

Efecto de plantas comerciales de uso medicinal sobre la actividad del complemento de suero de tortuga (*Chelonoidis chilensis*: Testudinidae)

Castro, Juan F.¹; Nora B. Muruaga²

¹ Instituto de Fisiología Animal, Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina.

² Herbario Fanerogámico, Fundación Miguel Lillo.

Autor correspondiente: felipecastrobiologo@gmail.com

► **Resumen** — Castro, Juan F.; Nora B. Muruaga. 2015. "Efecto de plantas comerciales de uso medicinal sobre la actividad del complemento de suero de tortuga (*Chelonoidis chilensis*: Testudinidae)". *Lilloa* 52 (1). El objetivo de este trabajo consistió en determinar el efecto *in vitro* de 27 plantas medicinales comercializadas en San Miguel de Tucumán sobre un modelo experimental. Este modelo se basa en la actividad lítica espontánea que tiene la vía alterna del sistema de complemento del suero de tortuga sobre eritrocitos de mamíferos. Se utilizaron plantas medicinales de autenticidad comprobada en forma de infusión. Los resultados mostraron que la mayor parte (15) de las plantas probadas, inhiben la hemólisis, algunas (2) no tienen efecto y varias (10) lo aumentan. Los controles demostraron que la infusión de las plantas no tuvieron efectos líticos *per se* sobre los eritrocitos. Los experimentos sugieren que la acción de los componentes de las plantas se ejerce sobre la parte final de la cascada lítica.

Palabras clave: Complemento; hemólisis; plantas; tortuga.

► **Abstract** — Castro, Juan F.; Nora B. Muruaga. 2015. "Effect of commercial plants for medicinal use on the activity of complement of turtle serum (*Chelonoidis chilensis*: Testudinidae)". *Lilloa* 52 (1). The aim of this work was determine the *in vitro* effect that, in an experimental model, have 27 medicinal plants commercialized in San Miguel de Tucumán. This model is based on the spontaneous lysis activity that turtle blood serum alternative pathway of complement system has over mammalian erythrocytes. Medicinal plants were used as infusion. The results showed that most (15) of the tested plants inhibited hemolysis; some (2) had no effect and several (10) increased it. The controls showed that the plants infusion had no lytic effect on erythrocytes *per se*. Experiments suggest that the action of the vegetal components is exerted on the last steps of the lytic cascade.

Keywords: Complement; hemolysis; plants; turtle.

INTRODUCCIÓN

Desde que existen registros históricos, y seguramente desde antes, en muchos lugares del mundo se usaron diferentes compuestos activos presentes en las plantas para curar enfermedades. El cono Sur de América no es una excepción en este aspecto. Dichos compuestos activos, en la mayoría de los casos, fueron posteriormente aislados y hoy juegan un papel trascendental en la industria farmacológica, biomédica, y alimenticia (Alonso, 2007). La literatura sobre el tema en los as-

pectos históricos y culturales es amplia y variada (Tsirkin, 1985; Makrides, 1998; Sadr Lahijani *et al.*, 2006; Ndhlala *et al.*, 2009; Molaes y Ladio, 2009). El enfoque al que queremos aproximarnos corresponde a las relaciones entre las plantas medicinales y la actividad del sistema del complemento.

Se conoce que los mecanismos de defensa contra los organismos patógenos en los vertebrados incluyen actividades citolíticas que se encuentran en la sangre y secreciones de estos animales y que está a cargo del mencionado sistema.

La activación del complemento puede iniciarse por tres vías: la vía clásica, la vía

alternativa y la vía de las lectinas (Alsenz *et al.*, 1992). La vía clásica se activa por la unión antígeno-anticuerpo, mientras que la vía alternativa lo hace a partir de productos bacterianos. La vía de las lectinas se activa por estos compuestos y transcurre en forma similar a la vía clásica (Regueiro y López Larrea, 1998). Estas vías confluyen en un punto donde el factor C5 se transforma en C5b, lo que permite, en uno y otro caso, entrar en la fase terminal o lítica que conduce a la lisis celular o bacteriana.

A partir de trabajos previos se sabe que en el suero sanguíneo de peces (Suner y Tort, 1994), de anuros (Fernández, 1986), de ofidios (Fernández y Saad de Schoos, 1990) y de tortugas (Castro y Fernández, 2009), se encuentra actividad del sistema de complemento capaz de lisar eritrocitos de mamíferos a través de la vía alterna, la cual no necesita de la presencia de anticuerpos para su actividad.

Por otra parte y estrechamente vinculado con los ensayos sobre los mecanismos de acción de las plantas medicinales, se encuentra el tema de la identificación de las especies vegetales a utilizar. Este es un aspecto que necesita mucha precisión, dada la importancia que tiene para la salud el grado de autenticidad de las plantas medicinales que se comercializan en herboristerías como productos no sujetos a control. Éstas se expenden como, por ejemplo, mezclas de hojas, trozos de tallos, cortezas de tallos, flores, inflorescencias y frutos, y están rotuladas, en general, con su nombre vulgar; en muy pocos casos contienen el nombre científico. La identificación de las plantas constituyó la parte inicial del presente estudio, ya que algunas plantas tienen semejanza tanto en su denominación vulgar como en sus caracteres morfológicos, por lo que dan lugar a la adulteración o sustitución de especies.

El objetivo de este trabajo es poner a prueba el efecto de componentes de plantas utilizadas corrientemente en medicina popular sobre la actividad del sistema de complemento (en su vía de activación alternativa sobre eritrocitos humanos) del quelonio *Chelonoidis chilensis* Gray (Testudinidae-Testudines).

En este sentido, la utilización de un modelo experimental que incluya un mecanismo espontáneo de lisis sobre eritrocitos heterólogos constituye una ventaja práctica y de gran simplicidad para probar el efecto *in vitro* de las plantas medicinales sobre un mecanismo, como el del complemento, que es bastante complejo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suero de tortuga.— Se usaron tortugas pertenecientes a la Reserva Experimental de Horco Molle de la Universidad Nacional de Tucumán. La sangre se extrajo de la vena yugular por punción en individuos previamente anestesiados con Ketamina [2-(2- clorofenil)-2-(metilamino) ciclohexano], (20 mg por kilo de animal). La sangre se colectó sin anticoagulantes. Se separó el coágulo por centrifugación y el suero se conservó a -18 °C hasta su utilización.

Glóbulos rojos humanos.— Se extrajo sangre humana con heparina SOBRIUS (5000 UI/ ml) como anticoagulante en una concentración de 1/10. Se centrifugó 10 minutos a baja velocidad y se tomaron los glóbulos rojos, con los cuales, luego de lavarlos 3 veces con buffer fosfato salino (PBS), se realizó una suspensión al 5 % en buffer Complemento.

Buffers utilizados.— PBS (buffer fosfato salino): NaCl 6,8 g/l, NaHPO₄ 1,4 g/l, KH₂PO₄ 0,43 g/l. Buffer Complemento: NaCl 140 mM, Tris (tris-hidroximetilaminometano) 10 mM, CaCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 0,1 mM. Buffer EDTA: NaCl 140 mM, Tris 10 mM, EDTA (etilendiamino-tetraacético) 5 mM.

Plantas medicinales.— Identificación: Se seleccionaron para este trabajo 27 muestras por ser las más utilizadas popularmente por sus efectos antiinflamatorios. Estas muestras fueron adquiridas en un comercio dedicado a la venta de plantas usadas corrientemente en la medicina popular en San Miguel de Tucumán (Cuadro 1). Para comprobar la autenticidad de las plantas medicinales se

estudiaron bajo microscopio estereoscópico las distintas partes del contenido de las muestras y se reconocieron características morfológicas (vegetativas y reproductivas) que permitieron identificar taxones tanto a nivel de género como de especie, debido a que las plantas contaron con órganos repro-

ductivos y vegetativos como los ejemplares de herbario. Se utilizó para los aspectos taxonómicos la siguiente bibliografía: Barboza *et al.* (2001); Bravo *et al.* (1983), Cabrera (1971); Digilio y Legname (1966); Keisling y Ferrari (2005); Ragonese y Covas (1945); Tolaba y Fabbroni (1998).

Cuadro 1. Listado de muestras comerciales de plantas utilizadas como antiinflamatorio en medicina popular. Mezcla (a): trozos de tallo, hoja y fruto (sin flor). Mezcla (b): trozos de corteza, trozos de tallo, hoja, fruto y flor o inflorescencia. (c): trozos de rama, hoja, fruto y flor.

Familias	Taxones	Nombres vulgares	Partes utilizadas
Acoraceae	<i>Acorus</i> sp.	Acoro	Rizoma
Anacardiaceae	<i>Schinus fasciculatus</i> (Griseb.) I.M. Johnst.	Molle	Mezcla (b)
Anacardiaceae	<i>Schinopsis lorentzii</i> (Griseb.) Engl.	Quebracho colorado	Corteza
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia elegans</i> Mast.	Mil hombres	Tallo
Asteraceae	<i>Ambrosia elatior</i> L.	Altamiza	Mezcla (c)
Asteraceae	<i>Senecio</i> sp.	Chachacoma	Mezcla (c)
Asteraceae	<i>Matricaria chamomilla</i> L. Phil.	Manzanilla	Mezcla (c)
Asteraceae	<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.	Marcela	Mezcla (c)
Brassicaceae	<i>Lepidium didymum</i> L.	Quimpe	Mezcla (c)
Cactaceae	<i>Tunilla</i> sp.	Flor cactus	Flor
Chenopodiaceae	<i>Atriplex</i> sp.	Cachiyuyo	Hoja
Fabaceae	<i>Erythrina</i> sp.	Ceibo	Corteza
Fabaceae	<i>Geoffroea decorticans</i> (Gilles ex Hook. & Arun.) Burkart	Chañar	Mezcla (b)
Fabaceae	<i>Lupinus</i> sp.	Lupines	Semillas
Fabaceae	<i>Bauhinia forficata</i> Link spp. pruinosa (Vogel) Fortunato & Wunderlin	Pezuña de vaca	Mezcla (b)
Ginkgoaceae	<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginco biloba	Mezcla (a)
Hamamelidaceae	<i>Hamamelis virginiana</i> L.	Hamamelis	Mezcla (c)
Lamiaceae	<i>Lavandula</i> sp.	Lavanda	Mezcla (c)
Lamiaceae	<i>Marrubium vulgare</i> L.	Marrubio	Mezcla (c)
Lamiaceae	<i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb.	Peperina	Mezcla (c)
Passifloraceae	<i>Passiflora</i> sp.	Pasionaria	Mezcla (c)
Plantaginaceae	<i>Plantago lanceolata</i> L.	Llantén	Mezcla (c)
Plumbaginaceae	<i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze	Guaycuru	Raíz
Polygonaceae	<i>Rumex pulcher</i> L.	Lengua de vaca	Mezcla (c)
Urticaceae	<i>Parietaria debilis</i> G. Forst.	Parietaria	Mezcla (c)
Verbenaceae	<i>Lippia turbinata</i> Griseb.	Poleo	Mezcla (c)
Zygophyllaceae	<i>Larrea divaricata</i> Cav.	Jarilla	Mezcla (a)

Preparación de las infusiones.— Se hicieron infusiones usando 2 g de cada hierba en 20 ml de agua corriente. Se llevó el agua hasta ebullición, se retiró de la fuente de calor y se le agregó la hierba previamente pesada. Se dejó reposar por 30 min y se separó la infusión usando papel de filtro. La muestra de la infusión así obtenida se utilizó en el día o se guardó a -10 °C hasta su utilización. Con todas las plantas analizadas se procedió de la misma manera y en ensayos por triplicado (Prabhakar *et al.*, 2006; Lizarraga *et al.*, 2012).

Actividad hemolítica del suero de tortuga.— En cada tubo se puso: 500 μ l de suero de tortuga al 10 % diluido en buffer complemento, más 200 μ l de la infusión determinada, y se llevó a 30 °C por 30 minutos a baño maría. A continuación se le agregó 100 μ l de la suspensión de eritrocitos humanos al 5 % y se llevó a 30 °C por 45 minutos. Posteriormente se le agregó 1,2 ml de buffer Complemento-EDTA, se centrifugó 10 minutos a 1500 rpm en una centrifuga ROLCO de mesa; se tomó el sobrenadante y se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro Zeltec ZL-5100. Para determinar la hemólisis espontánea, en tubos paralelos se pusieron 700 μ l de buffer Complemento y se llevó a 30 °C por 30 minutos a baño María, se le agregó 100 μ l de glóbulos rojos al 5 % y se incubó durante 45 minutos a 30 °C; luego de agregar 1,2 ml de buffer Complemento-EDTA frío se centrifugó y se leyó a 450 nm. En un tercer grupo de tubos se midió la hemólisis total para la cual se pusieron 700 μ l de tritón X-100 1/1000 y 100 μ l de eritrocitos al 5 %; después de centrifugar y luego de agregarle 1,8 ml de buffer Complemento-EDTA el sobrenadante se leyó a 450 nm. Un cuarto grupo de ensayos correspondió al control, consistente en comprobar si las infusiones solas (sin suero de tortuga) tenían actividad hemolítica.

El efecto inhibitor, determinado como porcentaje de la hemólisis original producida por el Complemento (medida como aumento de D.O. a 450 nm), es el cambio pro-

ducido por dos volumen de infusión más cinco volúmenes de suero de tortuga al 10 %, sobre un volumen de una suspensión de eritrocitos de mamíferos al 5 % en buffer Complemento. Para ser usado en este trabajo hemos designado como 1 (una) unidad de inhibición a una disminución de un 1 % en los valores de la hemólisis sin agregados.

Análisis estadístico:

El análisis de los resultados se llevó a cabo usando el programa Excell indicando coeficiente de variación.

RESULTADOS

Se seleccionaron 27 muestras por ser las más utilizadas popularmente en medicina por sus efectos antiinflamatorios.

Los resultados de la hemólisis con suero tratado con plantas fueron comparados con la hemólisis sin tratamiento. Se analizaron infusiones a partir de estas 27 muestras (Cuadro 1).

Dos infusiones de plantas medicinales inhibieron la actividad complementaria en más del 75 %: *Lepidium didymum* y *Rumex pulcher*; tres lo inhibieron entre un 75 % y un 50 %: *Acryrocline satuireioides*, *Marrubium vulgare* y *Senecio* sp. Por otro lado *Atriplex* sp., *Geoffroea decorticans*, *Acorus* sp., *Ambrosia elatior* y *Minthostachys mollis*, mostraron una actividad inhibitoria entre el 50 y el 25 %. En el caso de *Schinopsis lorenzii*, *Larrea divaricata*, *Passiflora* sp., *Bauhinia forficata* y *Plantago lanceolata*, mostraron un efecto inhibitorio menor al 25 %, pero siempre claramente diferente del testigo, la actividad natural del complemento. *Schinus fasciculatus* y *Parietaria debilis* no presentaron diferencia con respecto a la hemólisis sin tratamiento, es decir que los valores hemolíticos de estos ensayos fueron muy cercanos al 100 % original (Fig. 1). En 10 muestras se observó una actividad mayor al 100 %; es decir que no inhibieron, sino por el contrario, aumentaron el efecto hemolítico del suero sanguíneo de tortuga. Estas son: *Hamamelis virginiana*, *Erythrina* sp., *Ginkgo biloba*, *Lavandula* sp., *Matricaria*

chamomilla, Tunilla sp., Lupinus sp., Limonium brasiliense, Lippia turbinata, Aristolochia elegans (datos no mostrados).

Los controles de un posible efecto hemolítico propio demostraron que las infusiones de las plantas (sin suero de tortuga) no tuvieron efectos líticos sobre los eritrocitos.

DISCUSIÓN

La determinación taxonómica de las plantas medicinales, adquiridas en comercios de San Miguel de Tucumán, permitió evidenciar que, en muchos casos, las muestras contenían material insuficiente para su

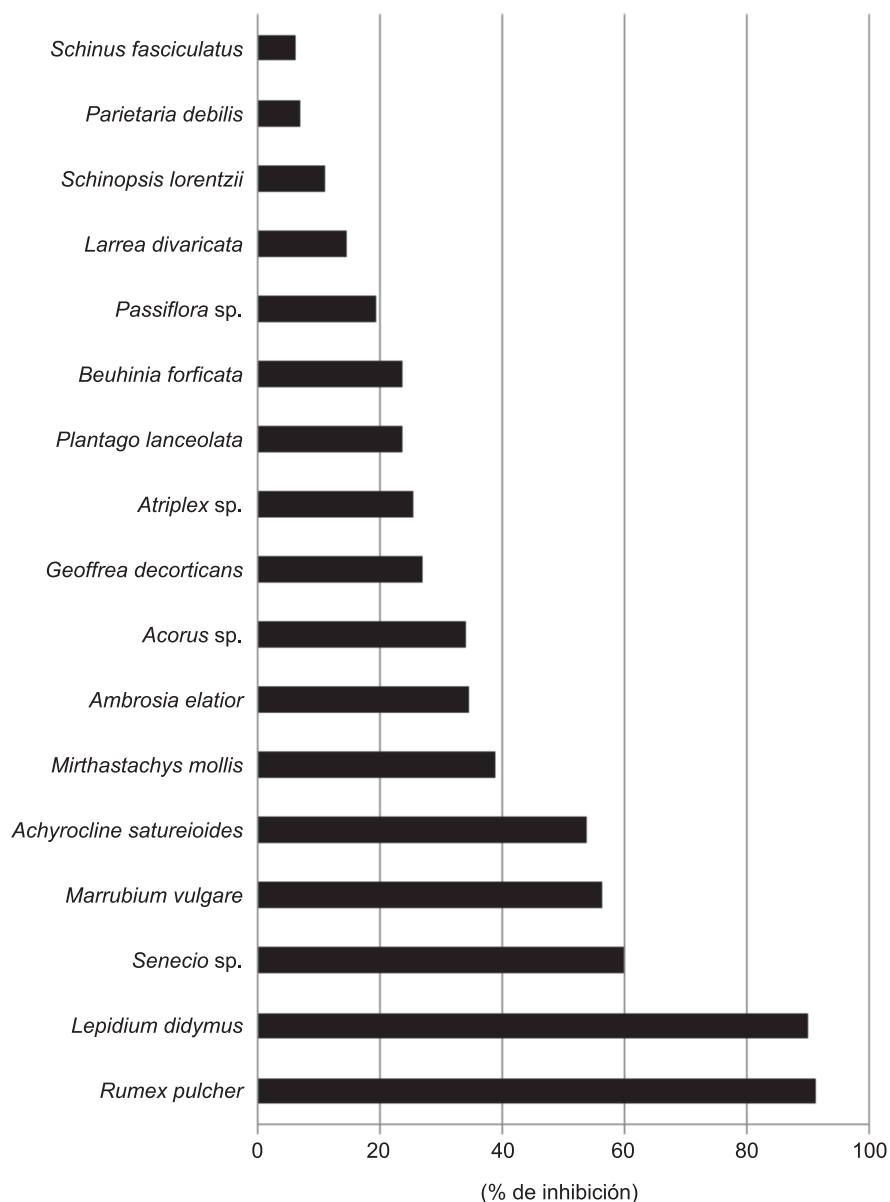


Fig. 1. Efecto inhibitorio de plantas medicinales sobre la actividad del complemento del suero sanguíneo de tortuga. Porcentaje de inhibición respecto a la lisis natural. En ninguna de las muestras la dispersión de los datos supera el 9,1 % de coeficiente de variación.

determinación taxonómica, por lo que en algunos casos sólo se pudo llegar a identificar a nivel de género. Solamente aquellas (27) por ser las más utilizadas popularmente por sus efectos antiinflamatorios, fueron utilizadas para este trabajo. Ello fue decidido debido a que los resultados de otras muestras que contenían más de una especie (productos botánicos no puros) no tendrían utilidad práctica, de acuerdo con el objetivo de este estudio, y su significado científico quedaría supeditado a análisis futuros.

En un trabajo reciente hemos descripto el efecto que el suero sanguíneo de tortuga tiene sobre eritrocitos de mamíferos (Castro y Fernández, 2009). Este efecto lítico corresponde a la activación del sistema de complemento del quelonio que es independiente de la presencia de anticuerpos y correspondería a la vía alternativa. Como modelo experimental el método es simple, rápido y de bajo costo. El hecho destacado en el presente trabajo es que numerosas plantas medicinales tienen efecto sobre este mecanismo lítico. Además de las plantas que no lo afectan, hemos observado que la mayoría (15) inhibe al sistema lítico, mientras que otras (10) aumentan la actividad lítica. Los resultados de los controles que se hicieron utilizando la infusión de las plantas, sin el agregado de suero de tortuga, demostraron que las infusiones no tienen actividad lítica.

Como consecuencia de lo anterior, se confirma que la actividad lítica del suero del reptil sobre los eritrocitos ensayados no se está ejerciendo en toda su capacidad en nuestro modelo. Esta actividad moderada es una ventaja para nuestros ensayos pues de otra manera no habríamos podido observar esta característica amplificadora del grupo de plantas. Si bien nuestros ensayos demuestran que el modelo experimental empleado utilizaría la vía alterna, los experimentos con las plantas podrían estar poniendo en evidencia una acción de los componentes vegetales que se ejercerían sobre la parte final, y común a las tres vías de activación del sistema de complemento. Creemos que las investigaciones en este campo pueden aclarar el efecto antiinflamatorio que se destaca en el

uso popular de estas plantas y que presentarían un efecto regulador sobre el sistema de complemento. A partir de este trabajo se propone comenzar con la búsqueda del componente o de los componentes responsables de tal actividad.

La relación entre las plantas medicinales de uso popular de la Argentina y patologías concretas está siendo exitosamente explorada en los últimos tiempos (Grau *et al.*, 2001; Aybar *et al.*, 2001; Genta *et al.*, 2009; McClatchey *et al.*, 2009; Pawlaczyk *et al.*, 2009; Zampini *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011; Scarpa, 2004; Barboza *et al.*, 2009), lo que prueba el interés y la importancia del conocimiento de los mecanismos a través de los cuales actúan las plantas medicinales.

Debemos mencionar que los resultados encontrados en nuestros ensayos vinculados a la actividad inhibitoria son coincidentes con las indicaciones usuales sobre la utilización de estas plantas en la medicina tradicional, que atribuyen a algunas de ellas efectos antiinflamatorios; lo cual abre un panorama promisorio para mayores estudios al respecto.

AGRADECIMIENTOS

A José Yapur por su colaboración en la adquisición de las muestras de suero de tortuga. A la Mag. Pilar Medina Pereyra y a la Bqca. María Eugenia Pérez por la lectura objetiva y sugerencias. Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo de la Fundación Miguel Lillo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso J. 2007. Fitofármacos y nutraceuticos. Editorial Corpus, Argentina, 1143 pp.
- Alsensz J., Avila D., Huemer H. P., Esparza I., Becherer J. D., Kinoshita T., Wang Y., Oppermann S., Lambris J. D. 1992. Phylogeny of the third component of complement C3: Analysis of the conservation of human CR1, CR2, H, and B binding sites, concanavalin A binding sites, and thiolester bond in the C3 from different species. *Developmental and Comparative Immunology* 16 (1): 63-76.
- Aybar M. J., Sánchez Riera A. N., Grau A., Sánchez S. S. 2001. Hypoglycemic effect of the water

- extract of *Smallantus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 74 (2): 125-132.
- Barboza G. E., Bonzani N., Filipa E. M., Luján M. C., Morero R., Bugatti M., Docolatti N., Ariza Espinar L. 2001. Atlas histo-morfológico de plantas de interés medicinal de uso corriente en Argentina. Museo Botánico Córdoba Serie Especial 1. Córdoba-Argentina, 212 pp.
- Barboza G. E., Cantero J. J., Núñez C., Pacciaroni A., Ariza Espinar L. 2009. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana* 34: 1-2.
- Bravo L., Cabrera A. L., Azcurra C., Deginani N., Fábris H. A., Kiesling R., Pérez R., Moreau A., Pontiroli A., Zuloaga F. O. 1983. Clethraceas a Solanaceas. En: Cabrera, A. Flora de la provincia de Jujuy. Colección Científica del I.N.T.A., Buenos Aires 13 (8): 505 pp.
- Cabrera A. L. 1971. Compositae. En: Correa, M. N. «Flora Patagónica». Colección Científica del I.N.T.A., Buenos Aires 8 (7): 451 pp.
- Castro F., Fernández F. M. 2009. Actividad del sistema de complemento y de lisozima en suero sanguíneo de tortuga *Chelonii chilensis* (Quelonia). *Acta Zoológica Lilloana* 53 (1-2): 57-63.
- Digilio A., Legname P. 1966. Los árboles indígenas de la provincia de Tucumán. *Ópera Lilloana* 15: 1-283.
- Fernández F. M. 1986. Actividad hemolítica y aglutinante natural en varias especies de anuros del noroeste argentino. *Acta Zoológica Lilloana* 38 (2): 211-221.
- Fernández F. M., Saad de Schoos S. 1990. Actividad hemolítica natural de *Waglerophis merremi* (Wagler) (Reptilia, Colubridae). *Acta Zoológica Lilloana* 39: 17-21.
- Genta S., Cabrera W., Habib N., Pons J., Carillo I. M., Grau A., Sánchez S. 2009. Yacon syrup. Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clinical Nutrition* 28 (2): 182-187.
- Grau A., Kortsarz A. M., Aybar M. J., Sánchez Riera A. N., Sánchez S. S. 2001. El retorno del yacón. *Ciencia Hoy* 11 (63): 24-31.
- Keisling R., Ferrari O. E. 2005. 100 cactus argentinos. Editorial Albatros, Argentina, 128 pp.
- Lima B., López S., Luna L., Agüero M. B., Aragón L., Tapia A., Zacchino S., López M. L., Zygadlo J., Feresin G. E. 2011. Essential oils of medicinal plants from the central andes of Argentina: chemical composition, and antifungal, antibacterial, and insect-repellent activities. *Chemistry Biodiversity* 8 (5): 924-936.
- Lizarraga E., Castro F., Fernández F., Lampasona M. P., Catalán C. A. N. 2012. Antioxidant, hemolytic and cytotoxic activities of *Senecio* species used in traditional medicine of northwestern Argentina. *Natura Product Communications* 7: 1-2.
- McClatchey W. C., Mahady G. B., Bennett B. C., Shiels L., Savo V. 2009. Ethnobotany as a pharmacological research tool and recent developments in CNS-active natural products from ethnobotanical sources. *Pharmacology & Therapeutics* 123 (2): 239-254.
- Makrides S. C. 1998. Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacological Reviews* 50 (1): 59-87.
- Molares S., Ladio A. 2009. Chemosensory perception and medicinal plants for digestive ailments in a Mapuche community in NW Patagonia, Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 123 (3): 397-406.
- Ndhlala A. R., Amoo S. O., Stafford G. I., Finnie J. F., Van Staden J. 2009. Antimicrobial, anti-inflammatory and mutagenic investigation of the South African tree aloe [*Aloe berberae*]. *Journal of Ethnopharmacology* 124 (3): 404-408.
- Pawlaczyk I., Czerchawski L., Pilecki W., Lamer-Zarawska E., Gancarz R. 2009. Polyphenolic-polysaccharide compounds from selected medicinal plants of *Asteraceae* and *Rosaceae* families: Chemical characterization and blood anticoagulant activity. *Carbohydrate Polymers* 77: 568-575.
- Prabhakara K. R., Veerasha V.P., Vipana K., Sudheera M., Priyadarsinib K. I., Satishc R. B. S. S., Unnikrishnan M. K. 2006. Bioactivity-guided fractionation of *Coronopus didymus*: A free radical scavenging perspective. *Phytomedicine* 13: 591-595.
- Ragonese A. E., Covas C. 1945. La flora halófila del sur de la Provincia de Santa Fe (Argentina). En: Burkart, A. *Darwiniana* 7 (1): 401-496.
- Regueiro J. R., López Larrea C. 1998. Inmunología: Biología y Patología del Sistema Inmune. Editorial Panamericana, España, 198 pp.
- Sadr Lahijani M. S., Raoof Kateb H. R., Heady R., Yazdani D. 2006. The effect of German chamomile (*Matricaria chamomilla*) extract and tea tree (*Melaleuca alternifolia* L.) oil used as irrigants on removal of smear layer: a scanning electron microscopy study. *International Endodontic Journal* 39: 190-198.
- Scarpa G. F. 2004. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. *Journal of Ethnopharmacology* 91 (1): 115-135.
- Suner O., Tort L. 1994. The Complement of the teleost fish *Sparus aurata*. *Annals of The New York Academy of Science* 712: 371-373.
- Tolaba J. A., Fabbroni M. 1998. Flora del Valle de Lerma. *Aportes Botánicos de Salta* 5 (5): 1-32.
- Tsirkin J. B. 1985. The phoenician civilization in roman Spain. *Gerión* 3: 245-270.
- Zampini I. C., Cuello S., Alberto M. R., Ordoñez R. M., D'Almeida R., Solorzano E., Isla M. I. 2009. Antimicrobial activity of selected plant species from «the Argentine Puna» against sensitive and multi-resistant bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* 124 (3): 499-505.