

EXTRACTO DE MAYTENUS BOARIA MODULA LA REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA PRODUCIDA POR LITHRAEA CÁUSTICA

Francisca Contreras Hinojosa^{a*}

Josefa Vignau Pastor^a

Samantha Dathe Campos^a

Joaquín Vrsalovic Santibañez^a

Tamara Zagmutt Mendez^a

^aEstudiante de Medicina, Facultad de Medicina Clínica Alemana de Santiago - Universidad del Desarrollo.

Artículo recibido el 15 de agosto, 2021. Aceptado en versión corregida el 24 de diciembre, 2021.

RESUMEN

Introducción: El Litre (*Lithraea cáustica*), produce una reacción inmunológica de hipersensibilidad retardada, manifestándose a través de dermatitis, irritación, inflamación local, entre otros. El compuesto activo que produce la hipersensibilidad es el Litreol. Dentro de los tratamientos más comunes para estas reacciones se encuentran las cremas o medicamentos orales con corticoides, teniendo una serie de efectos adversos. Por otro lado, en la medicina étnica chilena, se ha observado que el Maitén (*Maytenus boaria*), tiene la capacidad de aliviar las erupciones cutáneas que ocasiona el Litre. **Hipótesis:** La administración de extracto de Maitén reduce la activación y proliferación de linfocitos T en un cultivo in vitro de células mononucleares de sangre periférica inducida por extracto de Litre, en individuos sensibles a este. **Diseño experimental:** Se estimó la prevalencia de la dermatitis por contacto al Litre en Chile. Se evaluó la proliferación, activación y viabilidad de cultivo in vitro de células mononucleares de sangre periférica cultivadas con extracto de Litre, extracto de Litre y Maitén, y extracto de Maitén por sí solo. **Resultado:** La dermatitis por Litre es frecuente en época de verano, cuando se registran las mayores temperaturas. Respecto a los estudios in vitro, el extracto de Litre induce activación significativa de linfocitos T, manteniendo su viabilidad. Por otro lado, el extracto de Maitén, a diluciones 1:10 y 1:100, produce muerte celular total. **Conclusión:** La mayor frecuencia de consultas por Litre es en verano. El extracto de Litre produce activación de linfocitos T. El extracto de Maitén a diluciones 1:10 y 1:100 es citotóxico en cultivo celular. **Palabras clave:** Litre, Dermatitis, Maitén, Hipersensibilidad tipo IV.

INTRODUCCIÓN (CMSP)

La *Lithraea cáustica* (Litre), es un árbol endémico de Chile distribuido entre las regiones IV y IX¹ en bosques esclerófilos². El litre pertenece a la familia de Anacardiáceas, familia que se caracteriza por causar dermatitis³. El tipo de reacción que causa el Litre es una hipersensibilidad de tipo retardada, que suele aparecer 24-48 horas posterior al contacto con el antígeno. Para que se provoque este tipo de respuesta, en primer lugar, el individuo debe exponerse al antígeno (sensibilización), y ante una segunda exposición a este (provocación), se produce hipersensibilidad⁴.

Diversos estudios han concluido que el compuesto activo que produce la hipersensibilidad de tipo retardada en el Litre es el 3-(pentadec-10-enyl)-catechol (Litreol) que es una catecol perteneciente a la familia de urushiol⁵. Cuando el Litreol entra en contacto con el huésped, sustancias del huésped activan al antígeno, que modificará proteínas propias del organismo provocando que el cuerpo las reconozca como extrañas⁶. Una vez que ocurre esto, las células de Langerhans detectan estas proteínas modificadas como un agente extraño y migran hacia los linfonodos presentado el antígeno. Por su parte, queratinocitos de la piel secretan IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, citoquinas que poseen efectos como quimiotaxis de células pro-inflamatorias, inducción de reactantes de fase aguda y activación de macrófagos.

Una vez activados, los linfocitos T migran al sitio en donde se encuentra el antígeno, ahí estos sufrirán una serie de cambios, empezando a secretar citoquinas como IFN-gamma, TNF- β , TGF, GM-CSF, entre otras, produciendo quimiotaxis y atracción de células pro-inflamatorias como macrófagos y neutrófilos al sitio de lesión⁷. Otros estudios han demostrado que los linfocitos CD4 tienen un efecto modulador sobre los linfocitos CD8 en contexto de hipersensibilidad retardada⁸. El ambiente pro inflamatorio induce daños tisulares produciendo heridas características de la dermatitis por contacto con urushiols tales como irritación, inflamación local, vesículas, flictenas, dolor y prurito.

La prevalencia de la hipersensibilidad al Litre no está descrita ni estudiada, por lo que se decidió realizar una estimación de dicho problema en un subgrupo de la población chilena, mediante una encuesta anónima y agrupando datos de diagnósticos de Clínica Alemana de Santiago que incluyeran la palabra Litre.

Actualmente los tratamientos más comunes para la alergia al Litre son cremas o ungüentos con esteroides y, en casos más severos, corticoides orales⁹, teniendo efectos secundarios como hipokalemia, miopatía, intolerancia a la glucosa, y pancreatitis, entre otras¹⁰.

La especie *Maytenus boaria* (Maitén) es un árbol que se encuentra mayoritariamente en Chile,

*Correspondencia: frcontrerash@udd.cl
2021, Revista Confluencia, 4(2), 15-19



Argentina, Brasil y Perú¹¹. En la tradición chilena se ha descrito a las hojas del Maitén como febrífugas, anodinas y que poseen propiedades curativas para las erupciones cutáneas que ocasiona el Litre¹². Este trabajo nace de la idea de incorporar un tratamiento de fácil obtención, menor costo económico y que no presenta los efectos adversos de los tratamientos clásicos, al manejo de la reacción inmune al litre. Es por esto que se decidió investigar la respuesta de un modelo in vitro con exposición al Litre, en presencia o ausencia de extracto de Maitén. Según lo mencionado, se propone que la administración de extracto de Maitén reduce la activación y proliferación de linfocitos T en un Cultivo in vitro de células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) inducida por extracto de Litre, en individuos sensibles a este. Dentro de los objetivos, se plantea estimar la prevalencia local de un subgrupo de población, determinar dosis adecuadas de los extractos en este modelo y evaluar sus efectos inmunomoduladores in vitro.

METODOLOGÍA

Diseño experimental

La investigación se llevó a cabo en tres etapas. La primera se realizó con el objetivo de determinar la prevalencia y tendencia de dermatitis por contacto causada por Litre en una población determinada, por medio de una encuesta *on-line* y datos recolectados de Clínica Alemana de Santiago (CAS), en donde los diagnósticos incluyeran la palabra Litre. En relación a la encuesta *on-line* los criterios de inclusión fueron pertenecer a la población chilena y poseer un diagnóstico certero de alergia o reacción de hipersensibilidad a Litre. Los criterios de exclusión incluyeron ser extranjero, no tener diagnóstico certero de alergia al Litre, reacción de hipersensibilidad o alergia sin certeza que correspondía a Litre.

En la segunda etapa se obtuvieron muestras de sangre de un individuo sensible al Litre y uno no sensible, esta selección fue de manera voluntaria y a partir del antecedente de haber sido expuesto a Litre con posterior reacción a este y sin reacción, respectivamente. Luego se realizaron cultivos in vitro de CMSP con distintas diluciones de Litre, para medir la proliferación celular de individuo sensibilizado al litre y uno que no lo estaba. Para eso se probaron distintas diluciones del extracto de Litre, buscando una dilución que no generara muerte celular. Se intentó con distintas diluciones de manera azarosa, logrando encontrar citotoxicidad en diluciones 1:10 y 1:100, manteniendo viabilidad celular a diluciones menores, realizando todos estos ensayos en triplicado.

En la tercera etapa, con nuevas muestras de los individuos sensibles y no sensibles, se realizaron cultivos de CMSP + Litre a diluciones determinadas + Maitén a diferentes diluciones. En la segunda y

tercera etapa se utilizó CMSP + PHA (mitógeno Fitoheماغlutina) como control positivo de proliferación y activación, y CMSP sin estímulo como control negativo de estas mismas variables. Como grupo control adicionales se utilizaron cultivos de CMSP + Litre a distintas diluciones + PHA en la segunda etapa, cultivo CMSP + Maitén a distintas diluciones en la tercera etapa.

Estimación de la prevalencia en Chile

Se determinó un valor estimado de prevalencia mediante una encuesta Google *on-line* de carácter anónimo. Además, se solicitaron datos anónimos de CAS, por medio del Centro de Informática Biomédica de la Universidad del Desarrollo, de pacientes registrados en urgencia, hospitalizados y en consultas ambulatorias, cuyo diagnóstico figure la palabra "Litre", incluyendo la fecha de consulta, el sexo y edad, para determinar y analizar tendencias. Los datos solicitados corresponden a diagnósticos entre enero del 2007 y octubre del 2017.

Extractos

Se recolectaron hojas de Litre y de Maitén de viveros certificados. Se utilizó un extractor Soxhlet y Rotavapor (BUCHI)¹³ para la obtención de extractos de ambas plantas, con método secuencial; la primera secuencia se realizó en proporción 1 gr de hoja a 12 ml de solvente apolar n-Hexano (CH₃(CH₂)₄CH₃ 99% de pureza, Merck Chemicals). La segunda secuencia con Diclorometano (CH₂Cl₂ 99,8% de pureza, Merck Chemicals), y la tercera secuencia con Metanol (CH₃OH 99,8% de pureza, Merck Chemicals). Se almacenó a -80°C.

Extracción de sangre

Se obtuvieron 3 muestras de 20 ml mediante venopunción y se almacenaron en tubos con heparina de litio (ANDES IMPORT), con previo consentimiento y firma.

Aislamiento de CMSP

Para aislar las CMSP se agregó 5 ml de Ficoll Histopaque (SIGMA ALDRICH) a un tubo falcon (Andes Import) de 15 ml y luego se agregó lentamente 7 ml de sangre. Posterior a esto, se centrifugó la mezcla a 1.700 rpm durante 20 minutos, en modo sin freno. Se realizó el conteo de células en cámara de Neubauer mediante conteo manual.

Cultivo celular de CMSP

En una primera ronda de cultivos se realizó una estandarización con PHA. Para esto se contó con 3 pocillos como cultivo control sin mitógeno (control basal), otros 3 con PHA (control estimulado). Para el control basal se agregó 400 ml de medio "AIMV" (Life Technologies) y para el control estimulado se agregó 400 ml de medio AIMV en conjunto con 4 uL de PHA (SIGMA ALDRICH). Se realizó otra ronda de cultivos, con extracto de Litre. Esta vez se realizó un triplicado de cada cultivo en las mismas condiciones que el



anterior, pero agregando extracto de Litre a 4 diluciones distintas (1:10; 1:100; 1:1.000; 1:10.000 y 1:100.000). Estos cultivos llevaron 400 ml de medio de cultivo + diluciones de extracto de Litre. Luego se volvió a realizar una serie de cultivos, con la dilución elegida del extracto de Litre y distintas diluciones de extracto de Maitén. También se realizó en triplicado y en las mismas condiciones que los anteriores, con la diferencia que se agregaron 3 cultivos con diluciones distintas de extracto de Maitén 1:10; 1:100; 1:1.000 (sin extracto de Litre).

Citometría de Flujo

Se realizó una cuantificación de linfocitos T mediante un citómetro de flujo FACSCANTO II (Beckton Dickinson), utilizando anticuerpos monoclonales para CD3 (Beckton Dickinson) y CD25 (Beckton Dickinson), y para evaluar viabilidad celular, las células se tiñeron con LIVE/DEAD kit (Life Technologies). Los datos obtenidos en el citómetro se analizaron con el software FlowJo.

Requerimientos bioéticos

Los procedimientos planteados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad del Desarrollo.

RESULTADO

Estimación de la prevalencia y tendencia de una porción de la población chilena para sensibilidad al Litre

A partir de la encuesta *on-line*, se pudo determinar una proporción estimada de personas que han presentado sensibilidad al Litre. La encuesta fue realizada a 363 personas, de las cuales 62,3% corresponden al sexo femenino y 37,7% al masculino. De estos, el 39,9% tienen entre 21 y 30 años, 36,4% entre 11 y 20 años, 9,6% entre 31 y 40 años, lo cual va disminuyendo progresivamente al aumentar en edad. En relación a la pregunta si habían tenido alergia al Litre, el 48,5% refiere no haber presentado reacción, 34,4% desconoce y 17,1% respondió que presentaron una respuesta de hipersensibilidad.

Para el desarrollo de la descripción de una tendencia de sensibilidad al Litre en Chile, se utilizaron los datos de pacientes que habían consultado por "Litre" en CAS. A partir de esta información, comprendida entre el 2007 hasta el presente año, se han registrado 253 consultas por dermatitis al Litre, observando que estas son en su gran mayoría de personas de sexo masculino, comprendidos en un rango etario entre 0-19 años, y con una mayor frecuencia entre los meses de septiembre a enero.

Determinación de la dilución apropiada de Litre

Se observó que para el individuo no sensible al Litre, el control negativo no presenta proliferación ni activación, pero sí viabilidad; y para dilución de Litre 1:10 y 1:100 se presenta muerte celular total. Por otro

lado, para la dilución de Litre 1:1.000 se vió baja activación (5,4%) y no se observó proliferación celular, conservando viabilidad. Para la dilución de Litre 1:10.000 se vió una menor activación (1,79%), sin presentar proliferación y manteniendo viabilidad (Figura 1). Por último, para la dilución de Litre 1:100.000 se observó mínima activación (0,16%), sin proliferación y manteniendo viabilidad.

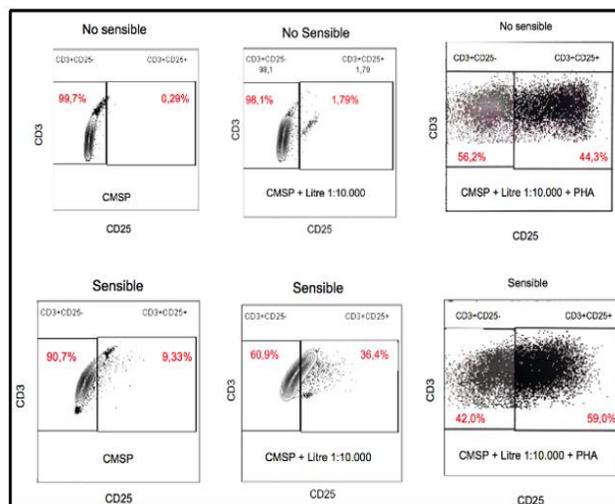


Figura 1. Dot Plot de activación de Linfocitos T del suero no sensible (fila superior) y de sujeto sensible (línea inferior) e histograma de activación de Linfocitos T. Se cultivaron CMSP + Litre a diluciones indicadas y se evaluó activación mediante citometría de flujo usando marcador CD25. Se observó que la dilución de Litre 1:10.000 es la que produce mayor activación en Linfocitos T, en comparación a las demás diluciones.

Para los resultados obtenidos del individuo sensible, se observó que el control negativo presentó activación de LT (9% de las células totales), viabilidad y no se vió proliferación (Figura 1). Para las diluciones de Litre 1:10 y 1:100, hubo muerte celular total, y para el resto de las diluciones de Litre 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 se vió activación y viabilidad celular sin presentar proliferación (Figura 1). La mayor activación se encontró en la dilución de Litre 1:10.000 con 36,4%.

Al realizar el cultivo de CMSP con PHA, en ambos individuos (sensible y no sensible) hubo proliferación y activación de LT, manteniendo la viabilidad de estos. En cambio, al realizar el mismo cultivo agregando extracto de Litre 1:10.000 disminuyó significativamente la proliferación de los LT, pero se mantuvo la activación y viabilidad del cultivo (Figura 2). Para los cultivos con PHA y extracto de Litre, se observó muerte celular total en las diluciones 1:10 y 1:100.

Por otro lado, para las diluciones de Litre 1:1.000 y 1:10.000 no se observó proliferación celular de LT, pero sí se mantuvo su activación y viabilidad. Por último, a la dilución de Litre 1:100.000 se denota nuevamente proliferación celular al cultivar junto con PHA y Litre, algo que no se observó a concentraciones mayores (Figura 2).



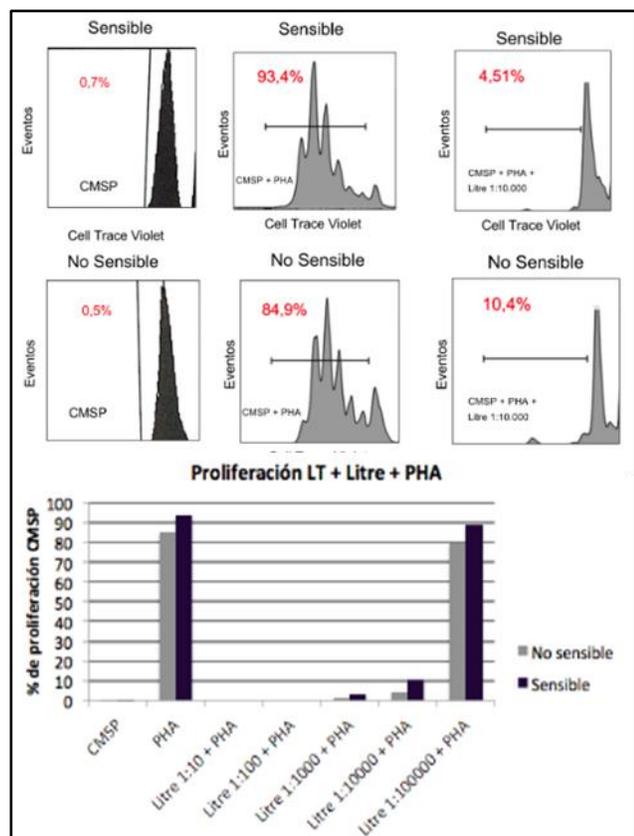


Figura 2. Resultado para citometría de Linfocitos T del individuo sensible (fila superior) y del individuo no sensible (fila inferior) e histograma de proliferación de Linfocitos T. Se cultivaron CMSP + PHA + Litre a diluciones indicadas y se evaluó proliferación mediante citometría de flujo usando Cell Trace Violet. Se observa que Litre en dilución 1:1000 y 1:10.000 produce una inhibición de la proliferación inducida por PHA.

Determinación de la dilución adecuada de Maitén

Para determinar si el extracto de Maitén inhibe la activación de CMSP inducida por extracto de Litre, se realizó un cultivo con CMSP junto con Litre a dilución 1:10.000 y Maitén a diluciones 1:10 y 1:100 en individuo sensible y no sensible al Litre. A partir de este procedimiento se observó muerte celular total de los linfocitos T en las dos diluciones de Maitén (1:10 y 1:100) en ambos individuos (sensible y no sensible al Litre), por lo cual no se observa activación ni proliferación de las CSMP.

DISCUSIÓN

Lo que se conoce hasta hoy acerca del Litre son características de su compuesto activo, 3-(pentadec-10-enil)-catechol,⁵ y caracterización de su mecanismo de acción al generar hipersensibilidad retardada mediada por linfocitos T en individuos sensibles^{4,6,8}. Sin embargo, los estudios para determinar mecanismos de acción, no han incluido estudios celulares ni han realizado una búsqueda de un antídoto alternativo a los convencionales para la

dermatitis por Litre, los que generan efectos adversos¹⁰. Existen antecedentes que sugieren cualidades curativas de la especie *Maytenus Boaria* a la dermatitis por contacto producida por Litre¹².

Debido a estos antecedentes, es posible otorgar valor científico a este estudio, donde en primer lugar se determinó lo que produce la fase polar del extracto de Litre (donde se encuentra el Litreol¹) a los linfocitos T en un cultivo celular de CMSP (Figura 1).

Se sabe que la dermatitis ocasionada por Litre se produce debido a la activación y posterior proliferación de los linfocitos T^{4,7,8}, lo cual ha sido representado parcialmente con la metodología aplicada en este estudio. Es posible observar que en cultivos de CMSP agregando Litre en diluciones de 1:10.000 y 1:100.000, el individuo sensible presenta una mayor activación de la población de linfocitos T CD3+ que la esperada, considerando que es una expansión monoclonal. En el cultivo de individuo no sensible no se observa activación, lo que indicaría que la respuesta es antígeno específica al Litre en el individuo sensible (Figura 1).

Se determinó que la dilución adecuada de Litre es 1:10.000 debido a que en las soluciones de mayor concentración se observan efectos citotóxicos y, por otro lado, al cultivar las células con soluciones más diluidas que la escogida, se observa menor activación de linfocitos, por lo que la dilución de 1:10.000 de Litre corresponde a la dilución óptima para generar una respuesta antígeno específica, manteniendo viabilidad de las células y generando mayor activación de linfocitos en este individuo sensible en particular.

Se concluye que el Litre es el agente que activa a los linfocitos del individuo sensible, ya que al cultivar CMSP del sujeto no sensible junto con el mismo extracto no se presenta activación celular (Figura 1). Sin embargo, no es posible observar proliferación celular a ninguna dilución de extracto de Litre. Si bien la proliferación de linfocitos T en la respuesta de dermatitis por contacto es conocida⁷, es prudente considerar que se está evaluando una respuesta antígeno específica, en condiciones que no son idénticas a las fisiológicas, por lo que se debería refinar la técnica para poder determinar si se genera proliferación de linfocitos para continuar con los experimentos.

En relación a la determinación de los posibles efectos moduladores del extracto de Maitén sobre cultivos de CMSP estimulados con extractos de Litre, solamente fue posible observar muerte celular total a diluciones 1:10 y 1:100 de extracto de Maitén. No fue posible evaluar efectos moduladores de otras dosis de extracto de Maitén por falta de tiempo. Considerando lo anterior, los resultados no implican que este no posea un efecto modulador sobre CMSP estimuladas con Litre, más bien dejan abierta la posibilidad de nuevos estudios a partir de los datos expuestos en nuevos modelos.



En cuanto a la estimación de la prevalencia de sensibilidad al Litre, la metodología empleada no es la más adecuada puesto que se enfoca en una muestra no representativa de la población. Sin embargo, los datos obtenidos por la encuesta permiten hacer correlaciones parciales en conjunto con los datos obtenidos de CAS. Se sabe que el Litre actúa de manera más agresiva conforme el aumento de la temperatura ambiental¹; en concordancia a esto, en CAS se concentraron las consultas por Litre entre septiembre y enero siendo meses en que se registran mayores temperaturas. A partir de los resultados arrojados por la encuesta en línea y los datos de CAS, se observó una mayor cantidad de individuos afectados por el Litre en un rango etario de 11-20 años.

CONCLUSIÓN

En este estudio se evidenció mayor frecuencia de consultas por Litre en verano. A la vez, el extracto de Litre produce inducción de activación de linfocitos T e inhibe la proliferación causada por PHA. Finalmente, el extracto de Maitén a diluciones 1:10 y 1:100 es citotóxico en cultivo celular. Estos resultados son un paso más en la línea de incorporar tratamientos de fácil obtención y menores efectos adversos, en la medicina moderna. Dentro de las limitaciones del estudio se encuentran que las condiciones del modelo in vitro están lejos de simular un ambiente fisiológico, por lo que sería importante avanzar en modelos animales.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración del Centro de Informática Biomédica y el financiamiento de la Facultad de Medicina y del Programa de Inmunología Traslacional.

Agradecemos también a los docentes Flavio Carrión, Paola Murgas y Pablo Vial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Urzúa A, Sotes G, Echeverría J. Presence of 3-(pentadec-10-enyl)-catechol allergen in the epicuticular components of *Lithraea cáustica* (Anacardiaceae). *Bol Latinoam Caribe plantas Med Aromát* [Internet]. 2011 [citado el 11 de agosto 2017];10(6):590-4. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85622434011.pdf>
2. Donoso C. Reseña ecológica de los bosques mediterráneos de Chile. *Bosque* [Internet]. 1982 [citado el 11 de agosto 2017];4(2):117-46. Disponible en: <http://revistas.uach.cl/pdf/bosque/v4n2/art04.pdf>
3. Pell SK. Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae) (Doctoral dissertation) [Internet]. 2004 [citado el 11 de agosto 2017]. Disponible en: https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_dissertations/1472/
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular+* Student Consult. Elsevier: España; 2015.
5. Gambaro V, Chamy MC, von Brand E, Garbarino JA. 3-(Pentadec-10-enyl)-catechol, a new allergenic compound from *Lithraea cáustica*. *Planta Méd* [Internet]. 1986 [citado el 11 de agosto 2017];20:20-2. Disponible en: <https://doi.org/10.1055/s-2007-969056>
6. Kalergis AM, López CB, Becker MI, Díaz MI, Sein J, Garbarino JA, De Ioannes AE. Modulation of fatty acid oxidation alters contact hypersensitivity to urushiols: role of aliphatic chain beta-oxidation in processing and activation of urushiols. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1997 [citado el 11 de agosto 2017];108(1):57-61. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12285632>
7. Kalish RS. Recent developments in the pathogenesis of allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol* [Internet]. 1991 [citado el 11 de agosto 2017];127(10):1558-63. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1929465/>
8. López CB, Kalergis AM, Becker MI, Garbarino JA, De Ioannes AE. CD8+ T cells are the effectors of the contact dermatitis induced by urushiol in mice and are regulated by CD4+ T cells. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 1998 [citado el 11 de agosto 2017];117(3):194. Disponible en: <https://doi.org/10.1159/00024010>
9. Mayo clinic [Internet] United States: Contact dermatitis – Diagnosis and Treatment [Internet]. 2021 [citado el 11 de agosto 2017]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/contact-dermatitis/diagnosis-treatment/drc-20352748>
10. Boulet LP. Perception of the role and potential side effects of inhaled corticosteroids among asthmatic patients. *Chest* [Internet]. 1998 [citado el 11 de agosto 2017];113(3):587-92. Disponible en: <https://doi.org/10.1378/chest.113.3.587>
11. Dollenz O. *Maytenus Boaria* Molina (Celastraceae) en la Región de Magallanes, Chile. *Maytenus Boario* Molina (Celastraceae) in the Magellan Region, Chile. *Anales del Instituto de la Patagonia* [Internet]. 2003 [citado el 11 de agosto 2017];31:87-9. Disponible en: <http://www.analesdelinstitutodelapatagonia.cl/index.php/analespatagonia/article/view/471>
12. Ministerio de Salud de Chile [Internet]. Maitén [Internet] Santiago, Chile: 2021 [citado el 31 agosto de 2017]. Disponible desde: <http://www.minsal.cl/portal/url/item/7d98ad06d34083d5e04001011f016dbb.pdf>
13. Redfern J, Kinninmonth M, Burdass D, Verran J. Using soxhlet ethanol extraction to produce and test plant material (essential oils) for their antimicrobial properties. *J Microbiol Biol Educ* [Internet]. 2014 [citado el 11 de agosto 2017];15(1):45-6. Disponible en: <http://doi.org/10.1128/jmbe.v15i1.656>

