

## **Antioxidantes y porfirinas de *Adesmia boronioides*, *Larrea divaricata* y *Atriplex lampa* cultivadas *in vitro***

### **Antioxidants and porphyrin from *in vitro* cultures of *Adesmia boronioides*, *Larrea divaricata* and *Atriplex lampa***

Diego Estomba <sup>1,2</sup>

Hernán Mattes Fernandez <sup>2</sup>

Ana María Stella <sup>1</sup>

Originales: Recepción: 29/04/2009 - Aceptación: 15/08/2009

#### **RESUMEN**

Los polifenoles están involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta, en la actividad antioxidante, con un significado evolutivo. En la región patagónica existen plantas nativas de interés medicinal muy valoradas por la herbolaria tradicional de la zona. Se estudió actividad antioxidante y pigmentos en *Adesmia boronioides*, *Larrea divaricata* y *Atriplex lampa* (plántulas enteras, 60 días) micropropagados a partir de semillas estériles, cultivadas en MS suplementado con 6-bencil-amino-purina (2219  $\mu\text{M}$ ), ácido naftalén-acético (0,053  $\mu\text{M}$ ), 45  $\mu\text{moles fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 16h/8h luz:oscuridad, 22-24°C, subcultivo: 20 días. *A. boronioides* presentó entre 1,7 y 3,7 veces mayor contenido de porfirinas respecto de los otros cultivos. Se observó una baja cantidad de clorofila total con disminución de clorofila *a* a expensas de la *b* (clorofila *a/b*:2,98). La actividad de catalasa (EC1.11.1.6) fue la menor de los tres cultivos. El mayor contenido de clorofilas fue encontrado en *L. divaricata* con un alto contenido de clorofila *a* (clorofila *a/b*:21,04) y tuvo 2 a 13 veces más antocianinas que los otros cultivos. *A. lampa* presentó baja cantidad de clorofila (clorofila

#### **ABSTRACT**

Polyphenols are involved in defense against UV-radiation as well as in antioxidant activity. There are many native plants from Patagonia empirically used with therapeutic goals. In order to study their antioxidant activity and pigments, three native patagonic species were cultured *in vitro*: *Adesmia boronioides*, *Larrea divaricata* and *Atriplex lampa*. Seedlings obtained from sterile seeds were micropropagated for 60 days in MS medium + (2219  $\mu\text{M}$ ) 6-bencil amine purine-(0.053  $\mu\text{M}$ ) naftalen acetic acid, with a luminic intensity of 45  $\mu\text{mol fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 16:8 light: darkness, 22-24°C, subcultured every 20 days. *A. boronioides* showed 1.7 and 3.7 times more porphyrin than the other cultures. A low level of total and *a/b* chlorophyll ratio (2.98) was observed and catalase activity (EC 1.11.1.6) was the lowest. The highest amount of chlorophyll was found in *L. divaricata*, with a high content of chlorophyll *a* (chlorophyll *a/b* ratio:21.04) and 2 to 13 times as much anthocyanins as the other cultures. *A. lampa* showed 4 to 6 times more polyphenols and catalase activity was 5 to 20 times higher than in the other cultures.

1 Laboratorio de Ecoporfirinas. Dpto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, CONICET. Int. Güiraldes 2620, Pabellón II, piso 4. Buenos Aires, Argentina. C1428EAH. anamariastella@ecoporfirinas.com.ar

2 Laboratorio de Propagación Vegetativa. Asentamiento Universitario de San Martín de los Andes. Universidad Nacional del Comahue. Pasaje de la Paz 235. (8370) San Martín de los Andes. Neuquén. Argentina.

a/b:8,53); 4 a 6 veces más polifenoles y 5 a 20 veces mayor actividad de catalasa, respecto de los otros cultivos. Los resultados indican la posibilidad de aplicar estos cultivos *in vitro* como fuente de metabolitos bioactivos.

These results show that *in vitro* cultures of *Adesmia boronioides*, *Larrea divaricata* and *Atriplex lampa* can be used as source of bioactive metabolites.

### Palabras clave

polifenol • catalasa • antocianina • plantas patagónicas • metabolitos bioactivos

### Keywords

polyphenol • catalase • anthocyanin • patagonic plants • bioactive metabolites

## INTRODUCCIÓN

En la región patagónica existen plantas nativas de considerable interés etnobotánico, valoradas por la herbolaria de los pueblos originarios de la zona (etnia mapuche especialmente), cuyo uso fue transmitido empíricamente en el marco del saber popular de la región (1).

El riesgo de pérdida de las especies vegetales patagónicas, constatado tanto a nivel cultural como ecológico, constituye una importante motivación para su conservación, investigación y eventual domesticación (3, 20). En este marco, resulta de interés la micropropagación *in vitro*, técnica que permite obtener plantas sanas, libres de contaminantes y con altos niveles de multiplicación, lo que aporta a la conservación de la especie (12).

A su vez, el creciente desarrollo de la biotecnología ha centrado su interés en el estudio de los metabolitos bioactivos. Parte importante de estos últimos son los llamados "metabolitos secundarios". Estos metabolitos pueden ser una fuente natural de antioxidantes para la industria alimentaria como se ha propuesto en plantas de Córdoba (Argentina) (4). También pueden ser compuestos tóxicos o repelentes para insectos y herbívoros, vinculados a una función de defensa de la planta y frecuentemente presentan actividad farmacológica útil para el hombre (16). Entre ellos están los polifenoles, involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta, hecho al que se le ha asignado además un significado evolutivo (8, 21, 27). Desde un punto de vista ecofisiológico, la síntesis de metabolitos secundarios está sujeta a un limitado número de factores ambientales, entre ellos el agua, la luz y la disponibilidad de nutrientes. Existen evidencias de que el estrés abiótico controlado puede favorecer la biosíntesis de metabolitos secundarios. En ese sentido, el cultivo *in vitro*, al posibilitar la manipulación de las condiciones ambientales, es una alternativa muy promisoría para la producción masiva de los mismos (18, 31, 33, 34).

Si bien bajo condiciones de crecimiento normal la producción de radicales libres se mantiene baja, su producción es estimulada en la mayoría de las situaciones de estrés que interrumpen la homeostasis celular. El cultivo *in vitro* puede representar una fuente de estrés y, como tal, podría alterar el metabolismo (en particular el de porfirinas), modificar el contenido de clorofilas, aumentar los radicales libres y llevar a

una disminución de las defensas antioxidantes tales como el contenido de antocianinas, polifenoles y la actividad específica de enzimas antioxidantes como la catalasa (2, 11).

La síntesis de las porfirinas ocurre a través de una ruta común, a partir de moléculas simples (2). Los productos finales se diferencian por presentar sustituyentes del anillo de diferente naturaleza y puntos de ramificación. Las clorofilas, esenciales para el metabolismo de las plantas verdes son, al igual que el hemo y el sirohemo (grupos prostéticos de las nitrito y sulfito reductasas), el grupo cromóforo de los fitocromos y los grupos prostéticos de las enzimas antioxidantes, porfirinas (2, 11, 30).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad antioxidante de tres especies nativas patagónicas, de interés aromático o medicinal, cultivadas *in vitro*:

- a) *Adesmia boronioides* (Leguminosae), arbusto aromático, de hojas resinosas, presente desde el sur de Mendoza hasta Santa Cruz, Argentina (10, 17, 31).
- b) *Larrea divaricata* (Zygophyllaceae), arbusto aromático de tallo leñoso y hojas bifoliadas, difundido desde México hasta la Patagonia (Chubut, Argentina) (24).
- c) *Atriplex lampa* (Chenopodiaceae), arbusto de hojas de color ceniciento que habita en zonas áridas, desde Córdoba hasta el norte de Santa Cruz, Argentina, utilizado como planta forrajera (26). Además, se completó el estudio de pigmentos (clorofilas y porfirinas) en las tres especies nativas patagónicas, para comprobar el estado fisiológico del cultivo *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*A. boronioides*, *L. divaricata* y *A. lampa* fueron cultivadas *in vitro* en el Laboratorio de Propagación Vegetativa del Asentamiento Universitario de San Martín de los Andes, Universidad Nacional del Comahue, a partir de semillas suministradas por la Cátedra de Botánica General de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue. Las semillas de *A. boronioides* y *L. divaricata* se esterilizaron con hipoclorito de sodio (20%) (inmersión repetida de las semillas durante 10, 5, 5 y 5 minutos) y lavado intensivo con agua destilada estéril. *A. lampa* necesitó el mismo número de inmersiones con menor concentración de hipoclorito de sodio (4%) para su esterilización. Se sembró, cada semilla, sobre 30 ml de medio semisólido (25) suplementado con 6 -bencil-amino-purina (2219  $\mu\text{M}$ ) y ácido naftalén acético (0,053  $\mu\text{M}$ ), sacarosa (30 g/l), Agar-agar (7 g/l), previamente esterilizado en autoclave a 120°C, 1 atm de presión, durante 15 minutos), en frasco de vidrio (145 ml). Las plántulas fueron incubadas en cámara de cultivo bajo luz fluorescente (45  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a 22-24°C (fotoperíodo de 16 horas-luz / 8 horas-oscuridad). Los subcultivos se realizaron cada 20 días. Las plántulas fueron examinadas diariamente durante 60 días.

Todas las determinaciones bioquímicas se realizaron sobre la totalidad de la plántula cortada con bisturí estéril y machacada en mortero. A partir de 0,20  $\pm$  0,05 g de plántulas (de 30 y 60 días) de *A. boronioides*, *L. divaricata* y *A. lampa* se realizó la determinación de clorofilas por el método de Lichtenthaler y Wellburn (22), porfirinas según la metodología de Divo de César *et al.* (11) y proteínas totales de acuerdo

con Bradford (6), usando como estándar suero fetal bovino. Para la determinación de antocianinas y polifenoles, a partir de  $0,50 \pm 0,06$  g de plántulas de 60 días de *A. boronioides*, *L. divaricata* y *A. lampa* se procedió de acuerdo con Stella *et al.* (29) empleando el reactivo de Folin - Ciocalteau y solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , usando ácido gálico como estándar de polifenoles. Las antocianinas se cuantificaron por pH diferencial según la técnica descrita por Benvenuti *et al.* (3), Sellapan *et al.* (28) y López Agüero *et al.* (23). En ambos casos se midió la absorbancia empleando un espectrofómetro Beckman serie D500. La actividad de catalasa (EC 1.11.1.6) se realizó de acuerdo con Brees y Sizer (7). El extracto enzimático de *A. boronioides*, *L. divaricata* o *A. lampa* crecidas durante 60 días, se obtuvo a partir del homogenato de 10000 xg del cultivo ( $0,10 \pm 0,07$  g) previamente machacado con mortero y buffer 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,5, en una relación 1:60 (p:v). La actividad de catalasa se midió por la caída en la absorción a 240 nm de 0,8 ml de agua oxigenada (20 mM, pH 7,0) a 25°C, empleando un coeficiente de extinción molar  $4,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  de acuerdo con Chance *et al.* (9). La actividad de catalasa fue expresada como  $\mu\text{mol(U)}/\text{mg}$  proteínas .

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con las repeticiones correspondientes en cada caso ( $n=3$ ). Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y para detectar diferencias entre tratamientos y entre diferentes tiempos se usó la prueba de Tukey HDS ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

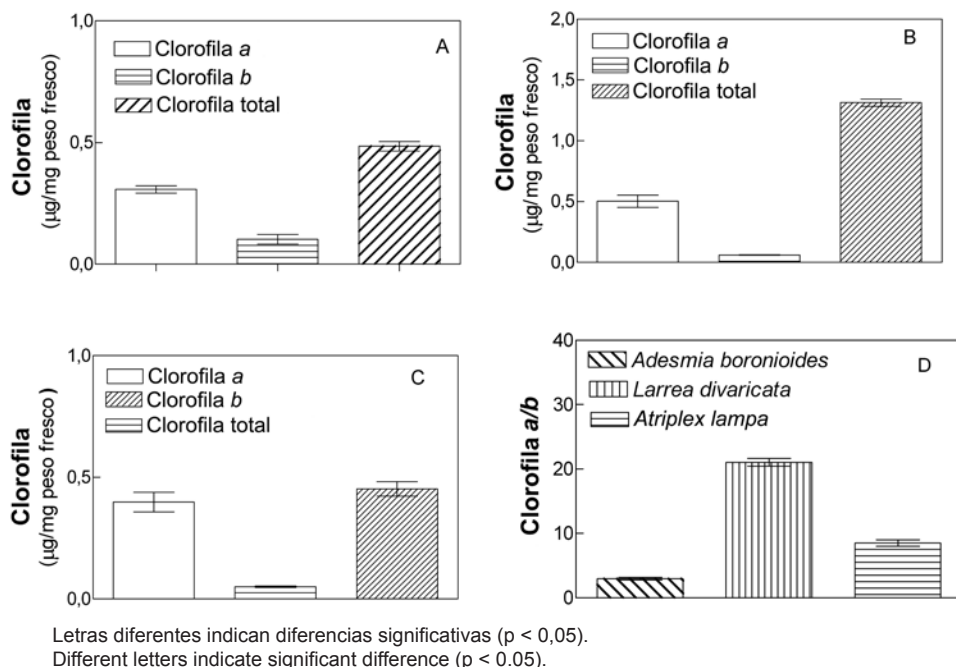
Con el interés de obtener plántulas sanas *in vitro* para una rápida multiplicación (12) a través de la micropropagación es que se determinó en las tres especies el contenido de clorofilas *a* y *b*, porfirinas y proteínas a 30 y 60 días. Un desorden fisiológico común en la propagación *in vitro* es la vitrificación o hiperhidricidad, la cual resulta en alteraciones morfológicas, anatómicas y bioquímicas en las plántulas tales como hojas quebradizas, traslúcidas y arrugadas acompañadas con una disminución de clorofilas y de la relación clorofila *a/b* (11,15). Las plántulas no mostraron signos morfológicos de vitrificación durante los 60 días de cultivo. La relación porfirinas/proteínas totales a los 30 días de cultivo *in vitro*: *A. boronioides*: 0,827, *L. divaricata*: 0,188 y *A. lampa*: 0,09, y la de clorofila *a/b* para: *A. boronioides*: 3,0, *L. divaricata*: 21,3 y *A. lampa*: 8,02, fue similar a los 60 días (tabla y figura 1, pág. 139).

**Tabla.** Contenido de porfirinas y proteínas de *Adesmia boronioides* (A), *Larrea divaricata* (B) y *Atriplex lampa* (C); plántulas cultivadas *in vitro* de 60 días.

**Table.** Porphyrin and protein content from *Adesmia boronioides* (A), *Larrea divaricata* (B) and *Atriplex lampa* (C); seedlings cultured *in vitro* during 60 days.

| Cultivo | Porfirinas ( $\mu\text{g/g}$ PF) | Proteínas ( $\text{mg/g}$ PF) |
|---------|----------------------------------|-------------------------------|
| A       | $5,898 \pm 0,505$ a              | $7,133 \pm 0,037$ c           |
| B       | $1,636 \pm 0,497$ c              | $8,657 \pm 0,335$ b           |
| C       | $3,527 \pm 0,307$ b              | $38,905 \pm 0,099$ a          |

PF = peso fresco. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).  
Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

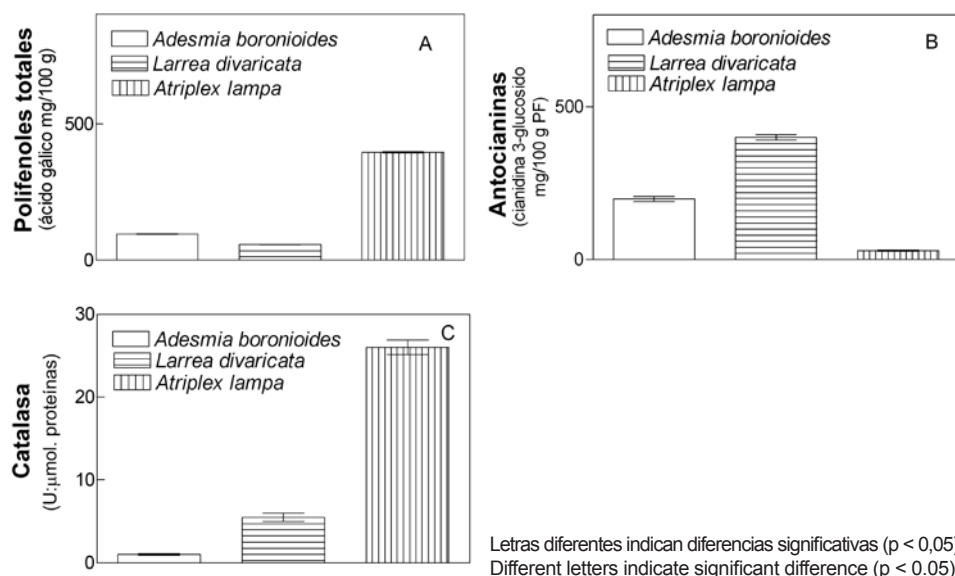


**Figura 1.** Contenido de clorofilas de *A. boronioides* (A), *L. divaricata* (B) y *A. lampa* (C). Relación clorofila a/b de *A. boronioides*, *L. divaricata* y *A. lampa* (D); plántulas cultivadas *in vitro* durante 60 días.

**Figure 1.** Chlorophyll content from *A. boronioides* (A), *L. divaricata* (B) and *A. lampa* (C). Chlorophyll (a/b) ratio from *A. boronioides*, *L. divaricata* and *A. lampa* (D); seedlings cultured *in vitro* during 60 days.

A partir de estas investigaciones se exploró el potencial bioquímico de *A. boronioides*, *L. divaricata* y *A. lampa*. Para ello se realizó un estudio descriptivo y comparativo, en cuanto a pigmentos y antioxidantes, en las tres especies crecidas durante 60 días. *A. boronioides* presentó entre 1,7 y 3,7 veces mayor contenido de porfirinas, respecto de *L. divaricata* y *A. lampa*, mientras que esta última fue la que presentó el mayor contenido de proteínas (tabla, pág. 138). Si bien la cantidad de porfirinas es elevada, *A. boronioides* mostró baja cantidad de clorofila total (figura 1A). Este resultado se debería a la disminución de clorofila a a expensas de la b (figura 1D). Por otro lado, si bien el contenido de porfirinas de *L. divaricata* fue el menor de las tres especies, el de clorofilas totales y la relación clorofila a/b fue la mayor entre las tres especies (figuras 1B y 1D). En cuanto a *A. lampa*, la relación clorofila a/b fue intermedia entre las otras dos especies (figuras 1C y 1D).

*A. lampa* presentó un nivel entre 4 y 6 veces más alto de polifenoles totales, y también 5 a 20 veces mayor actividad de catalasa respecto de los otros dos cultivos, mientras que *L. divaricata* tuvo 2 a 13 veces más antocianinas que los otros cultivos (figura 2A, 2B y 2C, pág. 140).



**Figura 2.** Contenido de polifenoles (A), antocianinas (B) y actividad de catalasa (C) de *A. boronioides*, *L. divaricata* y *A. lampa*: plántulas cultivadas *in vitro* durante 60 días.

**Figure 2.** Polyphenols and anthocyanin content, catalase activity from *A. boronioides*, *L. divaricata* and *A. lampa*, seedlings cultured *in vitro* during 60 days.

Estos resultados podrían explicar el empleo popular (13,19) de *Adesmia boronioides* como antirreumático y cosmético para el cabello (17), de *Larrea divaricata* en alteraciones dermatológicas y reumatológicas (24), y de *Atriplex lampa* como astringente, digestivo y antirreumático (26).

El consumo de alimentos con altos contenidos de antioxidantes, tales como los polifenoles, está siendo ampliamente utilizado en la prevención de enfermedades crónicas y en la disminución de inflamaciones. La utilidad de los compuestos fenólicos en tratamientos médicos se basa en su capacidad antioxidante, anticarcinogénica o antimutagénica y antiinflamatoria (14). La capacidad antioxidante en cuanto a la concentración de polifenoles totales presentes en las tres especies patagónicas *A. boronioides*, *L. divaricata* y *A. lampa* cultivadas *in vitro* es comparable, y en algunos casos mayor, a las observadas en arándanos y frambuesas (géneros *Vaccinium* y *Rubus*), frutos del bosque comestibles ampliamente utilizados por sus propiedades antioxidantes (3), con alto potencial nutraceutico, que al igual que las especies patagónicas han demostrando tener propiedades fisiológicas beneficiosas para la salud humana, ya sea en la prevención de enfermedades tales como infecciones urinarias o inflamaciones oculares (5, 32).



## CONCLUSIÓN

Los estudios realizados en cultivos *in vitro* de las especies nativas patagónicas *Adesmia boronioides*, *Larrea divaricata* y *Atriplex lampa* presentan un punto de partida en la obtención de material vegetal sobre el cual sería posible trabajar como fuente de compuestos que lo caracterizan como alimento nutracéutico, entendiéndose como tal cualquier sustancia considerada alimento o parte de un alimento que provee beneficios a la salud, incluyendo la prevención de ciertas enfermedades.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alarcón, A. M.; Astudillo, P.; Barrios, S.; Rivas, E. 2004. Política de Salud Intercultural: Perspectiva de usuarios mapuches y equipos de salud en la IX región, Chile. *Rev. Méd. Chile* 132: 1109-1114.
2. Beale, S. I. 1994. Biosynthesis of cyanobacterial tetrapyrrole pigments : hemes, chlorophylls, and phycobilins. In: Bryant, D. A. (ed.) *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer academic publishers. Holanda. p. 519-558.
3. Benvenuti, S. ; Pellati, F. ; Melegari, M. ; Bertelli, D. 2004. Polyphenols, antocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *J. Food. Scien.*, 69: 164-169.
4. Borneo, R.; León, A. E.; Aguirre, A.; Ribotta, P.; Cantero, J. J. 2009. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their *in vitro* testing in a model food system. *Food Chemistry* 112(3): 664-670.
5. Botto, H.; Neuzillet, Y. 2010 Effectiveness of a cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) preparation in reducing asymptomatic bacteriuria in patients with an ileal enterocystoplasty. *Scand J. Urol. Nephrol.* 44(3): 165-168.
6. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
7. Brees, R.; Sizer, I. 1979. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195: 133-140.
8. Bryant, J. P.; Stuart Chapin III, F.; Klein, D. R. 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* 40(3): 357-368.
9. Chance, B. H.; Sies, H.; Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.
10. Dimitri, M. 1974. Pequeña Flora Ilustrada de los Parques Nacionales Andino-Patagónicos. *Anales de Parques Nacionales*, Buenos Aires. Tomo XIII: 1-122.
11. Divo de Sésar, M.; Vilella, F.; Melito, V.; Kato, A.; Stella, A. M. 1999. Changes in porphyrins and chlorophylls during the development of hiperhydricity in micropropagated shoots of *Lupinus polyphyllus*. *Int. J. Exp. Bot. (Phyton)* 64: 111-117.
12. Dobránszki, J.; Teixeira da Silva, J. A. 2010. Micropropagation of apple - A review. *Biotechnol Adv.* Feb 25. [Epub ahead of print].
13. Estomba, D. A.; Lozada, M.; Ladio, A.; Weigandt, M. 2004. Utilización de plantas para afecciones de la piel en una comunidad mapuche del sudoeste de Neuquén. *Revista Argentina de Dermatología.* 85: 100-106.
14. Fraternali, D.; Giamperi, L.; Bucchini, A.; Sestili, P.; Paolillo, M.; Ricci, D. 2009. *Prunus spinosa* fresh fruit juice: antioxidant activity in cell-free and cellular systems. *Nat. Prod. Commun.* 4(12): 1665-1670.

15. Hatanaka, R.; Sugawara, Y. 2010 Development of desiccation tolerance and vitrification by preculture treatment in suspension-cultured cells of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Planta*. 231(4): 965-976.
16. Herms, D. A.; Mattson, W. J. 1992. The Dilemma of Plants: to Grow or Defend. *Q. Rev. Biol.* 67(3): 283-335.
17. Kutschker, A.; Menoyo, H.; Hechem, V. 2002. Plantas medicinales de uso popular en comunidades del oeste de Chubut. Chubut (Esquel): INTA, E.E.A. p. 1-139.
18. Kyte, L. 1990. Plants from test tubes. An Introduction to Micropropagation. Portland, Oregon. Timber press. 160 p.
19. Ladio, A. H.; Lozada, M. 2003. Comparison of wild edible plant diversity and foraging strategies in two aboriginal communities of northwestern Patagonia. *Biodiversity and Conservation* 12, 937-951.
20. \_\_\_\_\_; Lozada, M. 2004. Patterns of use and knowledge of wild edible plants in distinct ecological environments: a case study of a Mapuche community from Northwestern Patagonia. *Biodiversity and Conservation* 13, 1153-1173.
21. Les, D. H.; Sheridan, D. J. 1990. Biochemical Heterophyly and Flavonoid Evolution in North American *Potamogeton* (Potamogetonaceae). *Amer. J. Bot.* 77(4): 453-465.
22. Lichtenthaler, H. K.; Wellburn, A. R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 591-592.
23. López Agüero, L.; Divo de Sésar, M.; Pizzorno, M.; Vilela, V.; Stella, A. M. 2006. Utilización de extractos de *Avena sativa* L. en dermatitis. *Revista Argentina de Dermatología* 87: 100-105.
24. Lourteig, A. 1988. Zygophyllaceae. In: M. N. Correa (dir). Flora Patagónica. Parte V - Dicotyledones dialipétalas (Oxalidaceae a Cornaceae). Colección científica del INTA. Buenos Aires. p. 50-54.
25. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
26. Ramírez, C.; Beloso, C. Usos tradicionales de las plantas en la meseta patagónica. Jardín Botánico de la Patagonia Extraandina. CENPAT-CONICET - ICBG (Internacional Cooperative Biodiversity Group). Dirección de Impresiones Oficiales de la Provincia de Chubut. 51 p.
27. Rozema, J.; Van de Staaij, J.; Björn, L. O.; Caldwell, M. 1997. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Tree*, 12(1): 22-28.
28. Sellapan, S.; Akoh, C. C.; Krewer, G. 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric Food Chem.* 50(8): 2432-2438.
29. Stella, A. M.; Mattes Fernández, H.; Estomba, D.; Drago, H.; Mansilla, E. 2007. Dermis acelular porcina (*Sus scrofa*) cargada con antioxidantes de *Larrea divaricata*. *Revista Argentina de Dermatología* 88: 236-239.
30. Thomasz, L.; Aran, M.; Pizarro, R. A.; Ibáñez, J.; Pisarev, M. A.; Converso, D.; Juvenal, G. J.; Krawiec, L. 2007 Inhibition of peroxidase and catalase activities and modulation of hydrogen peroxide level by inositol phosphoglycan-like compounds. *Horm. Metab. Res.* 39(1): 14-19.
31. Ulibarri, E.; Burkart, A. 2000. Sinopsis de las especies de *Adesmia* (*Leguminosae*, *Adesmieae*) de la Argentina. *Darwiniana*, 38(1-2): 59-126.
32. Yao, N.; Lan, F.; He, R. R.; Kurihara, H. 2010. Protective Effects of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extract against Endotoxin-Induced Uveitis in Mice. *J. Agric. Food Chem.* 58(8): 4731-4736.
33. Zavala, J. A.; Ravetta, D. A. 2001. Allocation of photoassimilates to biomass, resin and carbohydrates in *Grindelia chiloensis* as affected by light intensity. *Field Crop Res.* 69: 143-149.
34. \_\_\_\_\_; Ravetta, D. A. 2001. The effect of irrigation regime on biomass and resin production in *Grindelia chiloensis*. *Field Crops Res.* 69: 227-236.