

Caracterización y determinación del poder antioxidante y actividad biocida de tres especies del Género *Eupatorium*



Trabajo presentado en el 2° CoArQC,
Mar del Plata, Setiembre 2014.

María C. Clavin¹
Flavia Redko¹
Jimena Semprine²
Marisa Repetto²
Sergio Teves³⁻⁵
Virginia Martino¹
Adriana Segall⁴

RESUMEN

Palabras clave: Actividad biocida, Poder antioxidante, Extractos vegetales, *Eupatorium* spp.

En la actualidad existe un gran interés en la utilización de extractos vegetales en las formulaciones cosméticas, en algunos casos por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. En nuestro país existe una gran cantidad de especies vegetales utilizadas en medicina tradicional. Nuestro grupo de trabajo tiene una larga trayectoria en la investigación de la composición química y actividades biológicas estas especies autóctonas. Entre estas, se seleccionaron tres especies pertenecientes al género *Eupatorium* (Asteraceae): *Eupatorium candolleianum*, *E. hecathanthum* y *E. macrocephalum* para el estudio de sus actividades biocida y antioxidante. Se determinó el poder antioxidante mediante la técnica de TRAP (*Total Reactive Antioxidant Potential*) y se verificó la actividad biocida mediante un sistema clásico basado en difusión sobre agar Mueller Hinton. Solamente el extracto de *E. candolleianum* presentó una marcada actividad inhibitoria frente a *Candida albicans*. Todos los extractos de estas especies presentaron actividad antioxidante, siendo el

1 Cátedra de Farmacognosia
2 Cátedra de Química General e Inorgánica
3 Cátedra de Microbiología
4 Cátedra de Calidad de Medicamentos
5 Proanálisis S.A.

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956 (1113) CABA.
mclavin@ffyb.uba.ar

extracto de *E. candolleianum* el más activo.

Se realizó la caracterización de los extractos hidroalcohólicos por TLC y HPLC/DAD. Los análisis cromatográficos obtenidos indicaron la presencia de compuestos polifenólicos del tipo flavonoide (derivados de la quercetina) y de tipo fenilpropanoide.

La actividad antioxidante de estos extractos, debida probablemente a su contenido en compuestos polifenólicos, los hace potencialmente promisorios para su aplicación cosmética.

SUMMARY

Key words: Biocidal activity, Antioxidant activity, Plant extracts, *Eupatorium* spp.

There is currently a great interest in the use of plant extracts in cosmetic, primarily for its biological properties, such as antimicrobial and antioxidant. In our country there are a lot of species used in traditional medicine. Our working group has a long history in the research of the chemical composition and biological activities of these native species. Three species, belonging to the genera *Eupatorium* (Asteraceae): *Eupatorium candolleianum*, *E. hecatanthum* and *E. macrocephalum* were selected for the study of their antioxidant and biocidal effects. The antioxidant power was determined by the TRAP technique (Total Reactive Antioxidant Potential). Biocidal activity was assayed using a classical Mueller Hinton agar based system. *E. candolleianum* showed a marked inhibitory activity against *Candida albicans*. All the extracts presented antioxidant activity, being *E. candolleianum* extract the most active. Also, characterization of the hydroalcoholic extracts of these species by TLC and HPLC/DAD was performed. Chromatographical analysis indicated the presence of polyphenolic compounds of the flavonoid and phenylpropanoid type. The antioxidant activity of these extracts, probably due to its content in polyphenolic compounds, makes them interesting ingredients for cosmetic application.

• INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un gran interés en la utilización de extractos vegetales en las formulaciones cosméticas fundamentalmente por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. El uso de productos naturales representa un gran desafío para la conservación de productos farmacéuticos, cosméticos y alimentos [1] y representan una buena alternativa a los productos de síntesis por los efectos adversos para la salud que estos provocan y, a su vez porque su producción industrial provoca serios efectos al medio ambiente. Además muchos ingredientes de origen natural han sido descritos como agentes protectores de la epidermis frente a la radiación solar y como antioxidantes (ej: resveratrol, extractos de té verde) [2]. En nuestro país existe una gran cantidad de especies utilizadas en medicina tradicional y nuestro grupo de trabajo tiene una larga trayectoria en la investigación de estas especies autóctonas en cuanto a su composición química y sus actividades biológicas. Entre estas especies estudiadas se seleccionaron tres pertenecientes al Género *Eupatorium* (Asteraceae).

Eupatorium macrocephalum Lessing, conocida vulgarmente como "planta de la oveja" (Lengua Maskoy), illa ka'ik (Tobas), "lankúkachú (Araucano-pampas). Se utiliza para el dolor de garganta, como digestiva,

béquica, abortiva, antiperiódica [3-6]. Se ha informado la presencia de la flavona 3', 4', 5'-trihidroxi-6,7-dimetoxiflavona (cirsiliol) en esta especie [7]

Eupatoriumhecatanthum (DC.) Baker, cuyos nombres vulgares son "donajlawe" (hoja con goma: Tobas), "dace' miha' loq", kaigoGo' set la'ta (Pilagas). La infusión o decocción de partes aéreas se emplea en lavados para cicatrizar heridas [8]. Sus tallos y flores frescas se mastican como antitusivos [6] y para el dolor de dientes. Las hojas frescas se mastican para el dolor de estómago. La infusión de hoja y raíz se utiliza como antidiarreica [9]. Han sido hallados en esta especie los flavonoides retusina, oxayanina B, euparina y 6-metoxieuparina [10].

Eupatoriumcandolleianum Hooker et Arnott. es frecuente en el sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y NE de Argentina, en lugares muy húmedos [11]. Sus nombres vulgares son "tabaco del monte" (Lengua Maskoy), "iyagaelta'a" (Tobas). Esta planta medicinal se emplea en la etnobotánica Lengua-Maskoy [12]. La planta entera se coloca en el agua del mate o se toma en infusión como purgante [9]. Se la utiliza también como tintórea [13]. Zardini [3] la cita como planta medicinal, sin especificar sus usos. Las flavonas jaceosidina y eupatilina han sido identificadas en esta especie [14]. Como un antecedente estas 3 especies presentaron efecto antiinflamatorio en edema de oreja de ratón y actividad analgésica en el *writing test*. Los extractos diclorometánicos de estas especies presentaron actividad antimicrobiana [14]. Uno de los principales mecanismos que generan daño y/o muerte celular son aquellos que involucran las reacciones entre las macromoléculas biológicas con las especies reactivas del oxígeno, los radicales libres, en particular el radical hidroxilo que es muy reactivo y los productos generados en los procesos de oxidación. Los organismos aeróbicos poseen varios mecanismos de defensa para prevenir y/o reparar el daño asociado a estos procesos. La presencia de moléculas y macromoléculas con capacidad de transformar radicales activos en especies inactivas constituye uno de los principales mecanismos de estas defensas antioxidantes [15]. Este tipo de defensa incluye una variedad de compuestos que contienen diferentes centros reactivos (por ejemplo, grupos fenoles, tioles) con diferente grado de hidrofobicidad. En este sentido, existe un gran interés en la determinación del contenido de antioxidantes endógenos "totales" que posee una muestra biológica conocidos como antioxidantes "scavengers" o "atrapadores" (son antioxidantes directos ya que actúan mediante la captura de radicales libres). El conocimiento sobre el contenido de los antioxidantes endógenos totales en una muestra indica la capacidad del sistema para resistir el daño oxidativo [16-18]. Muchos extractos vegetales poseen capacidad atrapadora de radicales libre debido a la presencia de compuestos polifenólicos. El objetivo del presente trabajo fue encontrar extractos vegetales de especies autóctonas, con actividad antioxidante y antimicrobiana, que puedan ser de aplicación en cosmética.

• MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La recolección del material vegetal de las especies de *Eupatoriumse* realizó en la provincia de Entre Ríos (ER), Argentina, como se detalla a continuación: *E. hecatanthum* (D.C.) Bak., arroyo El Espinillo, Paraná (ER), ejemplar de herbario J. de D. Muñoz 3537 (ERA); *E. macrocephalum* Less., arroyo El Espinillo, Paraná (ER), ejemplar de herbario J. de D. Muñoz 3536 (ERA) y *E. candolleianum* H et A., Parque Unzué, Gualeguaychú (ER), ejemplar de herbario J. de D. Muñoz 497 (ERA). Las especies mencionadas se recolectaron en Marzo 2013. El material vegetal se secó en una estufa de corriente de aire forzado a una temperatura menor a los 60°C durante 3 días. La molienda se realizó utilizando un molino a cuchillas.

Las muestras se pesaron y se acondicionaron en envases rotulados con el nombre de la especie y parte usada de la planta.

Preparación de los extractos

Extractos hidroalcohólicos (EtOH 80%): 25 g de material vegetal secado y molido de cada una de las especies, se extrajeron a reflujo por 2 horas con 200 mL de etanol al 80% en agua destilada durante 24 hs. Los extractos obtenidos se filtraron y el material vegetal se extrajo nuevamente con otros 200 mL de etanol al 80%. Los extractos se concentraron a presión reducida en un evaporador rotatorio a 40 °C. Una vez secos, se pesaron y disolvieron en pequeño volumen del mismo solvente.

Caracterización de los extractos por cromatografía en capa fina (TLC)

Los extractos se sembraron en cromatofolios de Silicagel 60 F254 (Merck) que se desarrollaron en los siguientes sistemas cromatográficos:

Sistema 1

Fase móvil: Acetato de etilo- tolueno- ácido fórmico- metanol (6:2:1:1)

Revelado: aspersion con 2-aminoetil-difenilborato (Natural Product Reagent, Sigma) (NPR) y observación del cromatograma a la luz UV de 366 nm.

Distancia de desarrollo: 8 cm.

Sistema 2

Fase móvil: cloroformo- acetona- ácido fórmico (5:4:1)

Revelado y distancia de desarrollo: ídem sistema 1

Los solventes empleados fueron calidad pro análisis (Sintorgan).

Caracterización de los extractos por cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

10,0 mg de cada uno de los extractos hidroalcohólicos de *E. macrocephalum*, *E. hecatanthum* y *E. cando-leanum*, se tomaron con 2 mL de metanol (grado HPLC) para obtener una concentración de 5 mg/mL, y se filtraron con un filtro de celulosa de 4 µm. La columna utilizada para la separación cromatográfica fue una SP C18 (250 mm x 10 mm, Nucleosil 100-7) y se usó una fase móvil (FM) compuesta por un gradiente de solventes formado por A (agua destilada: ácido acético 2%) y B (metanol: ácido acético 2%). Se inició el gradiente con 15% del solvente B y se alcanzó el 25% de B en 15 min.

A los 30 min se ascendió a 75 % de B y a los 35 min se llegó a 98% de B y se mantuvo durante 10 min. Finalmente en 2 min se retornó a las condiciones iniciales. La elución se realizó con un flujo 1 mL/min y se inyectaron 20 µL de cada uno de los extractos hidroalcohólicos de interés. La detección se realizó utilizando un detector UV/DAD a λ de 254 nm y 360 nm. Cada corrida cromatográfica se desarrolló en 60 min.

Determinación del poder antioxidante

Los materiales utilizados para la determinación del poder antioxidante mediante la técnica de TRAP (*Total Reactive Antioxidant Potential*) son:

- Solución de 2,2'-azo-bis-2 amidinopropano (ABAP) 20 mM.
- Solución de Luminol 40 µM en NaOH 0,1 M.
- Solución Trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E) 150 µM.

El poder o actividad antioxidante se estimó a partir de la cuantificación del contenido de antioxidantes endógenos totales en la muestra. La determinación se llevó a cabo en un medio de reacción formado por 2,2'-azo-bis-2 amidinopropano (ABAP) (20 mM) en buffer fosfato 50 mM pH 7,4 y 40 µM de luminol (en NaOH). La medida se realizó en un contador de centelleo líquido con el circuito de coincidencia desco-

nectado. Se realizó una medida basal (luminiscencia de los radicales peroxilo del luminol) y luego se agregaron alícuotas del extracto en estudio. Se produce una disminución de la emisión y la medida continúa registrándose hasta recobrar los valores basales. Se determinó el tiempo de inducción (ti), tiempo en que los niveles de luminiscencia se mantienen bajos debido a la presencia de antioxidantes en la muestra. El método se calibró utilizando un análogo hidrosoluble de la vitamina E (Trolox) como estándar o antioxidante de referencia y se calculó la capacidad antioxidante total de los extractos. Los resultados se expresan en μM de Trolox [19].

Ensayo de actividad biocida

Agar Mueller Hinton (BIOKAR)

- Placas descartables (Massobact)
- Cepas utilizadas:
 - *Escherichia coli* ATCC 8739
 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
 - *Klebsiella pneumoniae* (Anlis Malbran)
 - *Candida albicans* ATCC 10231

Se utilizó para la detección un sistema clásico basado en difusión sobre placas de agar Mueller Hinton. Se preparó una base de 10 mL de agar, luego de solidificada, se colocaron cilindros de acero inoxidable y se vertió una segunda capa inoculada con los microorganismos de prueba en crecimiento semi confluyente (aproximadamente 105 ufc/mL). Se dejó solidificar nuevamente, se invirtieron las placas y con un pequeño golpe se retiraron los cilindros; en el hueco remanente se sembraron 100 μL de las diluciones. Las placas ya sembradas se incubaron 24 h a 35°C, leyéndose finalmente los halos obtenidos con la ayuda de un calibre [20].

• RESULTADOS

Caracterización química de los extractos por TLC

En el perfil cromatográfico de los extractos de las 3 especies se observó la presencia de compuestos de tipo flavonoide, mayormente derivados de quercetina y fenilpropanoides del tipo del ácido cafeico. En *E. candolleanium* y *E. macrocephalumse* observó además la presencia de cumarinas. *E. candolleanium* fue la especie que presentó mayor número de bandas y de mayor intensidad, reveladas con NPR y observación a la luz ultravioleta de 366 nm.

Caracterización química de los extractos por HPLC

En las Figuras 1 a 3 se observan los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD para los extractos hidroalcohólicos de *E. candolleanium*, *E. macrocephalum* y *E. hecatanthum* respectivamente. En el perfil cromatográfico de *E. candolleaniumse* observaron dos picos mayoritarios, uno a t_r (tiempo de retención) = 7,7 min con máximos de absorción a 326 nm (sh) y 238 nm y otro de t_r = 21 min con máximos de absorción a 356 nm y 257 nm. En el perfil cromatográfico de *E. macrocephalumse* observaron dos picos mayoritarios t_r = 21,4 min (UV=346, 256 nm) y t_r = 25,4 (UV= 349, 270 nm). Se observó además un pico minoritario a t_r = 22,8 min (UV= 350, 265 nm). En el perfil cromatográfico de *E. hecatanthumse* observó un pico mayoritario con t_r =25 min (UV= 347 y 267 nm) y otros picos minoritarios que no se resolvieron en este sistema.

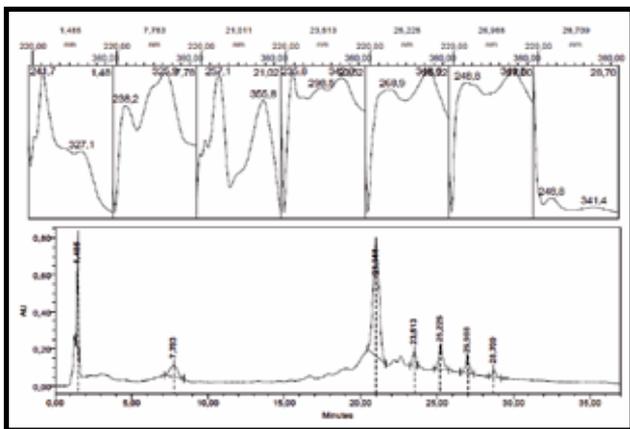


Figura 1: Perfil cromatográfico HPLC/DAD del extracto hidroalcohólico de *E. candolleianum*

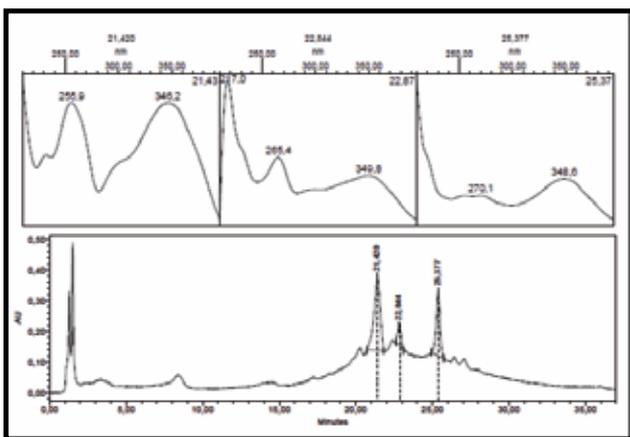


Figura 2: Perfil cromatográfico HPLC/DAD del extracto hidroalcohólico de *E. macrocephalum*

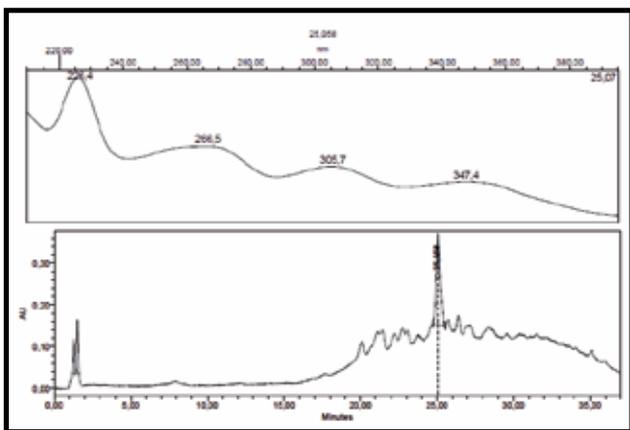


Figura 3: Perfil cromatográfico HPLC/DAD del extracto hidroalcohólico de *E. hecatanthum*

Poder antioxidante

Los resultados de la actividad antioxidante medida como el contenido de antioxidantes endógenos totales (poder antioxidante) se observan en la Tabla I. Los resultados obtenidos de los extractos de *Eupatorium* indican que las tres especies estudiadas presentan significativa actividad antioxidante.

Tabla I. Poder antioxidante de los extractos de las especies de *Eupatorium*

Extracto	TRAP (μM Trólox)
<i>Eupatorium hecatanthum</i>	439
<i>Eupatorium macrocephalum</i>	549
<i>Eupatorium candolleanum</i>	824

Actividad biocida

Los resultados de la actividad antimicrobiana se observan en la Tabla II. Solamente el extracto de *Eupatorium candolleanum* presentó una marcada actividad inhibitoria frente a *Candida albicans*.

Tabla II. Actividad antimicrobiana de los extractos de las especies de *Eupatorium*

Microorganismo	Extracto/dilución					
	<i>Eupatorium candolleanum</i>		<i>Eupatorium macrocephalum</i>		<i>Eupatorium hecatanthum</i>	
	1mg/mL	10mg/mL	1mg/mL	10mg/mL	1mg/mL	10mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm
<i>Escherichia coli</i>	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm
<i>Candida albicans</i>	< 6 mm	13 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm	< 6 mm

• DISCUSIÓN

Los extractos de las tres especies fueron analizados por TLC y HPLC/DAD. Los perfiles cromatográficos obtenidos indicaron la presencia de compuestos polifenólicos del tipo flavonoide derivados de la quercetina. Esto se deduce del color de las bandas reveladas con NPR en la TLC ya que los derivados de quercetina

presentan una coloración naranja característica y de los máximos de absorción al ultravioleta de los picos obtenidos en los cromatogramas de HPLC (entre 330 y 360 nm y a 272 nm característicos de flavonoides).

Además se observó la presencia de compuestos del tipo fenilpropanoide en *E. candolleianum* (un hombro alrededor de 330 nm y un máximo a 242 nm). Hay referencias en la literatura que este tipo de compuestos poseen capacidad antioxidante y como consecuencia podrían ser los responsables de la actividad de los extractos. En el ensayo utilizado para determinar la actividad antioxidante, el ABAP genera espontáneamente radicales libres centrados en carbono. En presencia de oxígeno molecular, cada radical libre reacciona con él generando radicales peroxilos, los cuales reaccionan con el Luminol generando radicales del Luminol. Estos radicales de Luminol, reaccionan a su vez con peróxido de hidrógeno o con oxígeno molecular, generando radicales peroxilo del Luminol, que al ser muy inestables se descomponen produciendo fotones (quimioluminiscencia). Los antioxidantes presentes en los extractos vegetales, reaccionan con los radicales peroxilo del ABAP y del Luminol, generando una disminución de la emisión de los radicales peroxilo del Luminol. El tiempo durante el que la emisión de luminiscencia permanece constante y baja (ti), hasta que se produzca el salto de quimioluminiscencia, es proporcional al contenido de antioxidantes endógenos totales presentes en el extracto vegetal [15, 19]. Los extractos acuosos con bajo poder antioxidante son aquellos cuyo contenido de antioxidantes endógenos totales es menor a 100 µM de Trolox. Sin embargo, cuando un extracto vegetal contiene una concentración de antioxidantes mayor a 300 µM de Trolox se considera que posee buena capacidad antioxidante [16, 21, 22]. Como dato comparativo el plasma humano y de ratas posee una capacidad antioxidante de 300± 50 µM de Trolox [15, 18, 23, 24]. Todos los extractos analizados presentaron una concentración de antioxidantes > a 400 µM de Trolox, lo que los hace potencialmente interesantes para su utilización como agentes antienviejecimiento en formulaciones cosméticas, siendo el extracto de *E. candolleianum* el de mayor actividad (824 µM).

• CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que los extractos de *E. candolleianum*, *E. hecatanthum* y *E. macrocephalum* presentan una marcada actividad antioxidante, probablemente debido a su contenido en compuestos polifenólicos, lo cual los hace potencialmente promisorios para su aplicación cosmética.◊

• REFERENCIAS

- [1] Clavin, M.; Teves, S.; Degrossi, J.; Martino, V.; D'Aquino, M. *Antimicrobianos de origen vegetal como conservantes para productos cosméticos*. *Cosmetica* 77 (21):53-60. 2011.
- [2] Lorencini, M.; Brohem, C.; Dieamant, G.; Zanchin, N.; Maibach, H. *Active ingredients against human epidermal ageing*, *Ageing Research Reviews* 15:100-115. 2014.
- [3] Zardini, E. *Etnobotánica de Compuestas Argentinas con especial referencia a su uso farmacológico*. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 3 (1): 77-99. 1984.
- [4] Toursarkissian, M. *Plantas Medicinales de la Argentina*. Ed. Hemisferio Sur. Bs. As. p. 30. 1980.
- [5] Amat, A. *Taxones de Compuestas Bonaerenses críticos para la investigación farmacológica*. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 2 (1): 23-26. 1983.
- [6] Filipov, A. *Medicinal plants of the central Chaco*. *Journal of Ethnopharmacology* 44: 181 -193. 1994.
- [7] Veja, M.; Carvalho, M.; Vieira, I.; Braz-Filho, R. *Chemical constituents from the paraguayian me-*

- dicinal plant, *Eupatorium macrocephalum* Less. Journal of Natural Medicine 62: 122-123. 2008.
- [8] Martínez, G.; Barboza, G. *Natural pharmacopoeia used in traditional toba medicine for the treatment of parasitosis and skin disorders (Central Chaco, Argentina)*. Journal of Ethnopharmacology 132: 82-100. 2010.
- [9] Vuoto, P. *Plantas útiles entre los Toba-Taksek*. Entregas del Instituto Tilcara 10: 12-76. 1981.
- [10] De Gutierrez, A.; Catalán, C.; Díaz, J.; Herz, W. *Sesquiterpene lactones, a labdane and other constituents of Urolepishecatantha and Chromolaena nortiana*. Phytochemistry 39: 795-800. 1995.
- [11] Cabrera, A. *Flora ilustrada de la Provincia de Entre Ríos*. Tomo VI, Parte VI. Colección Científica del INTA. Buenos Aires. pp. 172-185. 1974.
- [12] Arenas, P. *Etnobotánica Lengua-Maskoy*. Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura. Buenos Aires. p. 358. 1981.
- [13] Hieronymus, J. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias de Córdoba. Tomo IV, Entregas III y IV. pp. 337-378. 1882.
- [14] Clavin, M. Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Area Farmacognosia. "Propiedades biológicas de especies medicinales argentinas de *Eupatorium*. Aislamiento de principios bioactivos de *Eupatorium nortiana*". 2012.
- [15] Repetto, M. *Clinical use of chemiluminescence assay for the determination of systemic oxidative stress*. En: Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment, pp. 163-194. ISBN: 978-81-7895-334-2. 2008.
- [16] Desmarchelier, C.; Repetto, M.; Coussio, J.; Llesuy, S.; Ciccía, G. *Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity (TAR) of medicinal plants used in Southwest Amazonia (Bolivia and Perú)*. International Journal of Pharmacognosy 35:1-9. 1997
- [17] Repetto, M.; Llesuy, S. *Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers*. Brazilian Journal of Medicinal Biological Research, 35: 523-534. 2002.
- [18] Boveris, A.; Repetto, M.; Bustamante, J.; Boveris, A. D.; Valdez, L. *The concept of oxidative stress in pathology*. En: *Free Radical Pathophysiology*. (Alvarez S, Evelson P, Boveris A, eds.), Transworld Research Network, Kerala, India, p. 1 -17. ISBN: 978-81- 7895-311-3. 2008.
- [19] Lissi, E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD. *Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements*. Free Radical Biology & Medicine 18: 153-158. 1995.
- [20] Schwalbe, R.; Steel-Moore, L.; Goodwin, A. C. *Antimicrobial susceptibility protocols*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742. 2007.
- [21] Gorzalczy, S.; Muschietti, L.; Repetto, M.; Kartin, L.; Ferraro, G.; Martino, V.; Acevedo, C. *Choleretic and antioxidant effect of Eupatorium bunifuolium*. Pharmacologyonline 1: 139-147. 2008.
- [22] Repetto, M.; Boveris, A. *Bioactivity of sesquiterpenes: compounds that protect from alcohol-induced gastric mucosal lesions and oxidative damage*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 10:615-623. 2010.
- [23] Abalovich, M.; Llesuy, S.; Gutierrez, S.; Repetto, M. *Peripheral markers of oxidative stress in Grave's disease. The effects of Methimazole and 131 Iodine treatment*. Clinical Endocrinology 59: 321-327. 2003.
- [24] Musacco-Sebio, R.; Saporito-Magriñá, C.; Semprine, J.; Torti, H.; Ferrarotti, N.; CastroParodi, M.; Damiano, A.; Boveris, A.; Repetto, M. G. *Rat liver antioxidant response to iron and copper overloads*. Journal of Inorganic Biochemistry 137: 94-100. 2014.