

ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA, TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES DE *Aloysia gratissima* (VERBENACEAE).

PHYTOCHEMICAL SCREENING. GASTROPROTECTIVE ACTIVITY AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF *Aloysia gratissima* (VERBENACEAE)

MARINA BUSSO, JUAN PABLO MUNAFO, FLORENCIA GALIE, ALEJANDRO BUCCIARELLI.

*Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia,
Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina.*

RESUMEN

Se evaluó la actividad gastroprotectora de la infusión proveniente de las hojas de *Aloysia gratissima* (Verbenaceae), especie nativa de interés medicinal que se desarrolla en el sudoeste bonaerense, utilizando un modelo de inducción de úlceras gástricas con etanol en ratones. Se realizó un tamizaje fitoquímico para detectar la presencia de compuestos que podrían ser responsables de la actividad gastroprotectora de la planta. Se determinó el contenido de fenoles totales y la capacidad atrapadora de radicales libres mediante el método del Folin-Ciocalteu y del 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH), respectivamente. Los ensayos demostraron que la infusión de la planta, administrada por vía oral en dosis de 100, 500 y 1000 mg/kg, ejerció una gastroprotección significativa frente a la inducción de úlceras. Se detectó una actividad atrapadora de radicales libres de 47,5%, similar a la sustancia de

referencia (BHT). El estudio fitoquímico detectó la presencia de flavonoides y otros polifenoles, sustancias con reconocida capacidad antioxidante. Estos metabolitos ejercen efectos protectores en diferentes modelos experimentales de inducción de úlceras mediante mecanismos que pueden involucrar la neutralización de radicales libres, lo que podría explicar la actividad gastroprotectora de la planta. Estos hallazgos requieren estudios adicionales de *A. gratissima* como una posible terapia frente a la úlcera gástrica.

Palabras clave: *Aloysia gratissima*, gastroprotectora, radicales libres, úlcera gástrica.

ABSTRACT

The gastroprotective activity of the infusion from the leaves of *Aloysia gratissima* (Verbenaceae), a native species of medicinal interest growing in South West Buenos Aires, was evaluated in an ethanol-induced gastric ulcer model in mice. Phytochemical screening was carried out in order to determine the presence of compounds that could be responsible for the pharmacological effects of the plant. Total phenolic content and the free radical scavenging activity of the plant were determined using the Folin-Ciocalteu and the 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method, respectively. Assays demonstrated that the infusion, orally administered at 100, 500,

Correspondencia:

Alejandro Bucciarelli. E-mail: abucciarelli@uns.edu.ar. Cátedra de Farmacognosia. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. San Juan 670. (8000) Bahía Blanca, Argentina.

Recibido: 9 de octubre de 2019

Aceptado: 12 de diciembre de 2019

and 1000 mg/kg doses, exerted a significant gastroprotection effect against ulcer induction ($P < 0,05$). A free radical scavenging activity of 47.5% -similar to the reference substance (BHT)- was detected. Phytochemical screening revealed the presence of antioxidant compounds such as flavonoids and other phenolic compounds. These compounds exert protective effects in different experimental models of ulcer induction that could involve free radical neutralization, which could explain the gastroprotective activity of the plant. These promising results support additional studies of *A. gratissima* as a potential therapy against gastric ulcer.

Key words: *Aloysia gratissima*, gastroprotective, free radicals, gastric ulcer.

INTRODUCCIÓN

La úlcera gástrica es una de las patologías más relevantes del sistema digestivo y constituye un problema médico-social de trascendencia económica a escala mundial debido a su alta incidencia, amplia distribución geográfica, morbilidad y consumo de medicamentos, siendo responsables varios factores tales como el estrés, la dieta, el tabaco, alcohol y cierto tipo de medicamentos.

Cabe destacar que los tratamientos actuales para combatir las úlceras pueden ocasionar efectos secundarios y acciones contrarias a las deseadas, razón por la cual se ha incrementado la búsqueda y evaluación de nuevos agentes, fundamentalmente provenientes de plantas, en el tratamiento de esta y otras patologías gastrointestinales.

En tal sentido, según la Organización Mundial de la Salud (1), el 80 % de la población mundial depende en forma directa o indirecta de las plantas medicinales para la atención primaria de la salud, ya sea por su comprobada efectividad, por sus menores efectos adversos, o debido a aspectos económicos que dificultan el acceso a medicamentos de síntesis.

Numerosos trabajos sobre etnofarmacología informan que el tratamiento de las afecciones del sistema digestivo es el uso más difundido de las plantas medicinales (2-8). Particularmente en nuestro país, se verificó que el 25 % de las aplicaciones medicinales totales registradas por los criollos de la provincia de Formosa son prescriptas para el tratamiento de trastornos del sistema digestivo (9). Algo similar ocurre en la provincia de Buenos Aires, en donde un estudio llevado a cabo en 27 municipios indicó que el uso de plantas sobre el sistema digestivo es el preponderante (27,8 %--10); y otro, realizado en la región de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, arrojó un porcentaje de uso mucho mayor (por sobre el 50 % (11-12).

Si bien en la actualidad existen numerosos principios activos para su tratamiento y prevención (antiácidos, anticolinérgicos, antagonistas de los receptores H2 de histamina, inhibidores de la bomba de protones e inhibidores de la motilidad intestinal) (13), éstos no siempre han logrado resolver el curso de la enfermedad en forma definitiva.

Esta situación, sumada a la escasez de recursos económicos y a la dificultad de acceso a medicamentos de síntesis por parte de ciertos núcleos poblacionales, ha impulsado la utilización de plantas como agentes terapéuticos para el tratamiento de la úlcera gástrica y desórdenes relacionados. Ello ha quedado demostrado por numerosos trabajos que ponen de manifiesto la gran efectividad de algunas especies para el tratamiento de la úlcera gástrica (14-24).

Adicionalmente, la fitoterapia también ha utilizado plantas medicinales nativas para el tratamiento de afecciones digestivas, entre ellas *Aloysia gratissima*, perteneciente a la familia Verbenaceae. Esta familia comprende en la actualidad alrededor de 100 géneros y 2000 especies de amplia distribución geográfica, abarcando regiones tropicales, subtropicales y templadas (25).

En la República Argentina se describen 26 géneros con 191 especies, de las cuales 54 especies son endémicas (26). Esta familia se caracteriza por incluir especies aromáticas muy utilizadas en la medicina tradicional ya que algunos de sus representantes, entre ellos *A. gratissima*, se utilizan por sus propiedades digestivas, antiespasmódicas y estomacales (27-30).

Aloysia gratissima (Gill. et Hook) Tronc. (Verbenaceae) es una especie aromática ampliamente distribuida en Sudamérica, principalmente en Argentina, Brasil y Paraguay. En nuestro país es comúnmente conocida como cedrón del monte o poleo de campo y es utilizada como digestiva, antiespasmódica, carminativa, cardiotónica, sedante y diaforética (31-34); como también en casos de resfriós, bronquitis y desórdenes del sistema nervioso (35).

La infusión preparada a partir de las hojas de la planta se emplea en Catamarca para tratar para combatir resfriós, dolores estomacales, como sedante y afrodisíaco (36). Se utiliza también como sedante, digestivo, antitusivo, sudorífico y emenagogo (37). La decocción de sus partes aéreas (9) u hojas (38) se bebe sola, o también junto con el mate, como digestivo estomacal en Chaco. Otros investigadores mencionan el uso de sus partes aéreas en forma de infusión para el tratamiento de afecciones de garganta y disturbios estomacales; como diaforético, estomacal, digestivo, afrodisíaco y tónico (39).

Cabe destacar que a pesar del uso difundido de esta especie, la información existente es escasa respecto a estudios químicos y farmacológicos que permitan correlacionar sus

componentes con los usos tradicionales que se le atribuyen. Respecto a la composición química, las investigaciones realizadas comprenden el análisis del aceite esencial y, en menor medida, de algunos compuestos polifenólicos, resultando escasa la información que se dispone de ellos (25, 40,41).

Considerando que hasta el momento no se cuenta con estudios acerca de la efectividad de la planta en afecciones digestivas como la úlcera gástrica, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad gastroprotectora de la infusión por vía oral frente al daño gástrico inducido por etanol en ratones. Adicionalmente, también se realizó un tamizaje fitoquímico para analizar los grupos de mayor relevancia, junto con la cuantificación de fenoles totales y la determinación de la capacidad atrapadora de radicales libres de la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las hojas de *Aloysia gratissima* fueron recolectadas en el partido de Bahía Blanca en el verano y un ejemplar testigo (Villamil 12070) fue depositado en el Herbario del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur (BBB). El material se desecó en estufa a 40°C y se almacenó en recipientes herméticos hasta su uso.

Preparación del extracto a ensayar

Se preparó una infusión al 5 % a partir de las hojas de la planta, según Farmacopea Argentina VII Ed. (42). Para ello, la droga vegetal se transfirió a un recipiente apropiado y se agregó agua destilada hirviendo. Luego de 20 min se filtró y lavó el residuo con cantidad suficiente de agua para completar el volumen inicial. El conjunto de extractos se mezcló y llevó a sequedad en un equipo liofilizador (Martin Christ Alpha 2-4 LDplus). El rendimiento de la infusión fue de 22,1 %.

Animales de experimentación

Se utilizaron ratones albinos CF1 hembra de 8 semanas de edad con un peso comprendido entre 25 y 30 g, provistos por el Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur y mantenidos bajo las mismas condiciones ambientales (temperatura de 22 ± 1 °C, humedad 70 %, ciclos luz/oscuridad de 12 horas, inicio: 6:00 am), que se aclimataron durante una semana previa al ensayo.

Los animales recibieron agua y alimento ad libitum (Ganave®, Ratas y ratones, Alimentos Pilar S.A., Argentina) y fueron privados de alimento 24 h antes del ensayo.

El cuidado y tratamiento de los animales se realizó teniendo en cuenta las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (43). El protocolo de trabajo

fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE 065/2015).

Evaluación de la actividad gastroprotectora

Los animales se distribuyeron en 5 grupos de 5 animales cada uno. El grupo control recibió un vehículo acuoso (carboximetilcelulosa al 0,1 % en agua destilada), mientras que los grupos tratados recibieron la infusión disuelta en el mismo vehículo (100, 500 y 1000 mg/kg, respectivamente). Un grupo control de referencia fue tratado con omeprazol disuelto en el vehículo (10 mg/kg), dosis que ha demostrado en ensayos previos una significativa actividad antiulcerosa en el modelo experimental utilizado (24). En todos los casos, el volumen de las sustancias administradas mediante sonda gástrica fue de 0,3 mL.

Luego de transcurridos 45 min desde la administración de cada sustancia, todos los animales recibieron 0,2 mL de etanol absoluto por vía oral con el objeto de inducir la formación de úlceras gástricas. Transcurridos otros 45 min, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, sus estómagos fueron removidos e insuflados con solución salina y fijados en formol al 10 % durante 2 h. Posteriormente, los estómagos se abrieron a lo largo de la curvatura mayor y se realizaron observaciones bajo microscopio estereoscópico para determinar la cantidad y el tamaño de las lesiones gástricas según una escala predeterminada (44). El grado de lesión de cada estómago se expresó en términos de Índice de Úlcera (IU). Además, se calculó el porcentaje de gastroprotección de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\left[\frac{IU_{\text{promedio grupo control}} - IU_{\text{promedio grupo tratado}}}{IU_{\text{promedio grupo control}}} \right] \times 100$$

Tamizaje fitoquímico

Teniendo en cuenta la posible presencia de compuestos con actividad gastroprotectora y/o antioxidante, se realizaron reacciones de caracterización para la detección de los principales grupos fitoquímicos presentes. Se analizó la presencia de alcaloides (Dragendorff y Mayer), núcleos antraquinónicos (Bornträger), hidratos de carbono (Fenol-sulfúrico), cardenólidos (Kedde), cianoglicósidos (Guignard), flavonoides (Shinoda), leucoantocianidinas (Rosenheim), lípidos (Yodo), compuestos fenólicos (Tricloruro férrico), taninos (Gelatina), proteínas y péptidos (Ninhidrina), saponinas (poder emulsificante y formación de espuma), núcleos esteroideos y triterpénicos (Liebermann-Burchard).

Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (45). Para ello se tomaron 3 alícuotas de hasta 0,5 ml de la infusión diluida en agua (1 mg/mL), se les

agregaron 2,5 mL de una dilución acuosa (1:10) del reactivo de Folin y transcurridos 5 minutos se les adicionaron 2 mL de una solución de Na₂CO₃ (75 g/l). Las soluciones resultantes se agitaron y luego de 2 h se midieron las correspondientes absorbancias a 765 nm. El contenido de fenoles totales se expresó en términos de ácido gálico por comparación con una curva patrón de ácido gálico de concentración comprendida entre 4 y 20 µg/ml (R²=0,9992).

Evaluación de la capacidad atrapadora de radicales libres

Se utilizó el método basado en la reducción y decoloración de una solución alcohólica del radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) en presencia de sustancias antioxidantes presentes en la muestra (46), en donde el DPPH remanente, medido luego de cierto tiempo, guarda una relación inversamente proporcional con la capacidad atrapadora de radicales libres. El ensayo se llevó a cabo por triplicado, a partir de la mezcla de 1,5 mL de la infusión disuelta en etanol (0,433 mg/mL) con 1 mL de una solución alcohólica de DPPH 0,3 mM. Se utilizó una solución de etanol como blanco y butilhidroxitolueno (0,040 mg/mL) como control positivo. Luego de transcurridos 30 min desde el agregado del DPPH se midieron las absorbancias a 518 nm. La reducción del radical DPPH, expresada como porcentaje de Inhibición, se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [(\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}) / \text{Abs blanco}] \times 100$$

Adicionalmente, se determinó la concentración atrapadora de radicales libres media (SC50), definida como la concentración de infusión requerida para neutralizar el 50 % de los radicales DPPH• presentes. Para ello se prepararon: a) una solución madre de la infusión en etanol (2 mg/mL), a partir de la cual se realizaron diferentes diluciones para graficar el % de Atrapamiento vs. la concentración de la infusión (µg/mL); b) un blanco de muestra de cada dilución y c) un control negativo (etanol). Posteriormente se mezclaron, por separado, a) 2 mL de cada dilución de la muestra con 0,8 mL de la solución de DPPH, b) 2 mL del blanco de muestra de cada dilución de la infusión con 0,8 mL de etanol y c) 2 mL de etanol con 0,8 mL de la solución de DPPH, respectivamente. En todos los casos las determinaciones se realizaron por triplicado.

Las muestras, blancos de muestra y controles se incubaron durante 30 min en oscuridad luego del agregado del DPPH y se midieron las absorbancias a 518 nm (Koleva et al.). El valor de SC50 para cada muestra se determinó gráficamente representando el porcentaje de desaparición de DPPH en función de la concentración de la muestra (R²=0,9605). Para cada dilución de la infusión se determinó el porcentaje de atrapamiento según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Atrapamiento} = 100 - [(\text{Absmuestra} - \text{Absblanco de muestra}) / \text{Abscontrol}] \times 100.$$

Análisis estadístico

Los valores de Índice de Ulcera (IU) se expresaron como la Media ± Error Estándar de la Media y se compararon mediante ANOVA simple, seguido por el test de Tukey, con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los resultados del estudio de actividad gastroprotectora de la infusión de *A. gratissima*, en donde se observó un marcado daño gástrico en todos los animales controles (Fig. 1A), incluyendo hiperemia, edema submucoso y severa congestión de los vasos sanguíneos, detectándose una incidencia completa en la formación de lesiones en la porción glandular y con una disposición generalmente paralela a los pliegues gástricos.

El pretratamiento con las tres dosis de la infusión (Fig. 1B) y omeprazol inhibieron la formación de lesiones gástricas inducidas por etanol en grado variable. La severidad del daño gástrico se reflejó en el Índice de Ulcera (IU), que fue significativamente menor o nulo en los grupos tratados con el extracto en comparación con el control. En el caso del omeprazol, si bien el IU resultó significativamente menor que el control, se advirtieron mayores signos de irritación gástrica que en los casos tratados con el extracto de la planta.

En la Fig. 1A se muestra uno de los estómagos representativos del grupo control, en donde las flechas señalan las úlceras provocadas por el agente inductor. En la Fig. 1B puede observarse uno de los estómagos representativos del grupo que recibió 100 mg/kg de la infusión de la planta, en donde el grado de protección fue muy elevado, observándose una superficie mucosa con muy escasa cantidad de lesiones.

Al evaluar la actividad atrapadora de radicales libres del extracto de la planta se observó una capacidad atrapadora de 47,5 %, similar al control positivo de butilhidroxitolueno (52 %), mientras que la capacidad atrapadora media (SC50) alcanzó 44,7 µg/mL (Fig. 2), detectándose una notoria decoloración de la solución de DPPH debida a la presencia de compuestos donadores de hidrógeno en la muestra.

Las reacciones de caracterización resultaron positivas para compuestos fenólicos, carbohidratos, saponinas, esteroides, proteínas, flavonoides, triterpenos, taninos y lípidos, siendo más intensas en los cuatro primeros casos.

DISCUSIÓN

La formación de úlceras gástricas inducidas por etanol en ratones es un modelo representativo de la enfermedad ulcerosa en el humano (47). Tales lesiones se pudieron prevenir exitosamente mediante la administración oral de la infusión de *A. gratissima* en las tres dosis ensayadas. En cambio, en el caso de los animales del grupo control se observaron úlceras de mayor grado, características del contacto directo de un agente necrotizante potente como el etanol con la mucosa gástrica.

Numerosos estudios experimentales han demostrado que los radicales libres generadores de oxígeno y la peroxidación lipídica juegan un importante papel en la patogénesis de las lesiones gástricas agudas inducidas por etanol (48-49). Este agente produce una rápida y fuerte vasoconstricción que es acompañada por una rápida y vigorosa dilatación arteriolar. Los oxirradicales generados durante los episodios mencionados de isquemia-reperfusión provocan severos cambios a nivel celular conduciendo a la muerte de las células gástricas ya que, debido a su extrema reactividad, atacan constituyentes celulares esenciales, tales como ácidos nucleicos, proteínas o lípidos y también inducen peroxidación de los lípidos de membrana, formando compuestos tóxicos como epóxidos, aldehídos y nuevos radicales libres (50).

Las reacciones de caracterización realizadas sobre el extracto sugieren la presencia de compuestos con elevada actividad antioxidante, tales como flavonoides y otros polifenoles, los cuales poseen amplios efectos biológicos, incluida la actividad protectora gástrica (51). Varios mecanismos han sido propuestos para explicar el efecto gastroprotector de estos compuestos, tales como su capacidad de aumentar el contenido mucosal de prostaglandinas citoprotectoras, atrapar y eliminar radicales libres, disminuir la secreción

de histamina, incrementar la perfusión vascular y reducir la adherencia leucocitaria (52). También son capaces de reducir la motilidad gastrointestinal, aumentando el tiempo de contacto del extracto vegetal con la mucosa gástrica, lo que resulta beneficioso para prolongar el efecto protector. De esta manera, son capaces de prevenir la formación de lesiones inducidas por diferentes agentes injuriantes.

El elevado porcentaje de atrapamiento de radicales libres detectado sugiere que los compuestos fenólicos presentes en el extracto, incluidos los flavonoides, podrían ser principios activos responsables, al menos en parte, del efecto observado, aunque no puede descartarse la acción de otros compuestos. Este hecho resulta interesante ya que podría explicar la elevada actividad gastroprotectora de la planta debido a que tales sustancias ejercen protección sobre el estómago a través de mecanismos antioxidantes, secuestrando y neutralizando sustancias reactivas derivadas del oxígeno.

Los resultados obtenidos hasta el momento podrían sustentar el uso tradicional de la planta en trastornos digestivos, como una alternativa terapéutica de prevención y recuperación de la salud en aquellas patologías relacionadas con la úlcera gástrica. Las ventajas terapéuticas que ofrece este tipo de preparación es el hecho de tener una acción más moderada, ejercida, la mayoría de las veces, por la combinación de varios compuestos que logran modificaciones más suaves pero, a su vez, más equilibradas en el organismo. A ello se suma la posibilidad de ser administrado durante largos períodos de tiempo, tanto con fines terapéuticos como preventivos, con menores riesgos de efectos tóxicos si se halla bajo la supervisión de profesionales de la salud con sólida formación en fitoterapia.

A pesar de los progresos de la química convencional y de la farmacología en la obtención de sustancias efectivas contra la úlcera gástrica, la especie estudiada podría constituirse en una fuente de compuestos antiulcerosos para su desarrollo

Tratamiento	Índice de Úlcera	Gastroprotección (%)
Control	30,2 ± 5,4	—
Infusión 100 mg/kg	1,9 ± 1,1*	93,7
Infusión 500 mg/kg	0,5* ± 0,2*	98,3
Infusión 1000 mg/kg	0*	100
Omeprazol 10 mg/kg	8,1 ± 2,9*	73,2

* Valores expresados como Media ± EEM (n = 5). *Estadísticamente significativo vs. control (P<0,05), ANOVA seguido del test de Tukey.

Tabla 1. Efecto gastroprotector de la infusión de *Aloysia gratissima* sobre úlceras inducidas por etanol en ratones.

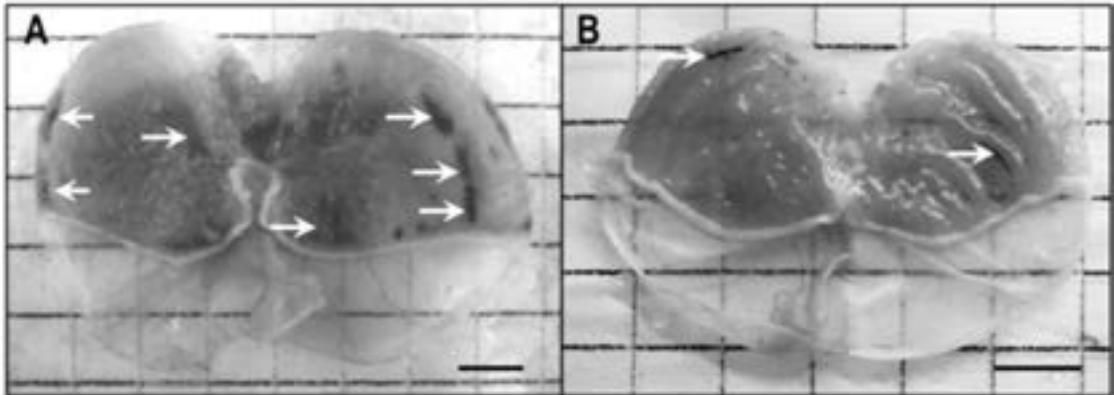


Figura 1. Actividad gastroprotectora de *Aloysia gratissima*. A) Estómago representativo del grupo control; B) Estómago representativo del grupo tratado con 100 mg/kg de infusión. Ulceras gástricas inducidas por etanol (flechas). Barras = 5 mm

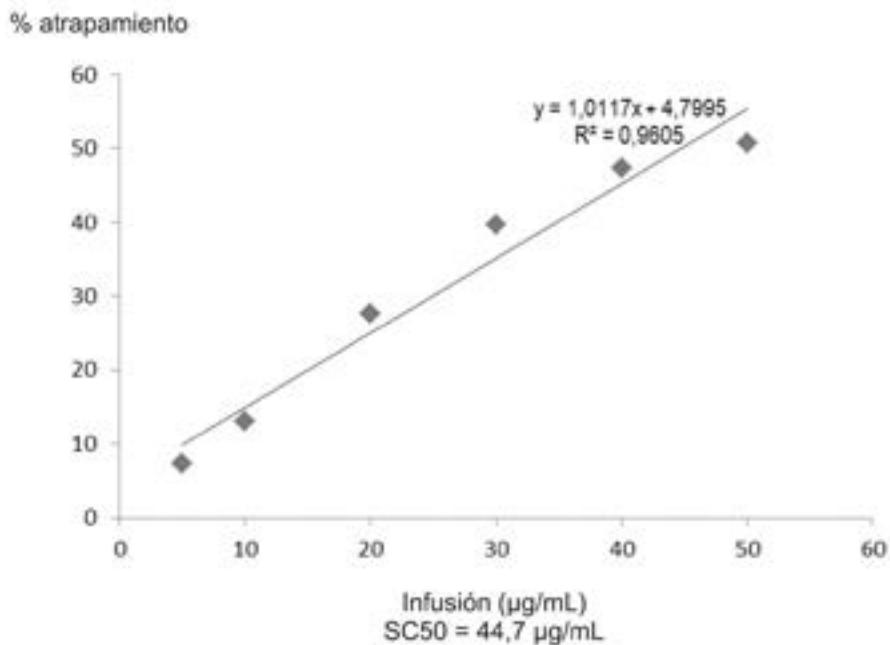


Figura 2. Actividad atrapadora de radicales libres de la infusión de *Aloysia gratissima*.

como una nueva entidad farmacéutica o, alternativamente, como complemento para las terapias existentes. El hallazgo de compuestos con tales características permitirá diseñar nuevas estrategias terapéuticas que serían aplicables a pacientes que padecen úlcera gástrica y enfermedades afines (53).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur (PGI-24/ZB75). Marina Busso es becaria del Consejo Interuniversitario Nacional (CIN). Los autores agradecen a Dr. Carlos B. Villamil por la identificación del material de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization (1998). A health telematics policy in support of WHO's Health-for-all strategy for global health development: report of the WHO Group Consultation on Health Telematics, Geneva, Switzerland, 1997.
2. Heinrich M, Rimpler H, Antonio Barrera NJ. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, México): Ethnopharmacologic evaluation. *J Ethnopharmacol* 1992; 36: 63-80.
3. Berlin EA, Berlin B. Medical ethnobotany of the Highland Maya of Chiapas, Mexico: The gastrointestinal diseases, Princeton University Press, Princeton, 1996.
4. Borthakur SK, Nath K, Gogoi P. Herbal remedies of the Nepalese of Assam. *Fitoterapia* 1996; 67: 231-7.
5. Bustos D, Tapia A, Feresin G, Ariza Espinar L. Ethnopharmacobotanical survey of Bauchazeta district, San Juan Province Argentina. *Fitoterapia* 1996; 67: 411-5.
6. Ballero M, Poli F, Santus M. Plants used in folk medicine of Monteleone (Northern Sardinia). *Fitoterapia* 1998; 69: 52-64.
7. Madhava Chetty K, Lakshmi pathi Chetty M, Sudhakar A, Ramesh C. Ethno-medico botany of some aquatic Angiospermae in Chittoor district of Andhra Pradesh, India. *Fitoterapia* 1998; 69: 7-12.
8. Schwambach K, Amador T. Estudo da utilização de plantas medicinais e medicamentos em um município do sul do Brasil. *Lat Am J Pharm* 2007; 26: 602-8.
9. Scarpa GF. Plantas empleadas contra trastornos del sistema digestivo en la medicina tradicional criolla del Chaco Noroccidental. *Dominguezia* 2002; 18: 36-50.
10. Consolini A, Ragone M, Tambussi A, Paura A. Estudio observacional del consumo de plantas medicinales en la provincia de Buenos Aires, Argentina, en el período diciembre de 2004-noviembre de 2005. *Lat Am J Pharm* 2007; 26: 924-36.
11. Cambi VN, Hermann PM, Bontti EE, Haussaire MF, Sánchez DH. The use of medicinal plants in Bahía Blanca, Argentina. *Acta Horti* 1999; 501: 57-61.
12. Hermann PM, Cambi VN, Bontti EE, Haussaire MF, Sánchez DH. *Bol Soc Argent Bot* 2001; 36: 161-70.
13. Sáinz R, Borda F, Domínguez E, Gisbert JP. Helicobacter pylori infection. *Rev Esp Enfer Dig* 1999; 91: 777-84.
14. Komatsu M, Tomimori T, Hatayama K, Makiguchi Y, Mikuriya N. 1970. Studies on the constituents of Sophora species (I). Constituents of Sophora subprostrata Chun et T. Chen. (1). Isolation and structure of new flavonoids, sophoradin and sophoranone. *Chem Pharm Bull* 1970; 18: 602-7.
15. Martín MJ, Alarcón de la Lastra C, Marhuenda E, Delgado F, Torreblanca J. Anti-ulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter in rats. *Phytother Res* 1988; 2: 183-93.
16. Rombi M. 100 Plantas Medicinales. Composition, mode d'action et intérêt thérapeutique. Editorial Romart, Nice, 1990.
17. Gálvez J, Crespo ME, Jiménez J, Suárez A, Zaezuelo A. Anti-diarrhoeic activity of quercitrin in mice and rats. *J Pharm Pharmacol* 1993; 45: 157-9.
18. Piezzi R, Guzmán JA, Guardia T, Pestchanker MJ, Guerreiro E, Giordano OS. Dehydroleucodine prevents ethanol-induced necrosis in the mice duodenal mucosa. A histological study. *Micr Electr Biol Cel* 1995; 19: 27-33.
19. Alarcón de la Lastra C, Martín MJ, Motilva V, et al. Implications of sulphhydryl groups in gastroprotection mediated by *Croton mentodorum*. En: *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 1996; 18 (Suppl. B): 87.
20. Martín MJ, La Casa C, Motilva V, López A, Alarcón de la Lastra C. Healing process induced by a flavonic fraction of *Bidens aurea* on chronic gastric lesion in rat. Role of angiogenesis and neutrophil inhibition. *Z Naturforsch* 1996; 51: 570-7.
21. Alarcón de la Lastra C, La Casa C, Motilva V, López A., Martín MJ. Ulcer-protecting effects of a flavonoid fraction from *Bidens aurea*. Role of endogenous prostaglandins and microvascular permeability. *Phytomedicine* 1997; 3: 327-33.
22. Villegas LF, Fernández ID, Maldonado H, et al. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Perú. *J Ethnopharmacol* 1997; 55: 193-200.
23. Bucciarelli A, Skliar MI. Medicinal plants from Argentina with gastroprotective activity. *Ars Pharm* 2007; 48: 361-9.
24. Bucciarelli A, Minetti A, Milczakowskyg C, Skliar M. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). *Pharm Biol* 2010; 48:1025-30.
25. Ricco RA, Wagner ML, Portmann E, et al. Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (Verbenaceae). *BLACPMA* 2010; 9: 388-96.
26. Zuloaga FO, Morrone O. Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina. Editorial Missouri Botanical Garden Press; 1999.
27. Sorarú SB, Bandoni AL. Plantas de la medicina popular. Buenos Aires. Albatros; 1978.
28. Ratera EL, Ratera MO. Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular. Buenos Aires. Editorial Hemisferio Sur; 1980.
29. Toursarkissian M. Plantas medicinales de la Argentina. Buenos Aires. Hemisferio Sur; 1980.
30. Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol* 2001; 76: 201-214.
31. Del Vitto LA, Petenatti EM, Petenatti ME. 1997. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina). Primera parte: Plantas nativas. *Multequina* 1997; 6: 49-66.
32. Teixeira Duarte MT, Figueira GM, Sartoratto A, et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2005; 97: 305-11.
33. Vendruscolo GS, Simões CMO, Mentz LA. Etnobotánica no rio grande do sul: análise comparativa entre o conhecimento original e atual sobre as plantas medicinais nativas. *Pesquisas, Botânica* 2005; 56: 285-322.
34. Arias Toledo B. Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. *BLACPMA* 2009; 8: 389-401.
35. Souza AA, Wiest JM. Atividade antibacteriana de *Aloysia*

- gratissima (Gill et Hook) Tronc. (garupa, erva-santa), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul – Brasil. Rev Bras Pl Med 2007; 9: 23-9.
36. Saadi L., Jorratti de Jiménez M, Tonn C E. Estudio químico de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* Botta y *A. gratissima* var. *schulziana* (Mold.) Botta (Verbenaceae). Revista del Cizas. Universidad Nacional de Catamarca. Facultad de Ciencias Agrarias 2003; 4 (1): 45-53.
37. Ricciardi GAL, Torres A, Agrelo de Nassiff A, et al. Examen del aceite esencial de “niño rupá” (*Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc.)”; U.N.N.E. 2002; www.unne.edu.ar; E-018.
38. Scarpa GF. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. J Ethnopharmacol 2004; 91: 115-35.
39. Bassols GB, Gurni AA. Especies del género *Lippia* utilizadas en medicina popular latinoamericana. Dominguezia 1996; 13: 7-25.
40. Ricciardi GA, Ricciardi AIA y Bandoni AL. Fitoquímica de Verbenaceae (*Lippia* y *Aloysia*) del Noroeste Argentino. <http://www.unne.edu.ar>. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE 2000. Exactas N° 039.
41. Trovati, G. (2009) Essential oil composition of *Aloysia gratissima* from Brazil. Journal of Essential Oil Research, 21, 325-6.
42. Farmacopea Argentina Séptima Edición. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), Ministerio de Salud de la Nación, Argentina, 2003.
43. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. National Academy Press, Washington, DC, 1996.
44. Martín MJ, La Casa C, Alarcón de la Lastra C, Cabeza J, Villegas I, Motilva V. Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. Z Naturforsch 1998; 53: 82-8.
45. Soušek J, Guédon D, Adam T, et al. Phytochem Anal 1999; 10: 6-11.
46. 42. Koleva II, van Beek TA, Linssen JPH, de Groot A, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. Phytochem Anal 2002; 13(1): 8-17.
47. Silen W. Experimental models of gastric ulceration and injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 1988; 255: G395-G402.
48. Kvietyš PR, Twohing B, Danzell J, Specian RD. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophil and xantine oxidase-derived radicals. Gastroenterology 1990; 98: 909-20.
49. Salim AS. Removing oxygen-derived free radicals stimulates healing of ethanol-induced erosive gastritis in the rat. Digestion 1990; 47: 24-8.
50. Glavin GB, Szabó S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. FASEB J 1992; 6: 825-30.
51. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci 1999; 64: 337-53.
52. Borrelli F, Izzo AA. The plant kingdom as a source of antiulcer remedies. Phytother Res 2000; 14: 581-91.
53. Bucciarelli A, Lofiego A, Bensack I, Rihl C, Skliar M. Actividad gastroprotectora de *Araujia sericifera* Brot. var. *hortorum* (E.Fourn.), especie vegetal sudamericana de uso medicina. RAMBB 2017; 24 (1): 26-32.