Campi 014	Campi, Robledo & Maubet
<i>Gloeophyllum striatum</i> (Fr.) Murrill /(GS002)	Alto Paraná Department, Bahía Negra city, Estación Biológica 3 Gigantes	M. Campi 149	Campi
<i>Hydnopolyporus fimbriatus</i> (Cooke) D.A. Reid / (HF003)	Central Department, San Lorenzo city, university campus	M. Campi 019	Campi
<i>Inonotus splitgerberi</i> (Mont.) Ryvarden (IS004)	Cordillera Department, Atyra city, Los Agüero country house	M. Campi 049	Campi & Robledo
<i>Inonotus rickii</i> (Pat.) D.A. Reid /(IR005)	Central Department, San Lorenzo city, university campus	M. Campi 270	Campi
<i>Lentinus lindquistii</i> (Singer) B.E. Lechner & Albertó)/(LL006)	Central Department, San Lorenzo city, university campus	M. Campi 274	Campi & Maubet
<i>Laccaria fraterna</i> (Sacc.) Pegler /(LF007)	Cordillera Department, Piribebuy city	C. Mancuello 001	Campi, Maubet & Niveiro
<i>Pisolithus arhizus</i> (Scop.) Rauschert /(PA008)	Central Department, San Lorenzo city, university campus	M. Campi 035	Campi & Maubet
<i>Trametes cubensis</i> (Mont.) Sacc. /(TC009)	Alto Paraná Department, Hernandarias city, Refugio Biológico Itabó	M. Campi 007	Campi & Robledo

Liebermann-Burchard and Salkowski for triterpenes and steroids and FeCl<sub>3</sub> for tannins; Rosenhein for coumarins; and Fehling for reducing sugar (Adebayo, Olok & Olukemi, 2012; Amador *et al.*, 2006; Koolen *et al.*, 2013; Llata, 1994). Each test was performed in triplicate and compared with a positive and negative control sample. The following was used as a criterion to evaluate the results, in relation

to the positive control: (+) = faint reaction/coloration, (++) = medium reaction/coloration, (+++) = intense reaction/coloration, (-) = absence.

**Total phenolic compounds:** The concentration of total phenolics was measured by the method described by Turkoglu *et al.* (2007) with modifications. From the crude extracts, methanolic solutions with a concentration of 1 mg.mL<sup>-1</sup> were prepared, 2

mL of ddH<sub>2</sub>O and 200 µL of the Folin Ciocalteu 2N (analytical grade, Merck) reagent were added to each 1 mL of solution; the mixtures were homogenized and left to stand for 5 minutes, 1.5 mL of 20% sodium carbonate were added, and then the mixtures were brought to a volume of 10 mL with distilled water. As a prepared blank, 1 mL of methanol was used with the same treatment. The samples were homogenized, and after 1 hour of resting in the dark the absorbance at 760 nm was read in the spectrophotometer. To construct the calibration curve, a gallic acid solution (Sigma-Aldrich®) with concentrations of 0-50 µg.mL<sup>-1</sup> was used, and 200 µL of each concentration was treated in the same way as the sample solutions. The equivalent concentrations of gallic acid of each sample extract were determined from the curve. The results were expressed as the mean of the triplicates of the absorbances in milligrams of gallic acid equivalent per grams of crude extract (mg.g<sup>-1</sup>) ± standard deviation (SD).

**Concentration and antioxidant activity:** The concentration and oxidant activity were determined with the DPPH radical absorbance method according to Barros *et al.* (2007) with modifications. Methanolic solutions of 1 mg.mL<sup>-1</sup> were prepared from the crude extracts, from which 100 µL were taken, 3.9 mL of methanolic solution of the DPPH• (Merck) radical (0.02 mg. mL<sup>-1</sup>) were added. As a negative control, 100 µL of methanol and 3.9 mL of methanol solution of the DPPH• radical was used. The samples were homogenized and incubated in the dark for 1 hour. The reduction of the reagent was evidenced by the change in coloration from dark violet to light yellow, which was measured with a UV-VIS spectrophotometer

(Thermo SCIENTIFIC Genesys 10S Model) at  $\lambda = 517$  nm. For the calibration curve, a methanolic solution of 1 mg.mL<sup>-1</sup> of ascorbic acid was used, from which dilutions of 10 to 100 µg.mL<sup>-1</sup> were prepared; 100 µL were taken from each dilution, which received the same treatment as the samples. From the results of the curve, the equivalent concentration of ascorbic acid was determined. The results were expressed as the mean of the analysis performed in triplicate in milligrams of Ascorbic Acid Equivalent per g of crude extract (mg.g<sup>-1</sup>) ± standard deviation (SD). To calculate the percentage of activity, the following formula was used: % activity = [(absorbance of DPPH - absorbance of the solution) / absorbance of DPPH] × 100.

## RESULTS AND DISCUSSION

Mushrooms have become an attractive food and medicinal source. Basidiomycotae produce a wide range of secondary metabolites ranging from structural components with antitumor activity and immunological active to antimicrobial, antifungal, antiviral, cytostatic, enzymes, growth regulators and flavorings (Rathee *et al.*, 2012; De Silva *et al.*, 2013; Stadler and Hoffmeister, 2015; Sandargo, 2019). The mycochemical properties of the basidiomycotae of Paraguay was evaluated.

### Qualitative essays

As shown in Table 2, the crude extracts of the basidiomata studied contain secondary metabolites such as alkaloids, steroids, coumarins. The presence of reducing sugars in ethanolic extracts was also examined.

**Alkaloids:** between the tested extracts LL006 (*Lentinus lindquistii*) showed a red



precipitate, which indicates the presence of alkaloids, as confirmed by Hashimoto *et al.* (1972), who described **Eritadenine** for *Lentinula edodes* (Berk.) Singer, an alkaloid with hypoglycemic properties. Another extract that showed a strong positive reaction was LF007 (*Laccaria fraterna*); Matsuda *et al.* (1996) described the alkaloid **Laccarin** for *Laccaria vinaceoavellanea* Hongo, and Spiteller and Schrey (2019) described the **E-Z-proxamidine**, two isomeric alkaloids with a highly unusual core structure for *Laccaria proxima* (Boud.) Pat.; **TC009** (*Trametes cubensis*) showed positive results for alkaloids, previous reports by Bian *et al.* (2017) for the species *Trametes trogii* Berk., reported the presence of **Trametramide** (a pyrimidic alkaloid), qualitative studies revealed the presence of alkaloids in *T. versicolor* (Leliebre-Lara *et al.*, 2015).

The presence of terpenoid compounds and sterols in the ethanolic extract of all the species studied was checked qualitatively; this coincides with the work of Yokoyama, Natori and Aoshima (1975), who indicated that triterpene carboxylic acids with a lanostane skeleton occur rather widely in Polyporaceae and related higher fungi. The crude extracts that showed the greatest change in coloration were: **IR005** (*Inonotus rickii*), previous studies reported sesquiterpenes as **inotonic acid A** and **B** in the species *I. rickii* and in the close species *I. obliquus*; the presence of **inotodiol**, **lanosterol**,  **$\beta$ -sitosterol**, **romadendrane sesquiterpenoids** named **inototins** (isolated from the culture) and nostane-type triterpenoids was also established for the genus *Inonotus* (Nomura *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2014; Isaka *et al.*, 2017). Another positive species was

**PA008**; Lobo *et al.* (1983, 1988), Baumert *et al.* (1997), Zamuner *et al.* (2005) and Márquez-Fernandez (2013) described several types of sterols for *Pisolithus tinctorius* (*Pisolithus arhizus*) among them **ergosterol**, **lanosterol** and derivatives, **agnosterol**, **piscolactone** and the **pisosterol**. Regarding **TC009**, the positive results coincide with those of Leliebre-Lara *et al.* (2015) who obtained positive results for the species *T. versicolor*; with respect to **AG001** the extract indicated the presence of terpenoid compounds and sterols, previous studies of the genus revealed the presence of terpenoid compounds (Juma *et al.*, 2016); with regard to **GS002**, positive results agree with the work by Cateni *et al.* (2015), who described two triterpene acids for *Gloeophyllum odoratum* (Wulfen) Imazeki, and 10 new ergosteroids, (gloeophyllins A-J) for *Gloeophyllum abietinum* (Bull.) P. Karst (Han *et al.*, 2015).

As for coumarins (Rosenhein and Balje test), all the extracts were positive; for the genus *Gloeophyllum*, Oosponol was reported as an isocoumarin for the culture (Rasser *et al.*, 2000). The reducing sugars were analyzed by the Fehling test, the extracts that gave positive with greater intensity were **IR005** and **PA008**, previous studies on *I. obliquus* (Lin *et al.*, 2012) reported the presence of reducing sugars in its ethanolic extracts.

### Quantitative studies

The crude extracts show a content of total phenolic compounds with variable ranges (Table 3). The content of total phenolic compounds (TPC) of *Amylosporus guaraniticus* (**AG001**) was  $9,30 \pm 0,82$  mg.g<sup>-1</sup> of gallic acid equivalents (GAE); these results are higher than those

**Table 2.** Mycochemical profile: (+) faint coloration (++) medium coloration (+++) intense coloration (-) = absent.

Test	AG001	GS002	HF003	IS004	IR005	LL006	LF007	PA008	TC009
<b>ALKALOIDS</b>									
<i>Dragendorff</i>	(+++)(+++)(+++)	(+)(+)(+)	(++)(++)(++)	(++)(++)(++)	(++)(++)(++)	(+++)(+++)(+++)	(+++)(+++)(+++)	(-)(-)(-)	(+++)(+++)(+++)
<i>Wagner</i>	(+++)(+++)(+++)	(+)(+)(+)	(+)(+)(+)	(+)(+)(+)	(+)(+)(+)	(+++)(+++)(+++)	(+++)(+++)(+++)	(-)(-)(-)	(++)(++)(++)
<i>Mayer</i>	(+)(+)(+)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)(+)(+)	(+++)(+++)(+++)	(+++)(+++)(+++)	(-)(-)(-)	(++)(++)(++)
<b>TRITERPENES</b>									
<b>AND</b>									
<b>STEROIDS</b>									
<i>Liebermann-Burchard</i>	(+++)(+++)(+++)	(+)(+)(+)	(+)(+)(+)	(+++)(+++)(+++)	(+++)(+++)(+++)	(++)(++)(++)	(+)(+)(+)	(+++)(+++)(+++)	(+++)(+++)(+++)
<i>Salkowski</i>	(+)(+)(+)	(+)(+)(+)	(++)(++)(++)	(++)(++)(++)	(++)(++)(++)	(++)(++)(++)	(++)(++)(++)	(+)(+)(+)	(++)(++)(++)
<b>COUMARINS</b>									
<i>Rosenhein</i>	(++)(++)(++)	(+)(+)(+)	(++)(++)(++)	(+++)(+++)(+++)	(++)(++)(++)	(+)(+)(+)	(++)(++)(++)	(+++)(+++)(+++)	(+)(+)(+)
<b>REDUCING</b>									
<b>SUGARS</b>									
<i>Felhing test</i>	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)(+)(+)	(+++)(+++)(+++)	(+++)(+++)(+++)	(-)(-)(-)	(+)(+)(+)	(+++)(+++)(+++)	(++)(++)(++)

## Campi, M. et al. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioactive compounds in fungi

found by Juma *et al.* (2016) for the *Amylosporus* genus, where they reported values corresponding to 2.47 to 3.90 mg.g<sup>-1</sup> GAE.g<sup>-1</sup> (TPC). These results constitute novel information because it is the first chemical study ever done since the description of this native species of Paraguay (Robledo & Campi, 2017).

The TPC values of *Gloeophyllum striatum* (**GS002**) were  $17.01 \pm 1.56$  mg GAE.g<sup>-1</sup>, similar to those found by Sulkowska-Ziaja *et al.* (2012) of  $19.88 \pm 2.00$  mg GAE.g<sup>-1</sup> (TPC) for the species *Gloeophyllum sepiarium* (Wulfen) P. Karst.

Regarding *Hydnopolyporus fimbriatus* (**HF003**), values of  $6.66 \pm 0.79$  mg GAE.g<sup>-1</sup> (TPC) were determined, for the TPCs the reported range is lower than those found by Graça *et al.* (2016) where they obtained a concentration of 25.85 mg GAE.g<sup>-1</sup> (TPC), it is worth mentioning that they analyzed extracts from the mycelial tissue and not from the basidiomata.

*Inonotus rickii* (**IR005**) presented values of  $3.70 \pm 0.48$  mg GAE.g<sup>-1</sup> (TPC), well below the results found by Zhang *et al.*, (2015) which cited values of 55.94 mg GAE.g<sup>-1</sup> (TPC) for *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát, considered a medicinal mushroom; *Inonotus splitgerberi* (**IS004**), on the other hand, showed values of  $64, 81 \pm 2.70$  mg GAE.g<sup>-1</sup> (TPC), comparable to the medicinal species.

Regarding *Lentinus lindquistii* (**LL006**), values of  $15.11 \pm 1.12$  mg GAE.g<sup>-1</sup>(TPC) were obtained, reports of species of the same genus cited by Reis *et al.*, (2011) for *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr. reported 17.3 mg GAE.g<sup>-1</sup> (TPC) similar to those obtained with **LL006**. These results provide important information to be classified as an edible fungus.

*Laccaria fraterna* (**LF007**) yielded results of  $6.76 \pm 0.30$  mg GAE.g<sup>-1</sup> (TPC); in terms of total phenolic compounds, the results obtained are greater than those reported by Heleno *et al.* (2010), who reported 2.85 mg.g<sup>-1</sup> GAE.g<sup>-1</sup> for *Laccaria amethystina* Cooke and 1.59 mg GAE.g<sup>-1</sup> for *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke., meanwhile Liu *et al.* (2012) reported results of 9.8 mg GAE.g<sup>-1</sup> (TPC) for *Laccaria amethystina*.

With respect to *Pisolithus arhizus* (**PA008**),  $64.45 \pm 3.88$  mg GAE.g<sup>-1</sup> (TPC) were obtained; Reis *et al.*(2011) reported concentrations of 298 mg GAE.g<sup>-1</sup> (TPC), much higher than those found in **PA008**, however to Khadhri, Aouadhi & Aschi-Smiti (2017) found values of  $16.0 \pm 0.3$  mg GAE.g<sup>-1</sup> for *Pisolithus albus*.

*Trametes cubensis* (**TC009**) presented total phenolic compound values of  $8.98 \pm 0.89$ mg.g<sup>-1</sup> GAE.g<sup>-1</sup> (TPC), these represent results similar to those found by Orhan & Üstün (2011) for *Trametes versicolor* (L.) Lloyd where they reported values of 9.58 mg.g<sup>-1</sup> GAE.g<sup>-1</sup>; however, Matijašević *et al.* (2016), found higher values for the same species: 25.8 mg.g<sup>-1</sup> GAE.g<sup>-1</sup> (TPC).

It is worth mentioning that the species with the highest GAE content is *Inonotus splitgerberi* (**IS004**), with values of  $64.81 \pm 2.70$  mg GAE.g<sup>-1</sup>, this could be due to the fact that the Hyme-nochataceae group which includes *Phe-llinus* and *Inonotus* species were shown to produce phenolic compounds such as **phelligridins** and **inonoblins** (Lee *et al.*, 2007; De Silva *et al.*, 2014).

### Mushrooms do not contain flavonoids

Although several authors confirm the presence of "total flavonoids" in fungal

**Table 3.** Values of total phenolic compounds, DPPH and percentage of antioxidant activity

Species	Phenolic compounds (mg GAE.g <sup>-1</sup> )	Antioxidant concentration (mg.g <sup>-1</sup> AAE)	% Activity
AG001	9.30 ± 0.82	7.64 ± 0.87	3.88
GS002	17.01 ± 1.56	10.00 ± 1.00	7.02
HF003	6.66 ± 0.79	4.95 ± 1.69	4.80
IS004	64.81 ± 2.70	94.12 ± 0.87	12.4
IR005	3.70 ± 0.48	7.27 ± 0.49	7.20
LL006	15.11 ± 1.12	9.51 ± 0.35	6.65
LF007	6.76 ± 0.30	5.37 ± 0.37	6.09
PA008	64.45 ± 3.88	36.66 ± 0.51	9.13
TC009	8.98 ± 0.89	5.94 ± 1.14	4.80

\***GAE:** Gallic Acid Equivalents. **AAE:** Ascorbic acid equivalent.

extracts, (until October 2015 a total of 136 scientific reports were published describing the presence of flavonoids for fungi (Gil-Ramírez *et al.*, 2016)) others sustain the absence of this metabolite within the Fungi Kingdom (Ruíz-Rodríguez *et al.*, 2009; Gil-Ramírez *et al.*, 2016).

Most of the authors used an unspecific colorimetric method developed to determine them in plants or plant products; the colorimetric method used is aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) as a selective reaction agent with certain flavonoids depending on the reaction medium used (Christ & Müller, 1960), this technique is nonspecific for fungi, since they contain chlorogenic acid, hydroxycinnamic acid, o-diphenols and molecules that include cate-

chol residues as pigments; all of these included ergosterol, and can give false positives in the AlCl<sub>3</sub> colorimetric assays (Gil-Ramírez *et al.*, 2016).

In addition to these possible false positives, no coding sequences for chalcone synthase or chalcone isomerase (key enzymes involved in the biosynthetic pathway of flavonoids) have been identified for fungi, this would imply the impossibility of transforming phenolic compounds to flavonoids due to the absence of the transformation catalysts (Gil-Ramírez *et al.*, 2016). However, several authors confirmed the presence of flavonoids such as: quercetin, luteolin, myricetin, naringenin, naringin, hesperetin, rutin, morin, kaempferol, chrysin and de-

## **Campi, M. et al. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioactive compounds in fungi**

rivatives, genistein, apigenin or catechin (Mattila *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Turkoglu *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2009; Palacios *et al.*, 2011; Gąsecka *et al.*, 2017). Notably, these studies rarely used state-of-the-art analytical chemistry including analytical and preparative HPLC, high resolution mass spectrometry and NMR spectroscopy (De Silva *et al.*, 2013).

The lack of coding sequences for enzymes involved in the flavonoid biosynthetic pathway in mushrooms is determinant to confirm the absence of production of flavonoids in the Fungi Kingdom, the use of nonspecific techniques developed in plants is the first error committed over time. Today we know that fungi are organisms with a metabolism independent from plants and therefore we must establish specific tests taking into account the metabolites produced by them.

With respect to the DPPH assay and the percentage of antioxidant activity (Table 2), the extracts **AG001**, **GS002**, **HF003**, **IR005**, **LL006**, **LF007** and **TC009** showed positive correlation between the concentrations of phenolic compounds and the antioxidant activity: low concentrations of these compounds (Table 1) indicated moderate to low antioxidant activity (Table 2), consistent with Olennikov (2011) and Keleş *et al.* (2011) who explain that these are the main antioxidant compounds of the secondary metabolism of fungi, mainly emphasizing phenolic compounds.

However, **PA008** extract showed moderate concentrations of total phenolic compounds (Table 1), without expressing efficient antioxidant capacity (Table 2) (9.13% and DPPH  $36.66 \pm 0.51 \text{ mg.g}^{-1}$ ), these results are reflected in the work of

Reis *et al.* (2011), where they reported high concentrations of total phenolic compounds but specify low antioxidant power, this could be understood as a contradiction to the assertions that total phenolic compounds are the main metabolites contributors in the antioxidant action of fungal extracts (Keleş *et al.*, 2011).

## **CONCLUSION**

Regarding the crude extracts analyzed, the species *Inonotus splitgerberi* **IS004**, *Inonotus rickii* **IR005** and *Pisolithus arhizus* **PA008** presented a good chemical profile when testing positive bioactive secondary metabolites such as phenolic compounds, reducing sugars and alkaloids, among others; as well as a high percentage of antioxidant activity. **IS004** showed a chemical profile similar to the *Inonotus obliquus* species considered medicinal, used as an antitumor and immunomodulatory agent. These preliminary results confirm the presence of metabolites with possible biological properties and mark the beginning of the chemical study within the Fungi Kingdom in Paraguay. Future studies of isolation and elucidation of metabolites through analytical and preparative HPLC, high resolution mass spectrometry, and NMR spectroscopy of those extracts that showed a good chemical profile are necessary.

## **REFERENCES**

Adebayo, E., Oloke, J. K., Ayandele, A. A., & Adegunlola, C. O. (2012). Phytochemical, antioxidant and antimicrobial assay of mushroom metabolite from *Pleurotus pulmonarius*–LAU 09 (JF736658). *Journal of Mi-*

- crobiology and Biotechnology Research (CAN)*. 2(2): 366-374.
- Akata, I., Ergönül, B., & Kalyoncu, F. (2012). Chemical compositions and antioxidant activities of 16 wild edible mushroom species grown in Anatolia. *Int J Pharmacol*, 8(2), 134-138.
- Amador, V., del Carmen, M., Morón Rodríguez, F., Morejón Rodríguez, Z., Martínez Guerra, M. J., & López Barreiro, M. (2006). Tamizaje fitoquímico, actividad antiinflamatoria y toxicidad aguda de extractos de hojas de *Annona squamosa* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11(1), 1-12.
- Arango, G. (2008). Alcaloides y compuestos nitrogenados. *Universidad de Antioquia, Medellín*. Págs, 3-16.
- Barros, L., Calhelha, R. C., Vaz, J. A., Ferreira, I. C., Baptista, P., & Estevinho, L. M. (2007). Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology*, 225(2), 151-156
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C., Baptista, P., & Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1076-1079.
- Baumert, A., Schumann, B., Porzel, A., Schmidt, J., & Strack, D. (1997). Triterpenoids from *Pisolithus tinctorius* isolates and ectomycorrhizas. *Phytochemistry*, 45(3), 499-504.
- Bian, X., Bai, J., Sun, K., Huang, S., Wang, K., Tang, S., & Pei, Y. (2016). Trametramide A, a new pyridone alkaloid from the fungus *Trametes trogii* TGC-P-3. *Magnetic resonance in chemistry: MRC*, 54(9), 773.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *American journal of botany*, 98(3), 426-438.
- Campi, M., Maubet, Y., Grassi, E., & Robledo, G. L. (2017). *Amylosporus guaraniticus* sp nov (Wrightoporiaceae, Russulales) a new neotropical species from Paraguay. *Mycosphere*, 8(6), 1060-1069.
- Cateni, F., Lucchini, V., Zacchigna, M., Procida, G., Doljak, B., & Anderluh, M. (2015). New triterpenes from the fungus *Gloeophyllum odoratum*. *Chemistry of natural compounds*, 51(1), 74-80.
- Chen, H. P., Dong, W. B., Feng, T., Yin, X., Li, Z. H., Dong, Z. J., & Liu, J. K. (2014). Four new sesquiterpenoids from fruiting bodies of the fungus *Inonotus rickii*. *Journal of Asian natural products research*, 16(6), 581-586.
- Christ, B., & Müller, K. H. (1960). Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. *Archiv der Pharmazie*, 293(12), 1033-1042.
- Côté, J., Caillet, S., Doyon, G., Sylvain, J. F., & Lacroix, M. (2010). Bioactive compounds in cranberries and their biological properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(7), 666-679
- Dai, Y. C. (2010). Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China. *Fungal Diversity*, 45(1), 131-343.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4), 1321-1342.

**Campi, M. et al. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioactive compounds in fungi**

- De Silva, D. D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Alias, S. A., & Hyde, K. D. (2013). Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity*, 62(1), 1-40.
- Dubost, N. J., Ou, B., & Beelman, R. B. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105(2), 727-735.
- Gaśceka, M., Siwulski, M., & Mleczek, M. (2017). Evaluation of bioactive compounds content and antioxidant properties of soil-growing and wood-growing edible mushrooms. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13386.
- Gil-Ramírez, A., Pavo-Caballero, C., Baeza, E., Baenas, N., Garcia-Viguera, C., Marín, F. R., & Soler-Rivas, C. (2016). Mushrooms do not contain flavonoids. *Journal of functional foods*, 25, 1-13.
- Graça, A., Brugnari, T., Neiverth de Freitas, E., Marques Nolli, M., Peralta, R.M., Giatti, C. 2016. Evaluation of the antioxidant capacity by the method of phenolic compounds, TEAC and FRAP of extracts from mycelia produced by submerged fermentation. Anais do 6<sup>a</sup> Congresso de Ciências Farmacéuticas do Mercosul. <http://eventos.unioeste.unioeste.br/images/cosimp/anais/pages/artigos/13326.pdf>.
- Han, J. J., Bao, L., Tao, Q. Q., Yao, Y. J., Liu, X. Z., Yin, W. B., & Liu, H. W. (2015). Gloeophyllins A–J, cytotoxic ergosteroids with various skeletons from a Chinese Tibet fungus *Gloeophyllum abietinum*. *Organic letters*, 17(10), 2538-2541.
- Hashimoto, M., Saito, Y., Seki, H., & Kamiya, T. (1972). Hypocholesterolemic Alkaloids of *Lentinus edodes* (BERK.) SING. IV. Synthesis of Three Stereoisomers of Eritadenine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 20(7), 1374-1379.
- Hawksworth, D. L., & Luecking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology spectrum*, 5(4).
- Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2010). Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 119(4), 1443-1450.
- Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2011). Targeted metabolites analysis in wild Boletus species. *LWT-Food Science and Technology*, 44(6), 1343-1348.
- Isaka, M., Sappan, M., Supothina, S., Srichomthong, K., Komwijit, S., & Boonpratuang, T. (2017). Alliacean sesquiterpenoids from submerged cultures of the basidiomycete *Inonotus sp.* BCC 22670. *Phytochemistry*, 136, 175-181.
- Juma, I., Mshandete, A. M., Tibuhwa, D. D., & Kivaisi, A. (2016). Assessment of antioxidant potentials of the wild and domesticated saprophytic edible mushrooms from Tanzania. *Curr Res Environ App Mycol*, 6(2016), 1-10.
- Kavanagh, F. (1947). Chemical determination of pleurotin, an antibacterial substance from *Pleurotus griseus*. *Archives of biochemistry*, 15(1), 95-98.
- Keleş, A., Koca, I., & Genççelep, H. (2011). Antioxidant properties of wild edible mushrooms. *Journal of Food Processing & Technology*, 2(6), 2-6.

- Khadhri, A., Aouadhi, C., & Aschi-Smiti, S. (2017). Screening of bioactive compounds of medicinal mushrooms collected on Tunisian Territory. *International journal of medicinal mushrooms*, 19(2).
- Kim, M. Y., Seguin, P., Ahn, J. K., Kim, J. J., Chun, S. C., Kim, E. H., ... & Ro, H. M. (2008). Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7265-7270.
- Kim, Y. J., Park, J., Min, B. S., & Shim, S. H. (2011). Chemical constituents from the sclerotia of *Inonotus obliquus*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(2), 287-294.
- Klaus, A., Kozarski, M., & Nikšić, M. (2011). Antioxidative activities of the polysaccharides extracted from the mushroom *Ganoderma lucidum*. In *11th International Congress on Engineering and Food, Food Process Engineering in a Changing World, Athens, Greece, Congress Proceeding* (Vol. 2, pp. 1383-1384).
- Koolen, H. H., da Silva, F. M., Gozzo, F. C., de Souza, A. Q., & de Souza, A. D. (2013). Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*, 51(2), 467-473.
- Llata Loyola, María Dolores de la. (1994). *Química Orgánica*. Editorial el Progreso, S.A. 101-102.
- Lee, I. K., & Yun, B. S. (2007). Highly oxygenated and unsaturated metabolites providing a diversity of hispidin class antioxidants in the medicinal mushrooms *Inonotus* and *Phellinus*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(10), 3309-3314.
- Leliebre-Lara, V., García, M., Nogueiras, C., & Monzote, L. (2015). Qualitative analysis of an ethanolic extract from *Trametes versicolor* and biological screening against *Leishmania amazonensis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 592-595.
- Lin, S. Y., Yeh, C. C., Liang, C. H., & Mau, J. L. (2012). Preparation of Chaga Medicinal Mushroom, *Inonotus obliquus*- Fermented Rice Using Solid-State Fermentation and its Taste Quality and Antioxidant Property. *International journal of medicinal mushrooms*, 14(6).
- Liu, Y. T., Sun, J., Luo, Z. Y., Rao, S. Q., Su, Y. J., Xu, R. R., & Yang, Y. J. (2012). Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1238-1244.
- Lobo, A. M., de Abreu, P. M., Prabhakar, S., Godinho, L. S., & Williams, D. J. (1983). Pisolactone, a novel triterpenoid isolated from the fungus *Pisolithus tinctorius*. *Tetrahedron Letters*, 24(21), 2205-2208.
- Lobo, A. M., De Abreu, M., Prabhakar, S., Godinho, L. S., Jones, R., Rzepa, H. S., & Williams, D. J. (1988). Triterpenoids of the fungus *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry*, 27(11), 3569-3574.
- Lohmann, J. S., von Nussbaum, M., Brandt, W., Mülbradt, J., Steglich, W., & Spiteller, P. (2018). Rosellin A and B, two red diketopiperazine alkaloids from the mushroom *Mycena rosella*. *Tetrahedron*, 74(38), 5113-5118.



**Campi, M. et al. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioactive compounds in fungi**

- Lung, M. Y., & Huang, W. Z. (2012). Antioxidant properties of polysaccharides from *Laetiporus sulphureus* in submerged cultures. *African Journal of Biotechnology*, 11(23), 6350-6358.
- Márquez-Fernández, O., Herrera, E., Castellanos-Onorio, O., Estrada-Torres, A., & Trigos, Á. (2013). Identificación de un derivado de lanosterol procedente del hongo cultivado *Pisolithus arhizus* (scop.) Rauschert. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 19(2), 217-224.
- Matijašević, D., Pantić, M., Rašković, B., Pavlović, V., Duvnjak, D., Sknepnek, A., & Nikšić, M. (2016). The antibacterial activity of *Coriolus versicolor* methanol extract and its effect on ultrastructural changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis*. *Frontiers in microbiology*, 7, 1226.
- Matsuda, M., Kobayashi, T., Nagao, S., Ohta, T., & Nozoe, S. (1996). Laccarin, a new alkaloid from the mushroom, *Laccaria vinaceo-avellanea*. *Heterocycles*, 3(43), 611-617.
- Mattila, P., Könkö, K., Eurola, M., Pihlava, J. M., Astola, J., Vahteristo, L., ... & Piironen, V. (2001). Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(5), 2343-2348.
- Mohsin M, Negi P, Ahmed Z (2011) Determination of the antioxidant activity and polyphenol contents of wild Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt. Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes) from central Himalayan hills of India. *Int J Med Mushrooms* 13(6), 535-544.
- Nomura M, Takahashi T, Uesugi A, Tanaka R, Kobayashi S (2008) Inotodiol, a lanostane triterpenoid, from *Inonotus obliquus* inhibits cell proliferation through caspase-3-dependent apoptosis. *Anticancer Res* 28(5A), 2691-2696
- Olennikov, D. N., Tankhaeva, L. M., & Agafonova, S. V. (2011). Antioxidant components of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. fruit bodies. *Applied biochemistry and microbiology*, 47(4), 419-425.
- Orhan, I., & Üstün, O. (2011). Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(3), 386-390.
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'arrigo, M., Rostagno, M. A., Martínez, J. and Villares, A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128(3), 674-678.
- Rasser, F., Anke, T., & Sterner, O. (2000). Secondary metabolites from a *Gloeophyllum* species. *Phytochemistry*, 54(5), 511-516.
- Rathee, S., Rathee, D., Rathee, D., Kumar, V., & Rathee, P. (2012). Mushrooms as therapeutic agents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2), 459-474.
- Reis, F. S., Pereira, E., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2011). Biomolecule profiles in inedible wild mushrooms with antioxidant value. *Molecules*, 16(6), 4328-4338.
- Ribeiro, B., Rangel, J., Valentão, P., Baptista, P., Seabra, R. M., &

- Andrade, P. B. (2006). Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(22), 8530-8537.
- Ribeiro, B., Valentão, P., Baptista, P., Seabra, R. M., & Andrade, P. B. (2007). Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food and Chemical Toxicology*, 45(10), 1805-1813.
- Robledo, G., & Urcelay, C. (2009). *Hongos de la madera en árboles nativos del centro de Argentina (No. 582.28 (823))*. Universidad Nacional de Córdoba.
- Ruiz-Rodriguez, A., Santoyo, S., & Soler-Rivas, C. (2009). Antioxidant properties of edible mushrooms. *Funct Plant Sci Biotechnol*, 3(Special Issue 1), 92-102.
- Sánchez, C. (2017). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and systems biotechnology*, 2(1), 13-22.
- Sandargo, B., Chepkirui, C., Cheng, T., Chaverra-Munoz, L., Thongbai, B., Stadler, M., & Hüttel, S. (2019). Biological and chemical diversity go hand in hand: Basidiomycota as source of new pharmaceuticals and agrochemicals. *Biotechnology advances*.
- Song T., Yen G. (2002) Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *J Agric Food Chem* 50: 3322–3327
- Spiteller, P., & Schrey, H. (2019). E-and Z-Proxamidines, Unprecedented 1, 3-Diazacyclooct-1-ene Alkaloids from Fruiting Bodies of *Laccaria proxima*. *Chemistry—A European Journal*.
- Stadler, M., & Hoffmeister, D. (2015). Fungal natural products the mushroom perspective. *Frontiers in microbiology*, 6, 127.
- Staniszewska, J., Szymański, M., & Ignatowicz, E. (2017). Antitumor and immunomodulatory activity of *Inonotus obliquus*. *Herba Polonica*, 63(2): 48-58.
- Sulkowska-Ziaja, K., Muszynska, B., Motyl, P., Pasko, P., & Ekiert, H. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activity in some species of polyporoid mushrooms from Poland. *International journal of medicinal mushrooms*, 14(4).
- Sun, Z., Hu, M., Sun, Z., Zhu, N., Yang, J., Ma, G., Xu, X., Sun, Z., Hu, M., Sun, Z., Zhu, N., Yang, J., Ma, G., Xu, X., (2018). Pyrrole alkaloids from the edible mushroom *Phlebopus portentosus* with their bioactive activities. *Molecules* 23, 1198. <https://doi.org/10.3390/molecules2305119>
- Tanasova, M., & Sturla, S. J. (2012). Chemistry and biology of acylfulvenes: sesquiterpene-derived antitumor agents. *Chemical Reviews*, 112(6), 3578-3610.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica scien cia*, 1(1), 98-106.
- Turkoglu, A., Duru, M. E., Mercan, N., Kivrak, I., & Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101(1), 267-273.
- Vila, J. L., Martinez, M., Torrez, A. S., Campi, M. G., & Bravo, J. A. (2015). Ergosterol from the mushroom *Laetiporus* sp.: isolation and structural cha-

**Campi, M. et al. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioactive compounds in fungi**

- racterization. *Revista Boliviana de Química*, 32(4).
- Wieczorek, P. P., Witkowska, D., Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Oterman, M., & Zielińska, K. (2015). Bioactive alkaloids of hallucinogenic mushrooms. In *Studies in Natural Products Chemistry (Vol. 46, pp. 133-168)*. Elsevier.
- Wright JE, Albertó E (2002) Guía de los Hongos de la Región Pampeana. Tomo I. Hongos con Laminillas. Literature of Latin America, Buenos Aires, 280 pp.
- Zaidman, B., Yassin, M., Mahajna J, Wasser, P. (2005). Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 453–468
- Zamuner, M., Cortez, D. A., Dias Filho, B. P., Lima, M. I. S., & Rodrigues-Filho, E. (2005). Lanostane triterpenes from the fungus *Pisolithus tinctorius*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(4), 863-867.
- Zhang, N., Chen, H., Zhang, Y., Xing, L., Li, S., Wang, X., & Sun, Z. (2015). Chemical composition and antioxidant properties of five edible Hymenomyces mushrooms. *International Journal of Food Scien.*

# Contribución al estudio de líquenes corticícolas del Parque Nacional Ybycuí, Departamento de Paraguari

Martínez Bernié, L.<sup>1\*</sup>; Mereles, F.<sup>2</sup>; Estrabou, C.<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Asunción Paraguay y Programa Nacional de Incentivo a Investigadores, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, PRONII-CONACYT, Asunción, Paraguay

<sup>3</sup>Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Centro de Ecología y Recursos Naturales Renovables., Argentina

\*E mail del autor: loremar.py@gmail.com

---

**Contribución al estudio de líquenes corticícolas del Parque Nacional Ybycuí, Departamento de Paraguari.** El Parque Nacional Ybycuí (PNY) es un área relevante para la conservación de muestras representativas de los bosques de la zona central en la Región Oriental del Paraguay. El objetivo es dar a conocer las especies, géneros y familias de líquenes encontrados en los bosques de la reserva. Se seleccionaron dos comunidades boscosas semicaducifolias: una ribereña y no ribereña. Se tomaron muestras de líquenes únicamente corticícolas. Para las identificaciones se utilizó la bibliografía especializada y las sustancias líquénicas fueron identificadas a través de reacciones puntuales de color por medio de reactivos químicos tales como hidróxido de potasio, hipoclorito de sodio, fluorescencia en cámara de luz ultravioleta y cromatografía en capa delgada. En total se identificaron 46 especies distribuidas en 21 géneros y 13 familias. El bosque interior resultó ser más diverso que el ribereño, con 28 especies, 17 géneros y 11 familias.

**Palabras clave:** líquenes, corticícolas, sustancias líquénicas, ribereña

**Contribution to the study of corticolous lichens of the Ybycuí National Park, Department of Paraguari.** The Ybycuí National Park (PNY) is an important area for conservation of representative samples of the forests from the central zone in the Eastern Region of Paraguay. The aim of this study is to identify genera and families of lichens found in the forests of the reserve. Two semi-deciduous forested communities were selected, one riparian and one non-riparian. Only samples of corticolous lichens were collected. Specialized literature was used for the taxonomic identifications and the lichen substances were studied through specific colour reactions using chemical reagents such as potassium hydroxide, sodium hypochlorite, fluorescence in ultraviolet light chamber, and thin layer chromatography. Forty-six species were identified, distributed in 21 genera and 13 families. The interior forest turned out to be more diverse than the riparian forest, with 28 species, 17 genera, and 11 families.

**Keywords:** lichens, corticolous, lichen substances, riparian

---

## INTRODUCCIÓN

En los bosques, la diversidad de los líquenes corticícolas varían en función a la situación geográfica, el macroclima y las características de la masa forestal donde se

encuentran (Barreno & Pérez-Ortega, 2003). Según el sustrato sobre el que se desarrollan, los líquenes se denominan como corticícolas si crecen sobre corteza, en el presente trabajo se hace referencia exclusivamente a estos líquenes y para una

*Steviana*, Vol. 11(1), 2019 pp. 42 – 54.

Original recibido el 26 de junio de 2019.

Aceptado el 11 de agosto de 2019

primera determinación se tienen en cuenta los biotipos. La clasificación taxonómica se basa en gran medida en la morfología de las estructuras de reproducción sexual. Las principales familias y géneros se reconocen a partir de la observación de esporas, picnidios y ascomas (apotecios o peritecios), o propágulos vegetativos (asexuales) como isidios, soledios, etc. (Alexopoulos & Mins, 1989; Loengrin & Sipman, 2002; Hawksworth *et al.*, 2005).

Las claves de Chávez (2006) para líquenes del Neotrópico describen a los líquenes crustosos y cubren cerca de 230 géneros, los líquenes foliosos, 74 géneros, fruticulosos 45 géneros y refiere que aún la flora líquénica es pobremente conocida. Los aportes de Adler (1988); Hale (1976); Scutari (1995); Calvelo & Liberatore (2002), Cáceres *et al.* (2014), Cunha *et al.* (2015), mencionan a varios géneros y especies de líquenes para América del sur.

Algunos grupos o géneros de macrolíquenes (fruticulosos y foliosos) y microlíquenes (crustosos y foliícolas) han sido profundamente trabajados en Argentina (Rodríguez *et al.*, 2016; Filippini *et al.*, 2015; Adler, 2013; Ferraro & Michlig, 2012; Rodríguez *et al.*, 2011; Estrabou *et al.*, 2006). Los macrolíquenes en el país limítrofe presentan mayores estudios hasta la actualidad.

Los trabajos publicados para Paraguay sobre biodiversidad de líquenes, distribución geográfica, y clasificación taxonómica tuvo un periodo de pausa prolongado en relación a sus estudios, el más relevante presentado por Ferraro (1999) y otros citados como el género *Haematomma* de acuerdo a su distribución y descripción fueron también citados para Cuba, México, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Co-

lombia, Brasil, Uruguay (Staiger & Kalb, 1995; Brodo *et al.*, 2008).

El PNY cuenta con un inventario de herpetofauna, de animales vertebrados e invertebrados, inventario de flora, la información existente a través de estudios de investigación contribuye a las acciones de manejo y conservación de la biodiversidad en el lugar y el conocimiento de la microbiota liquenizada así como el monitoreo en el futuro, implicarían aportes para la ciencia de gran valor (Pinazzo, 2015).

El objetivo de este trabajo fue identificar los géneros y especies de líquenes corticícolas en dos comunidades boscosas naturales en el área de estudio. Se listan los géneros y especies estudiados para el PNY y se incluyen claves para la identificación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El Parque Nacional Ybycuí (PNY), situado en el departamento de Paraguari, a 25 km del centro de Ybycuí, y a 150 km de la ciudad de Asunción, cuenta con 5.000 hectáreas. Se encuentra distribuido en mayor proporción, en el distrito de Ybycuí y en una menor proporción en el distrito de Mbuyapey, ambos correspondientes al mismo departamento. La coordenada en el punto central del parque es 26° 04'51,58 Sur y 56° 49'22,80 Oeste.

A pesar de que en términos generales el clima del PNY no difiere mucho del clima regional, pueden existir variaciones de temperatura y precipitación en la unidad de conservación, con respecto al Departamento de Paraguari, siendo la precipitación media anual de 1.400 a 1.600 mm y la temperatura media anual de 23°C (Secretaría Técnica de Planificación, 2007; González, 2008; Morán, 2012).

Constituye una de las pocas áreas silvestres protegidas con límites definidos casi en su totalidad. Desde su creación por Decreto N° 32.772 el 16 de mayo de 1973 ha contado con lineamientos mínimos para definir a nivel de terreno los límites físicos para las operaciones de manejo y control (Pinazzo, 2015) (Fig. 1).

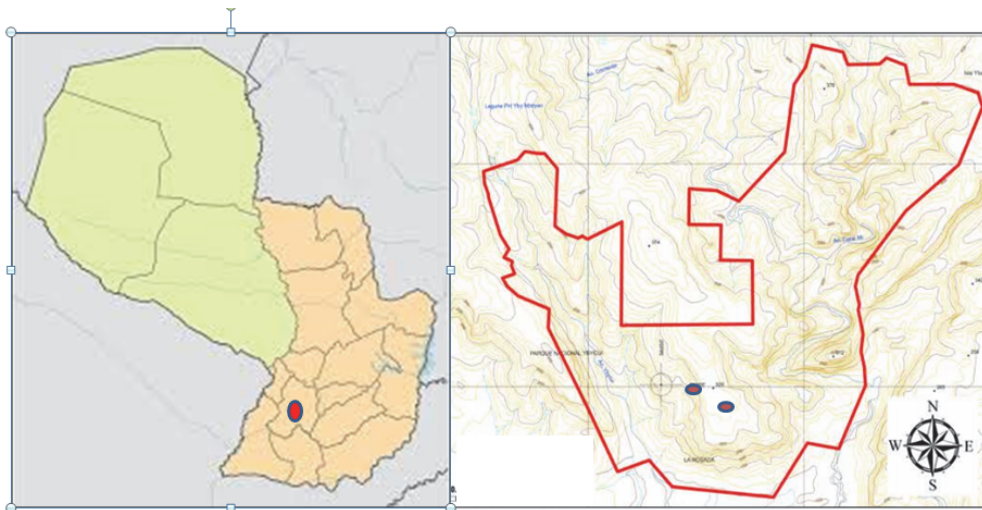
Fueron seleccionados dos sitios de muestreo en dos unidades boscosas dentro del parque: un bosque semicaducifolio ribereño (BR), cercano a un curso de agua denominado arroyo Guaraní, en llanuras de inundación donde se seleccionaron los árboles situados a no más de 50 m desde la orilla hacia el interior y un bosque semicaducifolio no ribereño (BNR), al interior en el área en donde ya no se producen inundaciones ni anegamientos. Para cada sitio y a modo de ordenar la toma de muestras, se realizó una transecta de 1km de extensión. Se realizaron dos campañas de campo entre los meses de agosto y setiembre de 2016. La humedad atmosférica de cada área fue

medida por medio de un higrómetro digital. Los forófitos seleccionados en las transectas presentaron un DAP (diámetro a la altura del pecho) de 10 cm en adelante y las colecciones de los líquenes se realizaron desde la base del árbol hasta 1,5 m de altura (Estrabou, 2007; Aptroot *et al.*, 2008). Todos los materiales colectados fueron registrados con fotografías.

Cada ejemplar fue colocado en sobres de papel con las características correspondientes y luego transportadas al laboratorio para la preparación, análisis e identificación. En el procedimiento de curación se utilizó la metodología citada por Adler (1989) y Spielman (2005).

Se realizaron estudios de rutina morfológicos, anatómicos y químicos (Michlig & Ferraro, 2012). Se elaboraron claves dico-tómicas de los géneros estudiados.

Algunos de los materiales de referencias utilizados para la nomenclatura fueron Estrabou (1999); Cáceres & Lucking (2000); Cáceres (2007); Aptroot *et al.*



**Figura 1.** Límites definidos del Parque y puntos de muestreo dentro del área protegida.

**Fuente:** Pinazzo, 2015.

(2008); Aptroot et al. (2009); Nelsen et al. (2009); Lucking et al. (2009); Aptroot et al. (2013); Cáceres et al. (2014); Michlig et al. (2015); Mendonça et al. (2016).

Se utilizaron bases de datos como MycoBank (<http://www.mycobank.org/MB/>), IndexFungorum (<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>), Micotaxon Publications (<http://www.mycotoxon.com/publications.html>), con el fin de corroborar los nombres científicos de todas las especies. Así como aquellas especies con sinonimias que fueron incluidas en la descripción taxonómica citadas por MycoBank.

Las especies identificadas fueron depositadas en el Herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y los duplicados depositados en CTES y FCQ.

## RESULTADOS

Un total de 60 ejemplares fueron coleccionados de ambos bosques para su estudio taxonómico. De las cuales se identificaron 13 familias, 21 géneros y 46 especies. La identificación de algunos ejemplares no fue posible debido a que las muestras se encontraban estériles.

Las especies indeterminadas se mencionan como *sp* y están numeradas secuencialmente desde el número 1 indicando las presentes en cada género.

La familia Arthoniaceae resultó ser la más diversa con 2 géneros y 10 especies y la Parmeliaceae con 4 géneros y 8 especies. Los siguientes resultados en relación al número de especies para las demás familias

fue de la siguiente manera Collemataceae (5), Ramalinaceae (4), Gyalactaceae y Physciaceae con igual número de especies (4). Las restantes familias presentaron cantidades iguales de géneros y especies (Tabla 1).

En el Bosque Ribereño se reconoció un total de 9 familias, 12 géneros y 23 especies (Tabla 2).

En el Bosque no Ribereño se identificaron 11 familias, 17 géneros y 28 especies (Tabla 3).

En ambos bosques las especies más diversas fueron del Género *Cryptothecia* (Fig. 2 y 3).

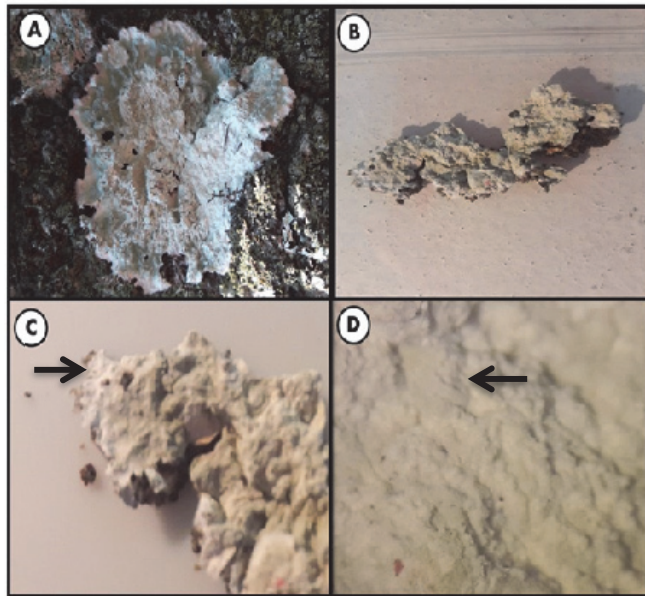
**Tabla 1.** Número de géneros y especies de las familias de líquenes identificadas en los bosques del PNY

FAMILIA	Nº DE GÉNEROS	Nº DE ESPECIES
Arthoniaceae	2	10
Chrysothricaceae	1	1
Collemataceae	2	5
Graphidaceae	2	2
Gyalactaceae	1	4
Haematommataceae	1	1
Lecideaceae	1	1
Letrouitiaceae	1	3
Malmidaceae	1	2
Parmeliaceae	4	8
Physciaceae	1	4
Pyrenulaceae	1	1
Ramalinaceae	3	4
<b>TOTAL</b>	<b>13</b>	<b>46</b>

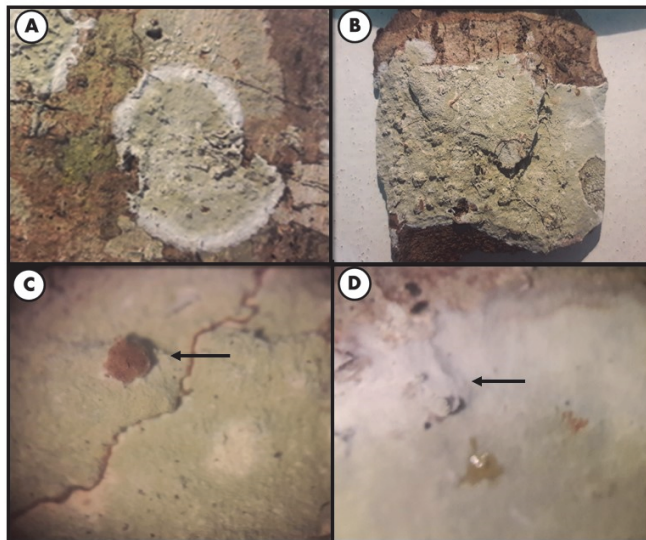
**Tabla 2.** Sistemática de los líquenes corticícolas del BR

<b>Familias</b>	<b>Géneros</b>	<b>Especies</b>
Arthoniaceae	<i>Cryptothecia</i> Stirt.	<i>Cryptothecia punctosorediata</i> Sparrius <i>Cryptothecia</i> sp1 <i>Cryptothecia</i> sp2 <i>Cryptothecia</i> sp3
	<i>Herpothallom</i> Tobler	<i>Herpothallon rubrocinctum</i> (Ehrenb. Fr.) Aptroot, Lücking & G. Thor.
Collemataceae	<i>Leptogium</i> (Ach)Gray	<i>Leptogium cyanescens</i> (Ach.) Körb. <i>Leptogium marginellum</i> (Sw.) Gray. <i>Leptogium</i> sp1
Graphidaceae	<i>Dyorygma</i> Eschw	<i>Diorygma</i> sp1
	<i>Leucodecton</i> A.Massal	<i>Leucodecton occultum</i> (Eschw.) Frisch
Gyalactaceae	<i>Coenogonium</i> Ehrenb.	<i>Coenogonium interplexum</i> Nyl. <i>Coenogonium siquirrense f. denticulatum</i> Rivas Plata & Lucking
Letrouiticiae	<i>Letrouitia</i> Hafellener y Bellen	<i>Letrouitia vulpina</i> (Tuck.) Hafellener y Bellem
Parmeliaceae	<i>Canoparmelia</i> Elix & Hale	<i>Canoparmelia caroliniana</i> (Nyl.) Elix & Hale <i>Canoparmelia</i> sp1 <i>Canoparmelia texana</i> (Tuck.) Elix & Hale
	<i>Parmotrema</i> A.Marssal	<i>Parmotrema reticulatum</i> (Taylor) M. Choisy <i>Parmotrema tinctorum</i> (Despr. ex Nyl.) Hale
Physciaceae	<i>Heterodermia</i> Trevis.	<i>Heterodermia oscurata</i> (Nyl.) Trevis.
Pyrenulaceae	<i>Pyrenula</i> Ach.	<i>Pyrenula mamillana</i> (Ach) Trevis.
Ramalinaceae	<i>Phyllopsora</i> Mull.Arg.	<i>Phyllopsora corallina</i> (Eschw.)Mull.Arg





**Figura 2.** A: *Cryptothecia punctosorediata*, foto en campo. B: foto en laboratorio C: lóbulos presentes D: soredios.



**Figura 3.** A: *Cryptothecia striata*, foto en campo. B: foto en laboratorio y presencia de protalo blanco. C: apotecio lecanorino D: soredios.

**Tabla 3.** Sistemática de los líquenes corticícolas del BNR

<b>Familias</b>	<b>Géneros</b>	<b>Especies</b>
Arthoniaceae	<i>Cryptothecia</i> Stirt.	<i>Cryptothecia striata</i> G.Thor. <i>Cryptothecia</i> sp4 <i>Cryptothecia</i> sp5 <i>Cryptothecia</i> sp6 <i>Cryptothecia</i> sp7
	<i>Herpothallon</i> Tobler	<i>Herpothallon rubrocinctum</i> (Ehrenb.) Aptroot, Lücking & G. Thor.
Chrysothricaceae	<i>Chrysothrix</i> Mont.	<i>Chrysothrix granulosa</i> G. Thor.
Collemaataceae	<i>Collema</i> Weber ex F.H. Wigg	<i>Collema furfuraceum</i> Du Rietz
	<i>Leptogium</i> (Ach) Gray.	<i>Leptogium azureum</i> (Sw. ex Ach.) <i>Leptogium cyanescens</i> (Ach.) Körb.
Gyalectaceae	<i>Coenogonium</i> Ehrenb.	<i>Coenogonium isidiatum</i> (G.Thor & Vezda) Lucking, Aptroot & Sipman <i>Coenogonium</i> sp1
Haematomataceae	<i>Haematomma</i> A.Massal	<i>Haematomma flexuosum</i> Hillman
Lecanoraceae	<i>Lecanora</i> Ach.	<i>Lecanora caesiorubella</i> Ach.
Letrouitiaceae	<i>Letrouitia</i> Hafellener y Bellen	<i>Letrouitia dominguensis</i> (Pers.) Hafellner <i>Letrouitia</i> sp1
	<i>Malmidea</i> Kalb, Rivas Plata & Lumbsch	<i>Malmidea piperis</i> (Spreng.) Kalb, Rivas Plata & Lumbsch <i>Malmidea vinosa</i> (Eschw.) Kalb, Rivas Plata y Lumbsch
Parmeliaceae	<i>Flavopunctelia</i> (Krog)Hale	<i>Flavopunctelia praesignis</i> (Nyl.) Hale
	<i>Parmotrema</i> A.Marssal.	<i>Parmotrema tinctorum</i> (Despr. ex Nyl.) Hale
Physciaceae	<i>Usnea</i> Dill.ex Adans.	<i>Usnea steineri</i> Zahlbr.
	<i>Heterodermia</i> Trevis.	<i>Heterodermia oscurata</i> (Nyl.) Trevis.
	<i>Phaeophyscia</i> Moberg	<i>Phaeophyscia</i> sp1 <i>Phaeophyscia</i> sp2 <i>Phaeophyscia</i> sp3
Ramalinaceae	<i>Ramalina</i> Ach.	<i>Ramalina celastri</i> (Spreng.) Krog & Swinscow <i>Ramalina sorediosa</i> (de Lesd.) Landrón
	<i>Phyllopsora</i> Mull.Arg	<i>Phyllopsora furfuracea</i> (Pers.) Zahlbr

## Clave de Géneros

La siguiente clave para la identificación de géneros incluye todos los morfotipos de líquenes corticícolas de las dos comunidades estudiadas en el Parque Nacional Ybycuí y se refiere únicamente a los taxa analizados en este estudio.

- |     |   |   |
|-----|---|---|
| 1   | Talo filamentoso, filamentos algales ( <i>Trentepohlia</i> ) rodeados del micobionte, de un color verde limón intenso.....                          | <b><i>Coenogonium (C.interplexum)</i></b> |
| 1'  | Talo nunca filamentoso .....  | <b>2</b>                                  |
| 2   | Talo fruticuloso.....   | <b>3</b>                                  |
| 3   | Talo deprimido dorsiventralmente, sin eje central.....  | <b><i>Ramalina</i></b>                    |
| 3'  | Talo cilíndrico con un eje central.....   | <b><i>Usnea</i></b>                       |
| 2'  | Talo folioso o crustoso.....  | <b>4</b>                                  |
| 4   | Talo folioso.....   | <b>5</b>                                  |
| 5   | Talo gelatinoso, generalmente de color azul hasta negro, con cianobacteria.....   | <b>6</b>                                  |
| 6   | Talo sin corteza.....   | <b><i>Collema</i></b>                     |
| 6'  | Talo con corteza pseudoparenquimática.....  | <b><i>Leptogium</i></b>                   |
| 5'  | Talo nunca gelatinoso, superficie de color blanquecino, gris a verde.....   | <b>7</b>                                  |
| 7   | Talo verde amarillento, superficie superior con pseudocifelas.....  | <b><i>Flavopunctelia</i></b>              |
| 7'  | Talo gris o gris verdoso, superficie sin pseudocifelas.....   | <b>8</b>                                  |
| 8   | Corteza superior emaculada o maculada, con lóbulo ancho grande o pequeño mayor a 1.5 mm.....  | <b>9</b>                                  |
| 9   | Lóbulo pequeño redondeado de 1.5 a 5 mm., sin ciliadas.....   | <b><i>Canoparmelia</i></b>                |
| 9'  | Lóbulo grande y ancho de 5 mm, en adelante con ciliadas negras.....   | <b><i>Parmotrema</i></b>                  |
| 8'  | Corteza superior emaculada con lóbulos pequeños, menor a 2 mm.....  | <b>10</b>                                 |
| 10  | Con corteza inferior castaño-oscura a negra, KOH negativa en la corteza.....  | <b><i>Phaeophyscia</i></b>                |
| 10' | Con o sin corteza inferior, en caso de no tener corteza, la médula color blanca o blanca con manchas más oscuras, KOH + amarilla en la corteza..... | <b><i>Heterodermia</i></b>                |

4'	Talo crustoso.....	11
11	Peritecio presente.....	12
12	Ascospora transversalmente septada, de color marrón a gris.....	<i>Pyrenula</i>
12'	Ascospora muriforme, de color marrón.....	<i>Leucodecton</i>
11'	Apotecio presente.....	13
13	Apotecio lecideino.....	14
14	Ascospora simple o raramente septada.....	15
14'	Ascospora septada.....	<i>Letrouitia</i>
15	Con superficie superior con isidio.....	<i>Phyllopsora</i>
15'	Con superficie superior sin propágulo vegetativo.....	<i>Malmidea</i>
13'	Apotecio lecanorino.....	16
16	Ascospora fusiforme y menos de 9 septos.....	<i>Haematomma</i>
16'	Ascospora simple.....	<i>Lecanora</i>
17	Talo con propágulo vegetativo, isidio.....	18
18	Con protalo de color rojo.....	<i>Herpothallon</i>
18'	Con protalo de color blanco.....	<i>Cryptothecia</i>
17'	Talo con propágulo vegetativo, soledio.....	19
19	Gránulo solediado pulverulento de color blanco, verde a grisáceo.....	20
19'	Gránulo redondeado y compacto de color amarillo brillante a verde amarillo.....	<i>Crysotrix</i>
20	Médula blanca, parches irregulares de médula I+.....	<i>Cryptothecia</i>
20'	Médula roja, cubierta de máculas en parte.....	<i>Dyorygma</i>

## DISCUSIÓN

Ferraro (1999) citó 93 especies, agrupadas en 43 géneros y 20 familias, para diferentes localidades del Paraguay, de las cuáles 4 especies también se encontraron en los sitios de colecta del presente estudio:

*Canoparmelia texana* (Tuck.) Elix & Hale.  
*Leptogium marginellum* (Sw.) Gray. *Parmotrema praesorediosum* (Nyl.) Hale.  
*Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale.

Los microlíquenes de mayor significancia en ambas comunidades fueron de la

familia Arthoniaceae: *Herpothallom rubrocinctum* (Ehrenb. Fr.) y *Cryptothecia* Stirt., las que presentaron estructuras vegetativas como isidios y soredios respectivamente, distribuidos en todo el talo. Se deduce que la manera de reproducción, justifica su presencia en los ambientes seleccionados (Kaffer et al., 2011).

Los líquenes de la familia Arthoniaceae, fueron difíciles de identificar. Existen pocos estudios a nivel regional (Cáceres, 2007) debido a que en la mayoría de los casos la determinación de especies necesita de estudios de biología molecular, aunque pruebas puntuales químicas sirvieron para separar una especie de otra. Por esta razón las especies del género *Cryptothecia* se presentaron como morfoespecies (sp1 al sp7).

Una primera comparación entre los líquenes identificados en BR y en BNR muestra que solo comparten un número relativamente pequeño de especies (5). Las especies de líquenes compartidos entre los sitios fueron *Cryptothecia striata* G.Thor *Herpothallom rubrocinctum* (Ehrenb.: Fr.) Aptroot, Lücking & G. Thor. *Heterodermia oscurata* (Nyl.) Trevis. *Leptogium cyanescens* (Ach.) Körb. *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale. Marcelli (1992) manifiesta sobre la presencia de especies líquénicas en determinados lugares y su relación por la capacidad de desarrollo de los especímenes de acuerdo a aspectos ecológicos y reproductivos de las mismas.

Las dos comunidades boscosas con características ambientales propias presentaron una diversidad variable de comunidades líquénicas. El resultado pudo deberse a la influencia de la humedad en el bosque ribereño. El agua es un factor limitante en la distribución de los líquenes, estos tam-

bién dependen del vapor de agua de la atmósfera, de la humedad relativa y de la capacidad de los sustratos para retener el agua o condensarla (Barreno & Pérez, 2003). Además Spielman (2005), justifica la presencia de conjuntos definidos de especies líquénicas en relación a la edad de sus hábitats y la comunidad natural estable donde se desarrollan.

## CONCLUSIONES

El presente trabajo es considerado como una primera contribución a la caracterización de la diversidad de líquenes del PNY, teniendo en cuenta la extensión y existencia de otros tipos de bosques no estudiados en el parque. Con base a los datos recaudados hasta el momento, la continuidad de su estudio es relevante.

Se elaboró una síntesis del enfoque taxonómico actual, con algunas dificultades en el transcurso de su redacción, la dificultad de disponer de material en los herbarios y escasos materiales de referencia de algunas familias y géneros estudiados como por ejemplo las familias Chrysotrichaceae, Lextrouitiaceae, Malmidaceae y Phisciaceae, esta última de morfología escamosa requirieron de más tiempo y esfuerzo en su determinación por su tamaño, forma, ausencia de estructuras reproductivas entre otros.

Una comparación entre los líquenes identificados en BR y en BNR muestra que solo comparten un número relativamente pequeño de especies (5) de morfotipo crustoso y folioso, y una característica resalante todos ellos presentaron propágulos vegetativos (soredios e isidios). Al comparar la diversidad y los hábitos de crecimiento el BR presentó líquenes filamentosos y el BNR líquenes fruticulosos. Se

aportan datos de especies que difieren principalmente por características puntuales de color a través de reacciones químicas como los microlíquenes. La detección y confirmación de componentes químicos y el estudio de los caracteres morfológicos fueron considerados de gran valor para la descripción taxonómica y posterior realización de la clave dicotómica.

Por último, se concluye que los trabajos de biodiversidad y distribución de líquenes en Paraguay presentan campos todavía no explorados. Los periodos de colectas de trabajos científicos anteriormente realizados demuestran que a pesar de formar parte de los demás seres vivos pasa desapercibido ante la vista e interés de investigadores nacionales y extranjeros.

## REFERENCIAS

- Adler, M. (1988). La familia Parmeliaceae (Líquenes, Ascomycotina) en la provincia de Buenos Aires estudio taxonómico-florístico. (Tesis de Doctorado). Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Adler, M. (1989). Two new species in Parmeliaceae (Lichenized Ascomycotina) and new records for Argentina. *Mycotaxon*. 35:399-404.
- Adler, M. (2013). Líquenes Parmeloides (Parmeliaceae Ascomycota) del Parque Nacional Copo (Provincia de Santiago del Estero, Argentina). *Bol. Soc. Argentina Bot.* 48 (3-4): 387-406.
- Alexopoulos, C., & Mims, C. (1989). Introducción a la micología. Barcelona, España: Omega.
- Aptroot, A., Lücking, R., Sipman, H. Umaña, L., Chaves, J. (2008). Pyrenocarpous lichens with bitunicate asci: A first assessment of the lichen biodiversity inventory in Costa Rica. *Bibliotheca Lichenologica*. 97: 1-162.
- Aptroot, A., Thor, G., Lücking, R., Elix, J., Chaves, J. (2009). The lichen genus *Herpothallon* reinstated. Berlin J. Cramer. *Sparrius* (eds): *Bibliotheca Lichenologica*. 99:19-66.
- Aptroot, A., Sipman, H., Cáceres, E. (2013). Twenty-one new species of *Pyrenula* from South America, with notes on overmature ascospores. *Lichenologist*. 45: 169-198.
- Barreno, E.; & Pérez-Ortega, S. (2003). *Biología de los líquenes. Ordenación del Territorio e Infraestructuras del Principado de Asturias. España.* KRK.
- Brodo, I., Culberson, CH., Culberson, C. (2008). *Haematomma* (Lecanoraceae) in North and Central America, including the West Indies. *The Bryologist* .111: 363-423.
- Cáceres, M. & Lucking, R.(2000). Three new species and one new combination of foliicolous lichens and lichenicolous fungi from the Atlantic rainforest in Pernambuco state, Brazil. *Nova Hedwigia*. 70: 217-226.
- Cáceres, M. (2007). Corticolous crustose and microfoliose lichens of northeastern Brazil *Libri Botanici*. 22: 1-168.
- Cáceres, M, Nascimento, E., Aptroot, A., Lücking, R. (2014). Líquenes brasileiros: novas descobertas evidenciam a riqueza no Norte e Nordeste do país *Bol. Mus. Biol. Mello Leitão*. 35:101-119.
- Calvelo, S., Liberatore, S. (2002). Catálogo de los líquenes de la Argentina. *Kurtziana*. 29: 7-170.
- Chávez, J. (2006). Líquenes de la región ecológica Talamanca. *INBIO*.1-20

- Cunha, I., Marcelli, M., Pereira, E. (2015). Espécies de *Canoparmelia* s.l. (Parmeliaceae, ascomicetes liquenizados) da região tocantina. *Hoehnea*. 42(2): 265-272
- Estrabou, C. (1999). La familia Parmeliaceae (Ascomycetes Líquenizados) sensu stricto de la Provincia de Córdoba: estudio sistemático-biogeográfico. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Estrabou, C., Rodriguez, J., Prieri, B., Litjieroff, R. (2006). Contribución al conocimiento de los macrolíquenes del extremo Sur del Gran Chaco (Argentina). *Kurtziana*. 32 (1-2): 25-43.
- Estrabou C. (2007). Preferencia de forófito por los líquenes en el bosque chaqueño oriental. *Bosque*. 28(1):46-49.
- Ferraro, L. (1999). Contribución al conocimiento de los líquenes de Paraguay, colecciones de A.Schinini y E. Bordas. *Candollea*. 45: 655-670.
- Filippini, E., Quiroga, G., Rodríguez, J., Estrabou, C. (2015). The genus *Hyperphyscia* (Physciaceae, Ascomycota) in Argentina. *Sydowia*. 67: 25-32.
- González, J. (2008). Diseño de modelos de ecoturismo para el Parque Nacional Ybycuí con el involucramiento de las comunidades aledañas. (Tesis Ingeniería Forestal), Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay.
- Hale, M. (1976). A monograph of the lichen genus *Pseudoparmelia* Lynge (Parmeliaceae). *Smithsonian Contributions to Botany*. 31: 1-62.
- Hawksworth, D., Iturriaga, T., Crespo, A. (2005). Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medio-ambientales en los trópicos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 22 (2): 71-82.
- Indexfungorum. (2017). Indexfungorum. Base de datos. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. (Consultado febrero de 2017).
- Käffer, M., Alves, C., Cáceres, M., Martins, S., Vargas, V. (2011). Caracterização da comunidade líquênica corticícola de Porto Alegre e áreas adjacente. *Acta Botânica Brasilica*. 25: 832-844.
- Loengrin, U., & Sipman, H. (2002). Líquenes de Costa Rica. *Inbio*. Costa Rica.
- Lücking, R., Rivas, E., Chaves, J., Umaña, L., Sipman, H. (2009). How many tropical lichens are there.really? Diversity of Lichenology—Jubilee Volume. A.Thell, M. R. D. Seaward & T. Feuerer (Eds). *Bibliotheca Lichenologica*. 100: 399-418.
- Marcelli, M. (1992). Ecologia liquenica nos manguezais do sul-sudeste brasileiro. *Bibliotheca Lichenologica*. 47: 1-310.
- Mendonça, C., Aptroot, A., Cáceres, M. (2016). Six new species of the lichen genus *Pyrenula* (Pyrenulaceae) from Northeast Brazil. *Phytotaxa*. 286 (3): 169-176.
- Michlig, A. & Ferraro, L. (2012). Diversidad de macrolíquenes del Parque Nacional Mburucuyá (Corrientes, Argentina). *Bol. Soc. Argentina Bot.* 47(3-4): 287-302.
- Michlig, A., Rodríguez, M., Ferraro, L. (2015). Check List. Notes Geographic Distribution. 11(6): 2-6.
- MicoBank. (2017). MicoBank. Base de datos. <http://www.mycobank.org/MB/>. (Consultado enero 2017).
- Micotaxon. (2017). Micotaxon. Base de datos.

- <http://www.mycotaxon.com/publications.html>. (Consultado enero 2017).
- Morán, L. (2012). Propuesta de zonificación del Parque Nacional Ybycuí considerando su realidad ambiental y socioeconómica. (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay.
- Nelsen, M., Lücking, R., Grube, M., Mbatchou, J., Muggia, L., Plata, E., Lumbsch, H. (2009). Unravelling the phylogenetic relationships of lichenised fungi in Dothideomyceta. *Studies in Mycology*. 64: 135-144.
- Pinazzo, J., Coord. (2015). Plan de Manejo del Parque Nacional Ybycuí 2015-2025.–Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Asunción (FCA-UNA). San Lorenzo, Paraguay.
- Rodríguez, J., Estrabou, C., Truong, C., Clerc, P. (2011). The saxicolous species of the genus *Usnea* subgenus *Usnea* (Parmeliaceae) in Argentina and Uruguay. *Bryologist*. 114: 504-525.
- Rodríguez, J., Hernández, J., Filippini, E., Cañas, M., Estrabou, C. (2016). Nuevas citas de macrolíquenes para Argentina y ampliaciones de distribución en el centro del país. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 51 (3): 405-417.
- Scutari, N. 1995. Los Microlíquenes de Buenos Aires, II: Phaeophyscia, Physcia y Pyxine (Physciaceae, Ascomycotina). *Darwiniana*. 33(1-4): 211-231
- Secretaría Técnica de Planificación (STP). (2007). Paraguay: Diagnóstico Departamental. 2007. Asunción, PY. Agencia Española de Cooperación Internacional, AECI. Ministerio de Hacienda, Paraguay.
- Spielmann, A. (2005). A família Parmeliaceae (fungos liquenizados) nos barrancos e peraus da encosta da Serra Geral, Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brasil. (Trabajo de Post Grado). Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, Brasil.
- Staiger, B.; Kalb, K. (1995). *Haematomma*-studien: I. Dieflechtengattung *Haematomma*. *Bibliotheca Lichenologica*. 59: 3-198.



## **Directrices para autores/as**

**Steviana** publica investigaciones originales (artículos), revisiones (reviews), notas cortas, libros y material suplementario. Para someter sus manuscritos los autores deberán considerar las siguientes pautas:

- Los artículos originales no deben sobrepasar 15 páginas. El texto principal (sin incluir el resumen, los métodos, las referencias y las leyendas al pie de las figuras) no debe tener más de 4500 palabras.
- El título deberá estar escrito en Times New Roman 14, negrita y extensión máxima de 15 palabras.
- Los nombres de los autores se escriben con letra Times New Roman 10 por debajo del título, mencionando apellido(s) e inicial del nombre (Ej. Pereira Sühsner, C.; González, F.). Indicar la filiación sin abreviaturas, Ciudad y País. Seguidamente se menciona al autor de correspondencia colocando un apartado denominado E mail del autor.
- El resumen deberá estar en español e inglés, en letra Arial 9, con extensión máxima de 250 palabras, sin contener referencias, seguido de palabras clave. El resumen deberá incluir el título y una breve descripción del contenido. Las palabras clave estarán separadas por coma y sin punto final.
- Todos los textos deberán conservar el siguiente orden: Título, Autor(es), Filiación de autor(es) (superíndice numerado), Resumen, Palabras clave, Abstract, Keywords, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Referencias Bibliográficas. Apéndices; con letra Times New Roman 11, normal, espacio simple. En casos aplicables, el resultado y la discusión pueden ir juntos.

Los artículos de revisión seguirán las normas de presentación de un artículo científico, substituyendo sin embargo metodología, resultados y discusión, por el desarrollo comentado de la revisión, sin alterar las demás partes.

Los artículos son revisados por pares e incluyen fechas de recepción y aceptación.

### **Información general para la presentación de manuscritos**

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

Cuando el caso lo requiera, las abreviaciones deben ser definidas en el texto o leyendas en su primera utilización, y deben ser usadas exclusivamente desde ese momento.

### **Carta de presentación**

El autor principal debe proveer una carta de presentación que incluya su afiliación y su información de contacto, junto con la aprobación de los coautores del artículo y la firma de los mismos. En la misma debe explicar brevemente los fundamentos por los cuales el trabajo es considerado como apropiado para **Steviana**. Además los autores deben adjuntar una declaración sobre conflictos de intereses si los hubiere.

### **Preparación de envíos**

Como parte del proceso de envíos, los autores/as están obligados a comprobar que su envío cumpla todos los elementos que se muestran a continuación. **Se devolverán a los autores/as aquellos envíos que no cumplan estas directrices.**

1. El envío no ha sido publicado previamente ni se ha sometido a consideración por ninguna otra revista (o se ha proporcionado una explicación al respecto en los Comentarios al editor/a).
2. El archivo de envío está en formato OpenOffice, Microsoft Word, RTF o WordPerfect.
3. Siempre que sea posible, se proporcionan direcciones URL para las referencias.
4. El texto tiene un interlineado sencillo, un tamaño fuente de 11 puntos, se utiliza cursiva en lugar de subrayado (excepto en las direcciones URL), y todas las ilustraciones, figuras y tablas se encuentran colocadas en los lugares del texto apropiados, en vez de al final.
5. Las ilustraciones, figuras y tablas se envían por separado en sus formatos originales.
6. El texto reúne las condiciones estilísticas y bibliográficas incluidas en Pautas para autor/a.

### **Referencias**

Serán considerados para revisión solo aquellos artículos que cumplan estrictamente las normativas vigentes referentes a las citas dentro del contenido y la coincidencia con lo mencionado en referencias bibliográficas. Las referencias bibliográficas, deberán seguir el estilo APA (American Psychological Association). Ejemplos:

**Libro:**

Apellido, A. A. (Año). *Título*. Ciudad, País: Editorial.

Benítez F., B., Vera J., M.I., Vogt, C., Yanosky, A., Pereira S., C.D., & Rivarola S., A.C. (2018). *Guía de la diversidad florística de los ecosistemas del Paraguay – I-Especies de los pastizales de la Reserva para Parque Nacional San Rafael*. San Lorenzo, Paraguay: FACEN.

#### **Sección de un libro:**

Apellido, A. A., y Apellido, B. B. (Año). Título del capítulo o la entrada. En A. A. Apellido. (Ed.), *Título del libro* (pp. xx-xx). Ciudad, País: Editorial.

Mereles, F. (2007). La diversidad vegetal en el Paraguay. En: D. Salas-Dueñas, & J.F. Facetti. (Eds.), *Biodiversidad del Paraguay, una aproximación a sus realidades* (pp. 89-91). Asunción, Paraguay: Fundación Moises Bertoni, USAID, GEF.

#### **Publicación en revista científica:**

Apellido, A. A., Apellido, B. B., y Apellido, C. C. (Fecha). Título del artículo. *Nombre de la revista, volumen*(número), pp-pp. DOI

Zhao-Hui L., Qiang W., Xiao R., Cun-De P., & De-An J. (2010). Phenolics and Plant Allelopathy. *Molecules*. 15(12), 8933-8952. DOI: 10.3390/molecules1512893

#### **Tesis:**

Autor, A., & Autor, A. (Año). *Título de la tesis* (Tesis de pregrado, maestría o doctoral). Nombre de la institución, Lugar.

Pessuto, M. B. (2006). Análise fitoquímica de extrato de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reiss. e avaliação do potencial antioxidante. (Dissertacao de Mestrado en Ciencias Farmaceuticas). Universidade Estadual de Maringá, Brasil.

#### **Página web:**

Apellido, A. A. (Fecha). *Título de la página*. Lugar de publicación: Casa publicadora. dirección de donde se extrajo el documento (URL).

Kew Royal Botanic Gardens. (2019). *Economic Botany Collection*. Kew Royal Botanic Gardens. <https://www.kew.org/science/collections-and-resources/collections/economic-botany-collection>

#### **Proceso de revisión por pares**

El trabajo será recepcionado por el Asistente de edición, quien remitirá al Cuerpo Editorial. El autor será notificado por email cuando el Comité Científico decida si el artículo ha de ser revisado o no. Todos los artículos pasan por una evaluación imparcial y crítica realizado por dos o mas especialistas ajenos al Comité Editorial, respaldando así la calidad de los trabajos publicados. El sistema de arbitraje principalmente empleado es doble ciego. La identidad de los árbitros no es revelada a los autores, excepto a solicitud de los árbitros.

Luego del arbitraje el Comité Científico tomará una de las siguientes decisiones:

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

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

#### **Criterios para la revisión – Confidencialidad – Conflicto de intereses**

La revisión será verificada siguiendo criterios de confrontación con los indicadores establecidos por la editorial.

El proceso de revisión es **estrictamente confidencial**, por tal motivo los miembros del Cuerpo Editorial y los árbitros externos no podrán discutir el manuscrito con personas ajenas a la revisión del mismo.

A Miembros del Cuerpo Editorial y árbitros que los autores hayan excluido, no se les remitirá artículos para su arbitraje. Se evitará la selección de árbitros que tienen colaboraciones recientes o en curso con los autores, que estén en directa competencia para publicar la misma novedad científica, o por motivos de disputa con los autores, o que tengan un interés financiero en el resultado.

#### **Información de contacto**

Para obtener mayor información contacte con: [steviana@facen.una.py](mailto:steviana@facen.una.py)

**CONTENIDO POR SECCIONES**

**Biotecnología**

- 3-14 Desempeño de humedales construidos a escala piloto para el tratamiento de agua residual urbana utilizando *Cyperus giganteus* Vahl y *Typha domingensis* Pers.  
*López, T.R., Duré G.M., Doldán, M.T., Galeano, E.F., Marín, D.*

**Fitoquímica**

- 15-25 Efecto antimutagénico del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* Link (Pata de buey) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática  
*Marín Insfrán, L.; Gayozo, E. & Zamorano-Ponce, E.*

**Micología**

- 26-41 Preliminary evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioactive compounds in some species of basidiomycetes fungi from Paraguay  
*Campi, M.; Mancuello, C.; Ferreira, F.; Maubet, Y.; Cristaldo, E.; Benítez, D.*

**Sistemática y Taxonomía**

- 42-54 Contribución al estudio de líquenes corticícolas del Parque Nacional Ybycuí, Departamento de Paraguari  
*Martínez Bernié, L.; Mereles, F.; Estrabou, C.*