

# Evaluación preliminar del efecto antimicrobiano y toxicidad aguda del extracto etanólico bruto de *Luehea divaricata* (Ka'a ovetĩ)

## Preliminary evaluation of the antimicrobial effect and acute toxicity of the ethanolic extract of *Luehea divaricata* (Ka'a ovetĩ)

Juliana Moura Mendes Arrúa<sup>1\*</sup>, Griselda Franco<sup>1</sup>, Pablo Alejandro Ibarra<sup>1</sup>, Tomás Rodrigo López Arias<sup>2</sup> <sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción. Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas. San Lorenzo, Paraguay. <sup>2</sup>Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay. \*Autor de correspondencia: jmendes@rec.una.py.

Recibido: noviembre 2020

Aceptado: diciembre 2020

Recibido en versión modificada: diciembre 2020

Mendes Arrúa, J. M., Franco, G., Ibarra, P. A. y López Arias, T. R. (2020). Evaluación preliminar del efecto antimicrobiano y toxicidad aguda del extracto etanólico bruto de *Luehea divaricata* (Ka'a ovetĩ). *Revista Investigaciones y Estudios – UNA*, 11(2), 78-86. <https://doi.org/10.47133/IEUNA2028>.

**Resumen.** El uso de plantas medicinales para el tratamiento y/o prevención de enfermedades es ampliamente difundido y utilizado hasta la actualidad en Paraguay. *Luehea divaricata*, conocida popularmente como *Ka'a ovetĩ* (en Paraguay), *açoita-cavalo* (en Brasil), *Francisco Alvarez* (en Argentina) ha sido utilizada para tratar afecciones de piel, diarreas, como antiséptico, expectorante, antirreumático, antitusígeno, antiasmático, antidiabético, carminativo entre otros. Considerando que muchas de esas plantas utilizadas de forma empírica, así como *L. divaricata*, no tienen sus efectos farmacológicos y tóxicos comprobados, el objetivo de este trabajo fue determinar el

efecto antimicrobiano y toxicidad aguda preliminar del extracto etanólico bruto (EEB) de las partes aéreas de *Luehea divaricata* colectado en Paraguay. Para evaluar el efecto antimicrobiano se utilizó la técnica de disco-difusión frente a *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y *Candida albicans* (ATCC 10231). Para evaluar la toxicidad aguda se utilizó neonatos de *Daphnia magna* Strauss, que fueron expuestos a seis concentraciones entre 1 y 1.000 mg.L<sup>-1</sup> del extracto etanólico de *Luehea divaricata* y después de 48 horas se determinó la concentración letal 50 % (CL50). El EEB de *L. divaricata* presentó efecto inhibitorio en *C. albicans* y *S. typhimurium*, sin embargo, nula actividad frente a *Escherichia coli*. La CL50 del extracto en estudio fue superior a 1.000 mg.L<sup>-1</sup>. Siendo así se considera que el EEB de las partes aéreas de *L. divaricata* presenta potencial antimicrobiano y baja toxicidad, y puede ser

objeto de más estudios acerca de sus efectos biológicos.

**Palabras clave.** *Daphnia magna*, antibacteriano, antifúngico, bioensayo, baja toxicidad.

**Abstract.** The use of medicinal plants for the treatment and/or prevention of diseases is widely spread and used until today in Paraguay. *Luehea divaricata*, popularly known as *ka'a ovetĩ* (in Paraguay), *açoita-cavalo* (in Brazil), *Francisco Alvarez* (in Argentina) has been used to treat skin conditions, diarrhea, as an antiseptic, expectorant, antitussive, antirheumatic, antiasthmatic, antidiabetic, carminative and others. Considering that many of those plants used in an empirical way, as well as *L. divaricata*, do not have their pharmacological and toxic effects proved, the objective of this work was to determine the antimicrobial effect and preliminary acute toxicity of the ethanolic extract from the aerial parts of *Luehea divaricata* collected in Paraguay. To evaluate the antimicrobial effect, the technique of the disc diffusion assay was used against *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) and *Candida albicans* (ATCC 10231). To evaluate the acute toxicity, the *Daphnia magna* Strauss neonates was used, which were exposed to six concentrations between 1 and 1.000 mg.L<sup>-1</sup> of ethanolic extract from *Luehea divaricata* (EELd) and after 48 hours, the LC50 was determined. The ethanolic extract of *L. divaricata* showed an inhibitory effect on *C. albicans* and *S. typhimurium*, however, no activity against *Escherichia coli*. The LC50 of

the EELd was higher than 1.000 mg.L<sup>-1</sup>. Thus, it is considered that EELd of the aerial parts of *L. divaricata* has antimicrobial potential and low toxic effect, and it can be the object of further studies about its biological effects.

**Keywords.** *Daphnia magna*, antibacterial, antifungal, bioassay, low toxicity.

## INTRODUCCIÓN

Paraguay tiene una cultura fuertemente influenciada por las tradiciones guaraníes, que son muy bien preservadas (MAG-DIA/FAO, 2008; Fogel et al., 2016). Una tradición muy importante es el uso de plantas con fines medicinales, cuyos usos van desde el consumo diario asociado con las bebidas tradicionales a base de yerba mate (*Ilex paraguariensis*), mate y tereré, como también en el tratamiento de enfermedades (MAG-DIA/FAO, 2008; Noelli, 1998).

Entre la vasta lista de plantas medicinales utilizada en Paraguay está *Luehea divaricata* Mart., conocida popularmente como *ka'a ovetĩ*, “*Francisco Alvarez*” y *ka'a ovetĩ pytã*. Es un árbol de gran porte, de la familia Malvacea, nativa de América. En la medicina popular se utiliza la corteza y las hojas por su efecto antiinflamatorio, antidiarreico, antiséptico, expectorante, depurativo entre otros. (Calixto-Júnior et al., 2016; Fogel et al., 2016; Pin et al., 2009; Instituto de Botánica Darwinion, 2020).

Su distribución es amplia a nivel regional, se encuentra en Paraguay, Brasil, Uruguay, Argentina, Bolivia y Perú, se reportan problemas con relación a la correcta

identificación botánica asociada al nombre popular, en razón que dentro del género *Luehea*, hay algunas especies que están muy relacionadas entre sí enfatizando la variabilidad fenotípica de esta hierba (Degen et al., 2005).

Cuando se analizaron las hojas de *L. divaricata* se determinó que están constituidas principalmente por flavonoides, saponinas y catequina (taninos condensados), así como por alcaloides, aceites fijos, antocianinas, carotenoides y polisacáridos en menores concentraciones, entre otros (Bortoluzzi et al., 2002; Tanaka et al., 2005). Entre sus actividades farmacológicas comprobadas se relata el efecto antibacteriano frente a bacterias Gram-positivas: *S. aureus* (ATCC 6538p) y *S. epidermidis* (ATCC 12228) y Gram negativas *Escherichia coli* (ATCC 11103) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) (Müller, 2006), como también inhibición del desarrollo de hongos dermatofitos, pero ineficiente en el control de hongos del género *Aspergillus* (Zacchino et al., 1998).

Los efectos tóxicos de extractos vegetales pueden ser evaluado de forma preliminar por medio de ensayos de toxicidad aguda con microcrustáceos como *Daphnia magna* y *Artemia salina*, por su correlación con vertebrados y además sirven como indicadores ecotoxicidad de dichos extractos como contaminantes de cuerpos acuáticos (Aoki et al., 2005; Almeida Alves et al., 2000; Martínez et al., 2010; Xu et al., 2020).

Guilhermino et al. (2000), al ensayar 54 sustancias químicas frente *D. magna* y ratas para determinar la CL50 a 24 y 48 horas demostraron una correlación positiva entre los

dos modelos ensayados, inclusive determinaron que los bioensayos con *D. magna* son más específicos y sensibles como indicador de la toxicidad aguda cuando son comparados con el modelo con mamíferos.

Existen evidencias controversiales con respecto al efecto genotóxico del extracto acuoso de *L. divaricata*, que variaron según el modelo utilizado: se ha reportado ausencia de efectos genotóxicos en células de médula ósea de ratones, tratados con el extracto acuoso por 48 horas (Segovia-Corrales et al., 2017; Segovia et al., 2016), tampoco se visualizó efecto genotóxico en cepas de *Drosophila melanogaster* (Felício et al., 2011), sin embargo, se mostró genotoxicidad en una cepa de *Salmonella typhimurium*, y esto es atribuido a la presencia de taninos y flavonas que presentan un patrón de hidroxilación que pueden causar daños en la estructura de ADN (Vargas et al., 1991).

Teniendo en cuenta el amplio uso popular con fines medicinales de esta planta en la región y las controversias con respecto al efecto tóxico del extracto obtenido de esta especie vegetal, se estableció el objetivo de evaluar los efectos biológicos del extracto etanólico bruto (EEB) de las partes aéreas de *Luehea divaricata* (*ka'a oveti*) colectado en Paraguay con un estudio preliminar de la actividad antimicrobiana y toxicidad aguda frente al microcrustáceo *Daphnia magna* y de esta forma sumar datos científicos a la etnofarmacología nacional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Especie vegetal.** El material vegetal

utilizado en el estudio fue cedido por la Dra. Alba Segovia (Segovia et al., 2016). El *voucher* del material colectado e identificado se encuentra depositado en el Herbario de Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN) de la Universidad Nacional de Asunción (UNA), bajo el código 02 de la autoría de Alba Segovia, identificado por la Lic. Biol. Bonifacia de Bertoni.

**Elaboración del extracto vegetal.** El material vegetal, partes aéreas de *L. divaricata*, fue secado en estufa con aire circulante a temperatura media de 40 °C durante 4 días.

Después de deshidratado, fue procesado con un molino mecánico, obteniendo 800 g de polvo. El polvo fue sometido a maceración exhaustiva en etanol absoluto y posteriormente el extracto fue concentrado con el rotaevaporador a temperatura media de 50 °C, y se obtuvo al final 82 g de extracto etanólico bruto (EEB) de *Luehea divaricata*.

**Ensayo de actividad antimicrobiana. Cultivo de microorganismos.** Los microorganismos ensayados fueron: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Candida albicans* (ATCC 10231), provenientes de la Colección de Cultivos de Microorganismos CCM-UNA, en CEMIT-DGICT-UNA. Las bacterias fueron incubadas en medio de cultivo Agar Muller Hinton (AMH) a 37 °C, mientras *C. albicans* fue incubada en Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) a 28 °C por 24 – 48 horas. Se prepararon suspensiones microbianas con solución salina estéril a 0,9 %, ajustando la turbidez al estándar 0,5 de la escala McFarland, que corresponde 1 x 10<sup>6</sup> Unidades Formadoras de Colonias –

UFC.mL<sup>-1</sup> de cultivo fúngico y 10<sup>8</sup> UFC de los cultivos bacterianos. (Clinical Laboratory Standards Institute [CLSI], 2008).

**Ensayo de sensibilidad antimicrobiana.** Para evaluar la actividad antimicrobiana del EEB de *L. divaricata* se utilizó la técnica de difusión en agar con discos de papel de filtro estéril (CLSI et al., 2008; Lima et al., 1993; Mendes et al., 2012). Se usó 20 mL de medio de cultivo ASD o AMH, fundido a 45 °C, que fue aseptícamente mezclado con 1 mL de la suspensión de microorganismos en placas petri de 90 mm x 15 mm. Después de la solidificación del medio, un disco de papel empapado con 10 µL del EEB de *L. divaricata* (5 mg.mL<sup>-1</sup>), previamente solubilizado con tween 80 a 10 %, fue colocado en la superficie del medio de cultivo, en el centro de la placa. Se incubó en las condiciones indicadas para cada microorganismo y, posteriormente, se realizó la lectura, registrando el diámetro de los halos de inhibición con el calibrador Vernier. Las pruebas se realizaron por triplicado. Se usó como control: los medios de cultivo sin inóculo microbiano, medio de cultivo solo con inóculo sin EEB y control del vehículo utilizado para solubilizar el extracto – agua estéril con tween 80 a 10 %. La actividad antimicrobiana del EEB de *L. divaricata* se consideró positiva cuando los halos de inhibición alcanzaron valores mayores o iguales a 10 mm de diámetro, por lo menos, en el 50 % de todas las cepas probadas. (Almeida Alves et al., 2000).

Las variables estudiadas fueron sometidas a análisis de variancia (ANOVA) seguido del test de comparación múltiple de Tukey 5 % de

significancia con el paquete estadístico *GraphPad Prism* versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA (www.graphpad.com).

**Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna* (Cladocera, Daphniidae).** Se determinó la toxicidad aguda del extracto etanólico bruto de *L. divaricata* por la inhibición en la movilidad-mortalidad del crustáceo *D. magna*, tras 24 y 48 horas de exposición, según el procedimiento establecido en la norma ISO 6341 (1996) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2002).

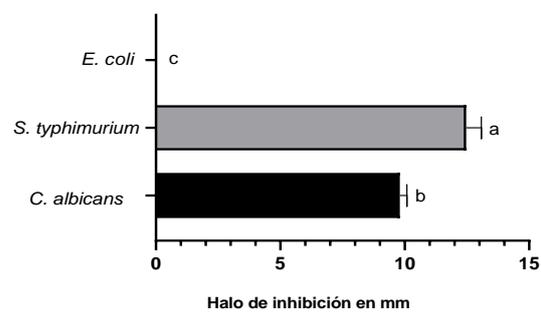
**Cultivo de *Daphnia magna*.** Los individuos utilizados para los bioensayos se mantuvieron en cultivos discontinuos a base de agua dura reconstituida (APHA, 1998), alimentadas con la microalga *Chlorella sp.* La microalga, a su vez, se mantuvo en medio de cultivo Bristol. Las condiciones de manteniendo antes y durante el bioensayo, en general fueron a un fotoperiodo de luz/oscuridad de 16/8 horas, a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C, pH 7-8, y una dureza de 160-180 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  el nivel de iluminación se mantuvo en a 1000 lux (Secretaría de Economía, 2010).

**Bioensayos con *D. magna*.** La prueba de toxicidad aguda del EEB de *L. divaricata* se evaluó con dos controles y 4 concentraciones (tratamientos) del EEB, a  $1.000 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $500 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $250 \text{ mg.L}^{-1}$ , y  $125 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente, en un Diseño de Bloques Completo al Azar (DBCA) de  $6 \times 3$ . Las diluciones fueron preparadas con agua dura reconstituida (APHA, 1998) y Tween, en concentraciones menores a 5 %. Por cada

tratamiento, se prepararon 3 réplicas, cada una con 20 mL de solución y 10 neonatos menores a 24 horas de nacidos. Como control positivo, se utilizó Dicromato de potasio y se realizó un único tratamiento, con tres réplicas, a una concentración de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de la sal, disuelta en agua dura reconstituida; por su parte control el negativo consistió en agua dura reconstituida y Tween al 5 %. Se realizaron dos lecturas, a las 24 y a las 48 horas. Posteriormente, como medida de punto final se determinó la Concentración letal 50 ( $\text{CL}_{50}$ ), por el método LOG-Probit.

## RESULTADOS

**Actividad antimicrobiana.** El EEB de *L. divaricata* presentó actividad antimicrobiana frente a *S. typhimurium* (ATCC 14028), con halo de inhibición  $12,5 \pm 0,61$  mm; mientras frente a *C. albicans* el halo fue de  $9,8 \pm 0,29$  mm, con diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ). No se observó halo de inhibición frente a *E. coli*, como se visualiza en la Figura 1.



**Figura 1.** Halos de inhibición en mm del extracto etanólico bruto (EEB) de *Luehea divaricata* frente a *C. albicans* (ATCC 10231); *S. typhimurium* (ATCC 14028) y *E. coli* (ATCC 8739). Las barras representan los halos de inhibición correspondiente a cada microorganismo. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes  $p < 0,05$  - test Tukey.

En los controles negativos no se visualizó crecimiento de microorganismos en las placas de Petri con medios de cultivo sin inóculo. En los controles de viabilidad antimicrobiana, en las placas con inóculo sin aplicación del extracto de *L. divaricata*, se observó crecimiento normal de las bacterias y levadura. En el control del vehículo (agua estéril con tween 80 a 10 %) tampoco se observó interferencia en el crecimiento normal de los microorganismos en estudio.

#### Bioensayos con *Daphnia magna*.

Inicialmente se realizó una lectura preliminar a las 24 horas (Tabla 1), en este análisis previo, apenas se produjo una mortalidad del 10 % en la concentración correspondiente a 1.000 mg.L<sup>-1</sup>.

La lectura final, realizada a las 48 horas evidenció mayor mortalidad en 3 concentraciones diferentes. Sin embargo, la mortalidad no permitió determinar directamente la CL<sub>50</sub>, considerando que, a la máxima concentración, no se alcanzó el 50 % de mortalidad requerido. Sin embargo, se realizó una regresión lineal a partir de la ecuación obtenida por el método LOG-Probit ( $y=2,393x - 2,7248$ ) con el fin de estimar la CL<sub>50</sub>, este método arrojó un valor de 1.689 mg.L<sup>-1</sup>. El control frente al Dicromato de potasio a la concentración de 2 mg.L<sup>-1</sup>, arrojó como

resultado mortalidad del 100 % de los neonatos a las 24 horas, en las tres réplicas, confirmándose la sensibilidad de la población de cladóceros.

Por su parte, en el control negativo a base de agua dura reconstituida y Tween al 5 %, no produjo inmovilidad en los organismos, con un 100 % de supervivencia al final del bioensayo. De esta forma los controles validaron el bioensayo de toxicidad aguda.

## DISCUSIÓN

El extracto etanólico bruto de *L. divaricata* presentó nula actividad antibacteriana frente a *E. coli* coincidiendo con el estudio de Coelho de Souza et al. (2004), que evaluó el potencial antimicrobiano por el método de disco-difusión de varias plantas utilizadas en la medicina popular en el Rio Grande do Sul-Brasil, donde el extracto metanólico bruto de *L. divaricata* no inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, así como el de *C. albicans*, discerniendo el caso con nuestros resultados, donde sí se observó halo de inhibición frente a *C. albicans*.

Entre los tres microorganismos ensayados, el EEB de *L. divaricata* presentó efecto inhibitorio significativo ( $p < 0,05$ ) frente a

Tabla 1. Resultados de los ensayos de toxicidad del EEB de *L. divaricata* frente a *Daphnia magna* a las 24 y 48 horas.

Tratamientos	Concentración (mg.L <sup>-1</sup> ) de EEB	Número de neonatos por réplica	Mortalidad a las 24 horas (%)	Mortalidad a las 48 horas (%)
1	1.000	10	10	33
2	500	10	0	7
3	250	10	0	3
4	125	10	0	0
Control negativo	0	10	0	0
Control positivo	2	10	10	10

bacterias *E. coli* y *S. typhi*, que son Gram negativas como las bacterias ensayada en este estudio.

Tanaka y colaboradores (2005) determinaron la composición química de *Luehea divaricata* MART. y que el extracto metanólico bruto de *L. divaricata* presenta moderada actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (CMI = 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y nula actividad antifúngica frente los hongos ensayados *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, sin embargo, en este mismo trabajo se aisló e identificó triterpenos y flavonoides de otras fracciones de los extractos, que son conocidos por presentar actividad antimicrobiana frente hongos y bacterias, y que probablemente no se plasmó en los ensayos con los extractos brutos y fracciones debido la complejidad de sustancias que presentan, que pueden inhibir o enmascarar los efectos biológicos de interés.

Siendo así sería interesante ensayar fracciones menos polares de los extractos de *L. divaricata*, como acetato-de-etila o butanólica para evaluar si los efectos antimicrobianos serán más pronunciados, considerando que en estas fases se suelen extraer los flavonoides, cumarinas y otros metabolitos secundarios.

*Daphnia magna* es el microcrustáceo comúnmente utilizado en bioensayos ecotoxicológicos, por ser de fácil establecimiento en el laboratorio y corto ciclo vital (Xu et al., 2020). En nuestro trabajo no fue posible determinar la concentración capaz de causar efecto letal en 50 % de la población (CL<sub>50</sub>), con el cálculo de regresión lineal se estimó en 1.689  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , siendo así denominado

de baja toxicidad el extracto etanólico bruto de *L. divaricata*, considerando que la CL<sub>50</sub> estimada es superior a 1.000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Agencia Ambiental de los Estados Unidos; Guilhermino et al., 2000). Dichos resultados pueden ser extrapolables a modelos de toxicidad con vertebrados, esto considerando la especificidad y sensibilidad del test con *Daphnia magna* (Aoki M et al., 2005; Guilhermino et al., 2000).

Con los resultados obtenidos se concluye que el extracto etanólico bruto de las partes aéreas de *L. divaricata* tiene potencial antimicrobiano, con baja toxicidad para microcrustáceos, ampliando el conocimiento acerca del potencial farmacológico de *Luehea*.

Dicho trabajo sirve de premisa para la continuidad de estudios de la elucidación de los efectos antimicrobianos y constitución fitoquímica de *L. divaricata* en Paraguay.

## AGRADECIMIENTO

Agradecimiento especial a la Dra. Alba Segovia, del laboratorio de Biotecnología de CEMIT – DGICT – UNA, por ceder el material vegetal utilizado para elaboración del extracto para la investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida Alves, T. M. de, Fonseca Silva, A., Brandão, M., Mesquita Grandi, T. S., Smânia, E. D. F. A., Smânia, A., & Zani, C. L. (2000). Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(3), 367–373. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762000000300012>
- American Public Health Association [APHA]. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th edition.
- Aoki M., K., Encarnación-Dimayuga, R. y Cortés A. A. R., . (2005). Evaluación toxicológica de productos

- naturales usando microtécnicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36(1), 11–17.
- Bortoluzzi, R. C., Walker, C. I. B. & Manfron, M. P. (2002). Análise química qualitativa e morfo-histológica de *Luehea divaricata* Mart. In XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil.
- Calixto-Júnior, J. T., Morais, S. M. de, Colares, A. V. & Coutinho, H. D. M. (2016). The Genus *Luehea* (Malvaceae-Tiliaceae): Review about Chemical and Pharmacological Aspects. *Journal of Pharmaceutics*, 2016(2), 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/1368971>
- Clinical Laboratory Standards Institute [CLSI]. (2008). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. OMS. M2-A8, 23 (1), 1–58.
- Coelho de Souza, G., Haas, A. P. S., Von-Poser, G. L., Schapoval, E. E. S. & Elisabetsky, E. (2004). Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(1), 135–143.
- Degen, R., Soria, N., Ortiz, M. y Basualdo, I. (2005). Problemática de nombres comunes de plantas medicinales comercializadas en Paraguay Medicinal plants marketed in Paraguay: Problematic of folk names. *Dominguezia*, 21(1), 11–16.
- Drosophila melanogaster*: SMART / wing. Genetics and Molecular Research, 10(1), 16–24. <https://doi.org/10.4238/vol10-1gmr982>
- Felício, L. P., Silva, E. M., Ribeiro, V., Miranda, C. T., & Vieira, I. L. B. F. (2011). Mutagenic potential and modulatory effects of the medicinal plant *Luehea divaricata* (Malvaceae) in somatic cells of
- Fogel, R., Céspedes, C., López, L. & Valdez, S. (2016). *Propiedades medicinales de plantas. Conocimiento tradicional y patentes*. CONACYT.
- Guilhermino, L., Diamantino, T., Carolina Silva, M. & Soares, A. M. V. M. (2000). Acute Toxicity Test with *Daphnia magna*: An Alternative to Mammals in the Prescreening of Chemical Toxicity? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46(3), 357–362. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1916>
- Instituto de Botánica Darwinion (2020). Flora del conosur: Catálogo de las plantas vasculares. IBODA, CONICET. <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=divaricata&genero=Luehea&espod=25095>
- Internacional Organization for Standardization. (1996). *ISO 6341. Calidad del agua. Determinación de la inhibición de la movilidad de Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) Ensayo de toxicidad aguda*. Norma Europea. Versión Española. Comité Europeo de Normalización. (CEN).
- Lima, E. O., Gompertz, O. F., Giesbrecht, A. M. & Paulo, M. Q. (1993). In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses*, 36, 333–336.
- MAG-DIA/FAO. (2008). *Informe nacional sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación - Paraguay*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección de Investigación Agraria. 104 p. <http://www.fao.org/3/i1500e/Paraguay.pdf>
- Martínez, S., Vela, A., Botero, A., Arandia, F. y Mollinedo, P. (2010). Nuevo Micro-Bioensayo de Ecotoxicidad de Extractos Acuáticos de Plantas Medicinales sobre *Daphnia magna* sp. *Revista Boliviana de Química*, 27(1), 29–32. [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci\\_isoref&pid=S0250-54602010000100005&lng=es](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_isoref&pid=S0250-54602010000100005&lng=es)
- Mendes, J. M., Sarmiento Guerra, F. Q., Oliveira Pereira, F. de, Pereira de Sousa, J., Nogueira Trajano, V., & Oliveira Lima, E. de. (2012). Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(3), 208–217. <http://www.indi.usach.cl/ojs/index.php/blacpma/article/view/621>
- Montovani, P., Júnior, A. Moraes, A. J. D., Fiorentini, F. é Meiners, C. C. (2009). Atividade Antimicrobiana Do Extrato de Açoiça-cavalo (*Luehea* sp.). *Revista Brasileira de Agroecologia*, 4(2), 3731–3735.
- Müller, J. D. E. B. (2006). Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antinociceptiva das folhas da. UFSM, Santa Maria, Brazil.
- Noelli, F. S. (1998). Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia Guarani através de informações históricas. *Diálogos*, 02, 177–199. <https://doi.org/10.4025/dialogos.v2i1.328>
- Pin, A., González, G., Marín, G., Céspedes, G., Cretton, S., Christen, P. y Roguet, D. (2009). *Plantas medicinales del Jardín Botánico de Asunción*. Proyecto etnobotánica paraguaya. 441 p.
- Secretaría de Economía. (2010). *NMX-AA-087-SCFI-2010. Norma Mexicana de Análisis de Agua y Evaluación de Toxicidad Aguda con Daphnia magna. Straus (Cladocera, Crustacea)*. (p. 39). Secretaría de Economía Estado Unidos de México.
- Segovia, E. A., Arrúa, R. A., Barrozo, N. C., Duré, R. D., Nakayama, H. D. & Peralta, I. (2016). Evaluación de los efectos mutagénicos/antimutagénicos de *Luehea divaricata* en ratones. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 14(3), 102–106. [https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014\(03\)102-106](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014(03)102-106)
- Segovia-Corales, E. A. L., Nakayama, H. D., Duré, R. D., & Ibarra, P. A. (2017). Estudios del potencial tóxico

- in vivo de *Luehea divaricata* (Ka'á Ovetî O Ka'á Ovetî Pytâ). *Investigaciones y Estudios de La UNA*, 10(1), 95–101.
- Tanaka, J. C. A., Silva, C. C. da, Dias Filho, B. P., Nakamura, C. V., Carvalho, J. E. de & Foglio, M. A. (2005). Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Química Nova*, 28(5), 834–837. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000500020>.
- United States Environmental Protection Agency [EPA]. (2002). OCSPP 850.1010. *Ecological Effects Test Guidelines: Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids*. United States Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (7101).
- Vargas, V. M., Guidobono, R. R. & Henriques, J. A. (1991). Genotoxicity of plant extracts. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 86 (2), 67–70. [10.1590/s0074-02761991000600017](https://doi.org/10.1590/s0074-02761991000600017).
- Xu, R. R., Pei, Z. T., Wang, W. Q., Zhang, M., Zhang, L. L., Zhang, J., Wang, W. Q., Sun, L. W. & Zhang, Y. M. (2020). Assessment of biological toxicity and ecological safety for urban black-odor river remediation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3). <https://doi.org/10.3390/ijerph17031025>.
- Zacchino, S., Santecchia, C., López, S., Gattuso, S., Muñoz, J. de D., Cruaños, A., Vivot, E., Cruaños, M. del C., Salinas, A., Ruiz, R. E. de & Ruiz, S. (1998). In vitro antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from the Argentine flora. *Phytomedicine*, 5(5), 389–395. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(98\)80022-6](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(98)80022-6).