

Dinámica de polifenoles de “Cedrón” (*Aloysia citrodora* Palau -Verbenaceae-) en relación al desarrollo foliar

[Polyphenol dynamics on “cedrón” (*Aloysia citrodora* Palau -Verbenaceae-) according to leave development]

Rafael Alejandro RICCO*, Marcelo Luis WAGNER & Alberto Ángel GURNI

*Cátedra de Farmacobotánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
Junín 954 (1113) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. República Argentina
Contactos / Contacts: E-mail address: Rafael Alejandro RICCO raricco@ffvb.uba.ar*

Abstract

Leaf infusions from *Aloysia citrodora* Palau –Verbenaceae-, known as “cedrón” were analyzed in order to establish the possible influence of their development on polyphenols profile. Chromatographic fingerprints of infusions from young and full expanded leaves were performed and total phenols, total tannins, total flavonoids and total hydroxycinnamic acids were quantified. Young leaves had significative higher total phenols, total flavonoids and total hydroxycinnamic acids concentrations than full expanded leaves. This research suggest that the analyzed parameter should be considered when elaborating products from “cedrón” leaves, as the variation in compound concentration may translate in different biological activities.

Keywords: *Aloysia citrodora*; cedrón; flavonoids; hydroxycinnamic acids; polyphenols; tannins.

Resumen

Se analizaron las infusiones realizadas a partir de las hojas de *Aloysia citrodora* Palau –Verbenaceae-, conocida vulgarmente como “cedrón”, con el objeto de establecer la influencia del grado de desarrollo foliar en el perfil de polifenoles. Se obtuvieron los perfiles cromatográficos y se cuantificaron los fenoles totales, taninos totales, flavonoides totales y ácidos hidroxicinámicos totales provenientes de los extractos acuosos de las hojas jóvenes y adultas. Se observaron diferencias cuali-cuantitativas en el perfil de polifenoles cuando se comparan las hojas jóvenes con las hojas adultas. En las hojas jóvenes, las concentraciones de fenoles totales, flavonoides totales y ácidos hidroxicinámicos totales resultaron ser significativamente superiores a las determinadas en las hojas adultas. Los estudios realizados sugieren que la variable aquí analizada debe ser considerada al momento de elaborar productos en base a hojas de cedrón, dado que las diferentes concentraciones detectadas podrían traducirse en diferentes actividades biológicas.

Palabras Clave: ácidos hidroxicinámicos, *Aloysia citrodora*; cedrón; flavonoides; polifenoles; taninos.

Recibido | Received: 17 de Diciembre de 2010.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 20 de enero de 2011.

Publicado en línea | Published online: 30 de Enero de 2011.

Declaración de intereses | Declaration of interests: Subsidios UBA B120 y ANPCYT-PICT N° 38238.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: Rafael Alejandro RICCO, Marcelo Luis WAGNER, Alberto Ángel GURNI 2011. Dinámica de polifenoles de “Cedrón” (*Aloysia citrodora* Palau -Verbenaceae-) en relación al desarrollo foliar. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10(1): 67 – 74.

INTRODUCCIÓN

El empleo de plantas medicinales en la atención primaria de la salud es una constante en la vida del hombre.

En la Argentina, entre las especies vegetales más empleadas en el tratamiento de determinados desórdenes de la salud, se encuentra el “cedrón”. Denominado científicamente *Aloysia citrodora* Palau – Verbenaceae- (sinonimia: *Aloysia triphylla* (L’Hér.) Britton, *Lippia citrodora* Kunth, *Lippia triphylla* (L’Hér.) Kuntze) (Troncoso, 1974, 1979a, 1979b; Toursakissian, 1980; Pascual et al., 2001) es una especie nativa de América del Sur, que en la Argentina crece espontáneamente en Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, La Rioja, Salta, Santiago del Estero y Tucumán (Troncoso, 1974, 1979a, 1979b; Ratera y Ratera, 1980; Zuloaga y Morrone, 1999).

Se emplean principalmente las hojas, acompañadas o no de tallos jóvenes, bajo la forma de infusión y cocimiento (Hieronymus, 1882; Troncoso, 1979a; Ratera y Ratera, 1980) para el tratamiento de diversas dolencias, actuando fundamentalmente como digestivo (Botta, 1979; Troncoso, 1979a; Gupta, 1995; Lahitte et al., 1998; Pascual et al., 2001), antiespasmódico (Duke, 1985; Pascual et al., 2001) y carminativo (Toursakissian, 1980; Gupta, 1995; Lahitte et al., 1998), entre otros.

En lo que respecta a la composición química de las hojas, los trabajos realizados se centran principalmente en el análisis de los aceites esenciales (Bellakhdar et al., 1994; Carnat et al., 1995; Carnat et al., 1999; Pascual et al., 2001). También se ha determinado la presencia de compuestos polifenólicos derivados de ácidos hidroxicinámicos, taninos y flavonoides (Carnat et al., 1995; Carnat et al., 1999; Bilia et al., 2008).

Los polifenoles constituyen un grupo de compuestos que desempeñan una importante función en prácticamente todas las interacciones que una planta establece con su entorno (Haslam, 1988, 1989). Presentan un amplio rango de actividades biológicas, entre las que se pueden mencionar: hepatoprotectora, antiviral, antioxidante, antihipertensiva, antimicrobiana, entre otros (Middleton and Kandaswami, 1994; Yanagida et al., 1999).

Debido al amplio empleo del “cedrón” en la medicina popular y teniendo en cuenta la heterogeneidad que puede observarse en las muestras comerciales de esta especie (principalmente en lo que respecta al grado de desarrollo foliar), es necesario

evaluar como éste factor afecta a la dinámica de polifenoles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal (hojas) fue analizado teniendo en cuenta el grado de desarrollo (hojas jóvenes y adultas).

Se consideraron como hojas jóvenes aquellas con una longitud que no supera los 3 cm y como hojas adultas aquellas con una longitud promedio de 6 cm (material fresco en ambos casos).

Todos los materiales se encontraban en estado vegetativo al momento de la toma de las muestras.

El material vegetal se obtuvo de un cultivo controlado proveniente de la localidad de Barreal, Provincia de San Juan, República Argentina.

Material vegetal de referencia se encuentra depositado en el Museo de Farmacobotánica “Juan A. Domínguez” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA: Wagner, M.L. 1350 (BAF) y Wagner, M.L. 1351 (BAF).

Extracción

Se realizaron infusiones al 5% según la Farmacopea Nacional Argentina VI^o edición. Los extractos fueron filtrados por papel de filtro banda negra.

Fingerprint de polifenoles

Fue realizado por medio de cromatografías bidimensionales en capa delgada de celulosa (TLC), según metodología estándar (Mabry et al., 1970, Markham, 1982). Los sistemas de solventes fueron TBA (butanol terciario-ácido acético-agua, 3:1:1) para la primera dimensión y ácido acético 15% para la segunda dimensión.

Los cromatogramas se observaron a la luz UV 254 nm y 365 nm, antes y después de ser expuestos a vapores de amoníaco y revelados con el reactivo de productos naturales (NP 1% en etanol absoluto).

Análisis de flavonoides

El aislamiento de los compuestos principales se realizó mediante el empleo de TLC y HPTLC (cromatografía en capa delgada de alta resolución) de celulosa. Las fases móviles fueron: TBA, ácido acético 15% y agua.

Con el objeto de confirmar la identidad de los aglicones presentes, a una alícuota de cada compuesto

aislado se le adicionó una mezcla de HCl-EtOH (1:1) y se llevó a ebullición durante 4 horas en baño María. Se filtró y se realizó una partición líquido-líquido con acetato de etilo. Ésta fracción fue nuevamente analizada por TLC y HPTLC de celulosa en los sistemas de solventes Forestal (ácido acético-ácido clorhídrico-agua, 30:3:10), BAA (n-butanol-ácido acético-agua, 6:1:2) y CAA (cloroformo-ácido acético, 2:1, saturado con agua).

La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de los valores de R_f y de los espectros UV-visibles con compuestos de referencia y bibliografía específica.

Los compuestos aquí determinados concuerdan con aquellos previamente detectados para la especie (Carnat et al., 1995; Carnat et al., 1999; Bilia et al., 2008).

Análisis de ácidos hidroxicinámicos

El aislamiento de los compuestos principales se realizó a partir de las infusiones, mediante HPTLC de sílica gel 60, empleando como fase móvil acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-agua (10:1,1:1,1:2,5 v/v/v/v). Los cromatogramas se revelaron a la luz UV 254 nm y 365 nm y con el reactivo de productos naturales (NP) (Gafner et al., 2003).

La identificación se llevó a cabo por comparación de los valores de R_f y de los espectros UV-visibles con compuestos de referencia y bibliografía específica.

Cuantificación de fenoles totales

Fueron determinados mediante el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo con Makkar et al., 1993. Alícuotas (50 μ l) de los extractos fueron transferidas a tubos de ensayos y el volumen llevado a 500 μ l con agua desionizada. Se adicionaron a continuación 250 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,25 ml de solución acuosa de carbonato de sodio al 20%. Luego de 40 min la absorbancia fue medida a 725 nm.

Se realizó una curva de calibración con ácido tánico. El contenido de fenoles totales fue expresado como mg ácido tánico / g material seco. Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

Cuantificación de taninos totales

El contenido de taninos totales fue determinado por el procedimiento de Folin-Ciocalteu, luego de remover los taninos mediante su precipitación con solución de seroalbúmina bovina (BSA) (buffer

acetato 0,2 M pH 5,0; cloruro de sodio 0,17 M y 1,0 mg/ml de fracción V de BSA).

1 ml de solución de BSA fue adicionado a 1 ml de extracto. Luego de 15 min a temperatura ambiente, los tubos fueron centrifugados a 5000 g durante 10 min. Alícuotas del sobrenadante (50 μ l) fueron analizadas según el procedimiento arriba descrito. Los valores obtenidos fueron restados de los correspondientes a los fenoles totales obteniéndose el total de fenoles que se comportan como taninos (taninos totales).

El contenido de taninos totales fue expresado como mg ácido tánico / g material seco. Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

Cuantificación de flavonoides

Alícuotas de 0,1 ml de cada extracto fueron adicionadas a 1,4 ml de agua desionizada y 0,50 ml del reactivo de flavonoides (133 mg tricloruro de aluminio, 400 mg acetato de sodio en 100 ml de solvente constituido por 140 ml metanol, 50 ml agua, 10 ml ácido acético). Luego de 30 min a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a 430 nm (Maksimovic et al., 2005).

Se realizó una curva de calibración con rutina. El contenido de flavonoides fue expresado como mg rutina / g material seco. Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos totales

Se determinó mediante una modificación de la metodología descrita por Dao and Friedman, 1992.

Alícuotas de 50 μ l de cada extracto fueron llevadas a un volumen de 2 ml con etanol absoluto.

Se determinó la absorbancia a 328 nm. Se realizó una curva de calibración con ácido clorogénico. Los valores se expresaron como mg de ácido clorogénico / g material seco. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media \pm desvío estándar. Se consideraron diferencias significativas con $p < 0,05$. Se empleó el programa Graph Pad Prism®.

RESULTADOS

***Fingerprint* de polifenoles**

En la Figura 1 se muestran los perfiles de polifenoles foliares: se observan diferencias cualitativas cuando se comparan las hojas jóvenes con las hojas adultas.

Las infusiones de las hojas muestran un perfil de polifenoles caracterizado por la presencia de ácidos hidroxicinámicos (verbascósido como componente principal) (Tabla 1), como así también flavonoides (flavonas) mayoritariamente derivadas de luteolina. Estos compuestos forman un complejo coloreado naranja con el reactivo NP, lo que sugiere la presencia de un grupo ortodifenol en el anillo B del esqueleto flavonoídico. El estudio de los espectros UV-visible y

los valores de R_f obtenidos para el hidrolizado permiten determinar la presencia de luteolina (Tabla 2 y Figura 2). En menor medida se detectan compuestos que presentan un anillo B flavonoídico monohidroxilado (derivados de apigenina), de coloración amarilla con NP, cuyos espectros UV-visible y valores de R_f del hidrolizado demuestran la presencia de apigenina (Tabla 2 y Figura 3).

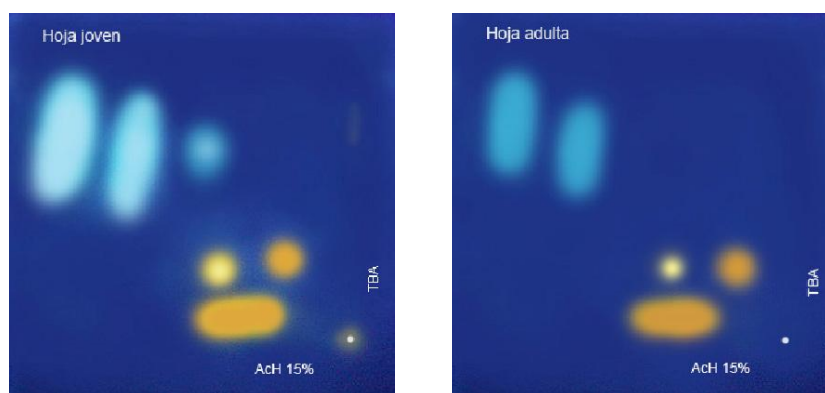


Figura 1: Perfil de polifenoles para las hojas jóvenes y adultas. Se observan dos grupos de compuestos principales, derivados de ácidos hidroxicinámicos (compuestos celestes) y derivados de flavonas (glicósidos de luteolina y apigenina, compuestos amarillo-anaranjados).

Compuesto	R_f (x 100)	Color Reactivo NP	λ máx. (nm)
	AcEt-Fórmico-Acético-Agua		
Verbascósido	57	Celeste brillante	251, 365

Tabla 1: R_f en TLC de Sílica Gel 60 y características fisicoquímicas para el compuesto Verbascósido.

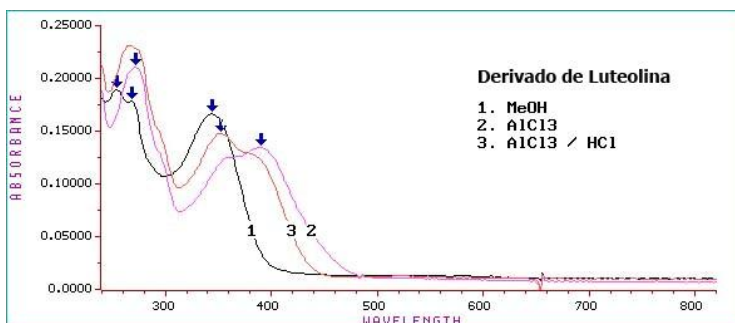


Figura 2: Espectros UV-visible para la flavona derivada de Luteolina. Se muestran los desplazamientos para el reactivo de AlCl₃ y AlCl₃/HCl.

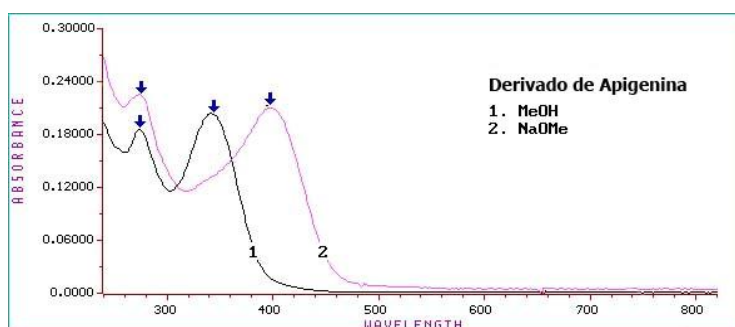


Figura 3: Espectros UV-visible para la flavona derivada de Apigenina. Se muestran los desplazamientos para el reactivo metóxido de sodio (NaOMe).

Compuesto	R _f (x 100)			Color (Reactivo NP)	λ máx (nm)	Shift (Borato de sodio)
	Forestal	BAA	CAA			
Apigenina	85	90	60	Amarillo	269, 336	Negativo
Luteolina	65	80	25	Anaranjado	255, 268, 350	Positivo

Tabla 2: R_f en TLC de celulosa y características fisicoquímicas de los compuestos aislados a partir del hidrolizado.

Análisis cuantitativo

En la Tabla 3 se detallan los resultados del análisis de fenoles, taninos totales, flavonoides totales y ácidos hidroxycinámicos totales. En todos los casos, excepto

para los taninos, los extractos provenientes de las hojas jóvenes muestran una mayor concentración de los metabolitos analizados.

Muestra	Fenoles totales		Taninos totales		Flavonoides totales		Ác. hidroxicinámicos totales	
	mg	ácido tánico/g material seco	mg	ácido tánico/g material seco	mg	rutina/g material seco	mg	ácido clorogénico/g material seco
Hoja joven	50,02	± 3,84	15,90	± 1,85	24,91	± 1,90	35,01	± 2,84
Hoja adulta	26,43	± 2,49	16,12	± 1,60	20,51	± 1,15	19,72	± 1,72

Tabla 3: Cuantificación de fenoles, taninos, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos totales. Valores expresados como media ± (SD).

DISCUSIÓN

La concentración de compuestos fenólicos en especies vegetales puede variar, dentro de un mismo individuo, en respuesta a factores genéticos, ontogénicos, bióticos y abióticos, afectando de diversa manera a los diferentes órganos de la planta. En lo que respecta a las hojas, la regulación de la síntesis de compuestos fenólicos es una parte importante del desarrollo de dicho órgano. Por otro lado, el destino de los carbohidratos formados durante la fotosíntesis, parte de los cuales se emplearán estructuralmente (metabolismo primario) y parte en el metabolismo secundario, tendrán una gran influencia en la cantidad y calidad de los compuestos fenólicos producidos (Matsuki, 1996).

Los polifenoles aquí analizados comprenden en sus estructuras la presencia de restos fenilpropano (C6-C3), por lo que desde el punto de vista del modelo de competición de proteínas (PCM), la síntesis de fenilpropanoides (que emplea como precursor al aminoácido fenilalanina), compite directamente con la síntesis de proteínas y esto se verá reflejado en el crecimiento del vegetal (Jones and Hartley, 1999). Durante el crecimiento exponencial de la planta, la competición con la síntesis de proteínas puede mantener las concentraciones de algunos fenilpropanoides bajas. Sin embargo, la inducción de la síntesis fenólica por la luz ultravioleta (Strack, 1997; Lavola, 1998), como así también las diversas actividades fisiológicas mediadas por polifenoles, llevan a que las concentraciones de los compuestos fenólicos totales sean elevadas durante la formación del brote y durante la etapa de desarrollo temprano de las hojas. Posteriormente, durante el crecimiento tardío de la hoja, el aumento en materia seca daría lugar a un

efecto de dilución que disminuiría las concentraciones de los compuestos fenólicos (Jones and Hartley, 1999). Los principales polifenoles presentes en las hojas de “cedrón”, ácidos hidroxicinámicos y flavonoides (flavonas), presentaron la mayor acumulación en aquellas hojas que presentaban una alta tasa de crecimiento, es decir, en las hojas jóvenes. Los niveles de polifenoles decrecen rápidamente con la edad de la hoja, probablemente debido al proceso de dilución anteriormente mencionado.

Los resultados aquí obtenidos concuerdan con trabajos previos realizados sobre otras especies vegetales (Waterman and McKey, 1989; Riipi et al., 2002; Del Baño et al., 2003; Rugna et al., 2008), donde las hojas jóvenes presentan una mayor concentración de polifenoles respecto de las hojas adultas.

En nuestro estudio, la concentración de fenoles totales en las hojas jóvenes es aproximadamente un 89% mayor (1,9 veces) respecto del contenido presente en las hojas adultas. En el análisis de los flavonoides totales, el contenido es aproximadamente 21,5% mayor en las hojas jóvenes.

Una gran diferencia puede observarse cuando se analizan los derivados de ácidos hidroxicinámicos, donde la concentración en las hojas jóvenes es aproximadamente 77,5% mayor (1,78 veces) respecto de las hojas adultas. Estos compuestos constituyen la principal diferencia entre los perfiles obtenidos como así también el principal aporte al contenido de fenoles totales.

El análisis del *fingerprint* de polifenoles permite corroborar esta observación, donde los ácidos hidroxicinámicos constituyen los componentes mayoritarios. Éstos resultados concuerdan con trabajos previos realizados por otros autores (Bilia et al., 2008).

Respecto a la seguridad en el empleo de preparaciones que involucran al “cedrón” (infusión al 5% y liofilizado), no se han demostrado efectos citotóxicos ni genotóxicos (Angelleri et al., 2009).

Considerando la gran diferencia de concentraciones halladas entre los distintos materiales, es necesario evaluar la influencia del grado de desarrollo foliar al momento de emplear las hojas de cedrón, dado que las diversas actividades biológicas reconocidas para ésta especie podrían verse afectadas.

CONCLUSIONES

Estos análisis sugieren que la variable aquí analizada debería ser considerada al momento de elaborar productos en base a “cedrón”, dado que las diferentes concentraciones de polifenoles halladas pueden traducirse en cambios de sus actividades biológicas.

AGRADECIMIENTOS

Con subsidios UBA B120 y ANPCYT-PICT N° 38238.

REFERENCIAS

- Angelleri G, López Nigro MM, Ricco R, Reides C, Wernert F, Portmann E, Carballo MA. 2009. Evaluación de extractos de *Aloysia citrodora* mediante estudios fitoquímicos y genotóxicos. *Acta Toxicol Argent* 17 (suplemento):35.
- Bellakhdar J, Idrissi A, Canigual S, Iglesias J, Vila RJ. 1994. Composition of lemon verbena (*Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton) oil of Moroccan. *J. Essential Oil Res* 6: 523 - 526.
- Bilia AR, Giomi M, Innocenti M, Gallori S, Vincieri FF. 2008. HPLC–DAD–ESI–MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. *J Pharm Biomed Anal* 46: 463 – 470.
- Botta SM. 1979. Las especies Argentinas del Género *Aloysia* (Verbenaceae). *Darwiniana* 22: 67 - 108.
- Carnat A, Carnat AP, Chavignon O, Heitz A, Wylde R, Lamaison JL. 1995. Luteolin 7-diglucuronide, the major flavonoid compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. *Planta Med* 61: 490.
- Carnat A, Carnat AP, Fraisse D, Lamaison JL. 1999. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia* 70: 44 - 49.
- Dao L, Friedman M. 1992. Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. *J Agric Food Chem* 40: 2152 - 2150.
- Del Baño MJ, Lorente J, Castillo JN, Benavente-García O, Del Rio JA, Ortuño A, Quirin KW, Gerard D. 2003. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. *Antioxidant Activity. J Agric Food Chem* 51: 4247 - 4253.
- Duke JA. 1985. *Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton, CRC Press, pp. 33.
- Gafner S, Bergeron C, Batcha LL, Angerhofer CK, Sudberg S, Sudberg EM, Guinaudeau H, Gauthier R. 2003. Analysis of *Scutellaria lateriflora* and its adulterants *Teucrium canadense* and *Teucrium chamaedrys* by LC–UV/MS, TLC, and digital photomicroscopy. *J. AOAC Int.* 86: 453 - 460.
- Gupta MP. 1995. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Convenio Andrés Bello, Santa Fé de Bogotá. Colombia.
- Haslam E. 1988. Plant polyphenols (syn. Vegetable tannins) and chemical defense. A reappraisal. *J Chem Ecol* 14: 1789 - 1805.
- Haslam E. 1989. *Plant polyphenols: Vegetable Tannins Revisited*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hieronymus J. 1882. *Plantas diafóricas*. Flora Argentina. Atlántida Ed., Buenos Aires, pp 224 - 226.
- Jones CG, Hartley E. 1999. A protein competition model of phenolic allocation. *OIKOS* 86: 27 – 44.
- Lahitte HB, Hurrell JA, Belgrano MJ, Jankowski L, Haloua P, Mehlreter K. 1998. *Plantas Medicinales Rioplatenses*. Literature of Latin American Editores. Buenos Aires, Argentina.
- Lavola A. 1998. Accumulation of flavonoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance. *Tree Physiol* 18: 53 – 58.
- Mabry TJ, Markham KR. and Thomas MB. 1970. *The Systematic Identification of the Flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin and New York, pp 1 - 175.
- Makkar HPS, Blümmel M, Borowy NK, Becker K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J Sci Food Agric* 61: 161 - 165.
- Maksimovic Z, Malencic D and Kovacevic N. 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity

- of *Maydis stigma* extracts. *Bioresour. Technol* 96: 873 - 877.
- Markham KR. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London, pp 1 - 113.
- Matsuki M. 1996. Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution. *Aust J Bot* 44: 613 - 634.
- Middleton JrE, Kandaswami C. 1994. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer en "The Flavonoids. Advances in Research since 1986" (J.B. Harborne Ed.), Chapman & Hall / CRC, pags. 619 - 652.
- Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D. y Villar A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol* 76: 201 - 214.
- Ratera E. y Ratera M. 1980. *Plantas de la Flora Argentina empleadas en medicina popular*. Hemisferio Sur, 1ª edición.
- Riipi M, Ossipov V, Lempa K, Haukioja E, Koricheva J, Ossipova S, Pihlaja K. 2002. Seasonal changes in birch leaf chemistry: are there trade-offs between leaf growth and accumulation of phenolics? *Oecology* 130: 380 - 390.
- Rugna A, Ricco R, Gurni A y Wagner M. 2008. Variaciones en el contenido de los polifenoles foliares en *Smilax campestris* Griseb. - Smilacaceae - según su grado de desarrollo. *Lat Am J Pharm* 27: 247 - 249.
- Strack D. 1997. Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB (eds). *Plant Biochemistry*. Academic Press, London, pp 387 - 416.
- Toursakissian M. 1980. *Plantas Medicinales Argentinas Hemisferio Sur*, 1ª edición. pp 131 - 135.
- Troncoso NS. 1974. Los Géneros de Verbenaceae de Sudamérica extratropical (Argentina, Chile, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Sur de Brasil). *Darwiniana* 18: 295 - 412.
- Troncoso NS. 1979a. Verbenaceae. Flora de la Provincia de Jujuy. Parte IX Verbenaceae a Caliceraceae. Burkart A. (Ed.). INTA: 1 - 115.
- Troncoso NS. 1979b. Verbenaceae. Flora ilustrada de la Provincia de Entre Ríos, Tomo V, Verbenaceae. Burkart A. (Ed.). INTA: 270 - 285.
- Waterman PG, McKey DB. 1989. Herbivory and secondary compounds in rain forest plants en "Tropical rain forest ecosystems". H. Lieth and M.J.A. Werger eds. Elsevier, Amsterdam, pp 513 - 536.
- Yanagida A, Kanda T, Shoji T, Ohnishi-Kameyama M, Nagata T. 1999. Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A* 855: 181 - 190.
- Zuloaga FO, Morrone O. 1999. Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina. Missouri Botanical Garden Press, Missouri, (EEUU) II: 1136 - 1158.