

ผลของสารสกัดชาเขียวต่อการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง
ในหนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กีไอ

Effect of Green Tea Extract on Hemolysis in
Plasmodium berghei-infected mice

จริยา นิลจันทร์^{1*}, อุบลวรรณ ใจหาญ¹, สมเดช ศรีชัยรัตนกุล², ชัยรัตน์ อุทัยพิบูลย์³
และวรวิทย์ สมศักดิ์⁴

Jariya Niljan, Ubonwan Jaihan, Somdet Srichairatanakool, Chairat Uthapibull
and Voravuth Somsak

¹นักศึกษาปริญญาตรี สาขาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น ²รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ³ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ⁴อาจารย์ สาขาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น

Abstract

Cause of death in malaria especially severe hemolytic anemia has been studied due to oxidative stress induction during malaria infection. In addition, green tea has been reported to protect red blood cell destruction by oxidative stress condition. Hence, we have investigated the effect of green tea on hemolysis in *Plasmodium berghei*-infected mice. ICR mice were infected intraperitoneally with 1×10^7 infected red blood cells of *P. berghei*, and these infected mice were subsequently treated orally by gavage with green tea extract for 4, 6, and 10 consecutive days. Parasitemia and hematocrit were daily monitored. For short-term treatment by green tea, 4 or 6 days, hemolysis during malaria infection is protected significantly. However, infected mice treated with green tea for 10 days do not have any protection. It can be concluded that hemolysis during malaria infection can be protected by green tea in short-term treatment but not in long-term.

Keywords: green tea extract, hemolysis, *Plasmodium berghei*

บทคัดย่อ

สาเหตุการตายด้วยโรคมาลาเรียอย่างหนึ่ง คือ การเกิดภาวะโลหิตจางจากการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงอย่างรุนแรง เนื่องจากการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันจากการติดเชื้อมาลาเรีย และการศึกษาเกี่ยวกับชาเขียวพบว่าสามารถป้องกันการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงจากภาวะเครียดออกซิเดชันได้ ดังนั้นเราจึงสนใจศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวต่อการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงในหนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กีไอ ทำการติดเชื้อหนูทดลองสายพันธุ์ ICR ด้วยเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กีไอจำนวน 1×10^7 เข้าทางช่องท้อง ทำการให้สารสกัดชาเขียวทางหลอดอาหารเป็นเวลา 4, 6 และ 10 วันติดต่อกัน จากนั้นจึงตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อและจำนวนเม็ดเลือดแดงอัดแน่นทุกวัน พบว่าการให้สารสกัดชาเขียวระยะสั้นที่ 4 และ 6 วันนั้นสามารถป้องกันการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อได้ แต่อย่างไรก็ตามหากให้สารสกัดชา

เขียวระยะยาวที่ 10 วัน ไม่สามารถป้องกันการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงได้ จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า การแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงจากการติดเชื้อมาลาเรียนั้น สามารถป้องกันได้ด้วยการให้สารสกัดชาเขียวในระยะเวลาสั้นๆ

คำสำคัญ: สารสกัดชาเขียว, การแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง, พลาสมาโมเดียมเบอร์กีไอ

บทนำ

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญในปัจจุบัน โดยเฉพาะประเทศที่ตั้งอยู่ในบริเวณเขตร้อนและร้อนชื้นของโลก รวมทั้งประเทศไทยด้วย มาลาเรียเกิดจากเชื้อมาลาเรียพลาสมาโมเดียมซึ่งมีอยู่หลายสายพันธุ์ โดยสามารถติดต่อได้จากการมียุงก้นปล่อง (*Anopheles mosquito*) เป็นพาหะที่สำคัญ (Rodriguez, Uribe et al, 2011) เนื่องจากโรคมาลาเรียทำให้เกิดการเสียชีวิตได้ โดยสาเหตุของการเสียชีวิตด้วยโรคมมาลาเรียนั้น ได้แก่ การเกิดมาลาเรียขึ้นสมอง (Cerebral malaria) การเกิดมาลาเรียขณะตั้งครรภ์ (Pregnant malaria) และการเกิดภาวะโลหิตจางจากการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงอย่างรุนแรง (Severe hemolytic anemia) โดยการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงนั้นเป็นภาวะหนึ่งที่เกิดขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อมาลาเรีย ซึ่งจะเกิดภายในหลอดเลือด โดยการติดเชื้อจะเป็นการไปกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ในร่างกายและในเม็ดเลือดแดง ส่งผลให้มีอนุมูลอิสระมากขึ้นในร่างกาย รวมทั้งการไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ต่อต้านอนุมูลอิสระ จึงส่งผลให้เม็ดเลือดแดงแตกทำลายและเกิดภาวะโลหิตจางตามมา (Nanda and Das, 2000) ดังนั้นการลดหรือป้องกันการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงจากการติดเชื้อมาลาเรียนั้นจึงยังคงมีความจำเป็น จากการศึกษาพบว่ามีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แต่พืชสมุนไพรที่เราสนใจคือชาเขียว

ชาเขียว (*Camellia sinensis*) เป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้เป็นเครื่องดื่มบริโภคกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากคุณประโยชน์ของชาเขียวที่มีอยู่มากมาย เช่น การทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การลดและป้องกันภาวะเครียดออกซิเดชันในหลอดเลือดและในร่างกาย และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ นอกจากนี้ชาเขียวยังสามารถช่วยป้องกันการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง และช่วยให้เม็ดเลือดแดงมีอายุที่นานขึ้นในภาวะเครียดออกซิเดชันได้ (Ounjaijean, Thephinlap et al, 2008) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวที่มีผลต่อการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงในหนูทดลองที่มีการติดเชื้อพลาสมาโมเดียมเบอร์กีไอ

วิธีการทดลอง

หนูทดลอง

หนูทดลองเพศเมียสายพันธุ์ ICR อายุ 6-8 สัปดาห์ที่เลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 22-25 องศาเซลเซียส และความมืด-สว่าง 12 ชั่วโมง โดยได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปและน้ำดื่มสะอาดตลอดการทดลอง

เชื้อมาลาเรียที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อมาลาเรียที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเชื้อพลาสมาโมเดียมเบอร์กีไอสายพันธุ์ ANKA โดยจะทำการเลี้ยงไว้ในหนูทดลอง และทำการถ่ายทอดเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตมากขึ้นด้วยการฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูทดลองตัว

ใหม่ ซึ่งการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสมาโมเดียมเบอร์กิไอจะตรวจติดตามด้วยการย้อมสี Giemsa และดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit) ทำได้โดยการเก็บเลือดจากหางหนูทดลองในหลอด Heparinized hematocrit tube เมื่อทำการปิดหลอดด้านหนึ่งด้วยดินน้ำมันแล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที และนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น

การเตรียมสารสกัดชาเขียว

นำใบชาเขียวอบแห้งบดละเอียดปริมาณ 10 กรัมมาทำการสกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตรเป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นนำมาทำการกรองผ่านกระดาษกรอง และเก็บส่วนของสารสกัดชาเขียวที่ได้ในหลอดทดลองสะอาดที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส (Vuong, Golding et al, 2011) ในการตรวจวิเคราะห์ระดับของสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในสารสกัดชาเขียวนั้น จะใช้วิธี Folin-Ciocalteu (Pekal, Drozd et al, 2012) โดยสารสกัดชาเขียวที่มีระดับของสารประกอบโพลีฟีนอลรวม 500-700 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อไป

ยาด้านมาลาเรียมาตรฐาน

ยาด้านมาลาเรียมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษานี้ คือไพริเมตามีน (pyrimethamine) โดยทำการละลายยาใน DMSO ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวในหนูทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวต่อการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงในหนูทดลองนั้น จะใช้วิธีการมาตรฐานของ Peter's suppressive test (Peters, Portus et al, 1975) โดยแบ่งหนูทดลองออกเป็นกลุ่มๆ ละ 5 ตัว ติดเชื้อพลาสมาโมเดียมเบอร์กิไอในหนูทดลองทุกกลุ่มจำนวน 1×10^7 จากนั้นทำการให้สารสกัดชาเขียว 15 กรัมต่อกิโลกรัมทางหลอดอาหาร โดยใช้ยาด้านมาลาเรียมาตรฐานไพริเมตามีนให้หนูทดลองกลุ่มควบคุมบวกและให้น้ำเปล่ากับหนูทดลองกลุ่มควบคุมลบ โดยทำการให้สารสกัดชาเขียวเป็นเวลา 4, 6 และ 10 วันติดต่อกัน และทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

สถิติ

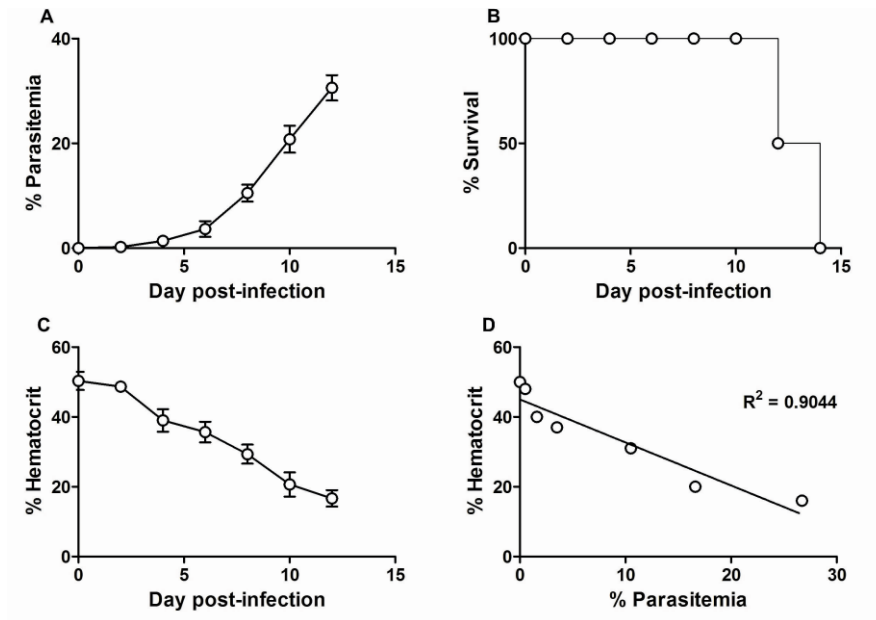
การทำกราฟและการวิเคราะห์ค่าทางสถิติจะใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism Software การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างนั้นจะใช้ one way ANOVA และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะพิจารณาที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$

ผลการทดลอง

การเจริญเติบโตของเชื้อพลาสมาโมเดียมเบอร์กิไอในหนูทดลอง

เชื้อพลาสมาโมเดียมเบอร์กิไอในหนูทดลองสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นไปและจำนวนของเชื้อจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆเป็นลำดับจนกระทั่งหนูทดลองตายในวันที่ 13 (รูปที่ 1A-B) ในขณะที่เชื้อมีการ

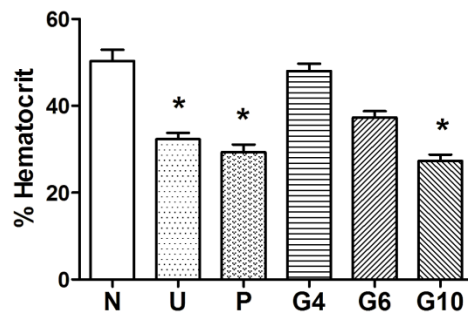
เจริญเติบโตมากขึ้นเรื่อยๆ การแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงก็จะมีมากขึ้นเช่นเดียวกันซึ่งจะสอดคล้องกับระดับของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่ลดลงเป็นลำดับ (รูปที่ 1C) โดยระดับของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่วัดได้จะมีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 1D)



รูปที่ 1 การเจริญเติบโตของเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอไอในหนูทดลอง (A) เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อ พลาสโมเดียมเบอร์เกอไอในหนูทดลอง (B) เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของหนูทดลองที่ติดเชื้อ พลาสโมเดียมเบอร์เกอไอ (C) เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นในหนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอไอ (D) ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอไอและเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในหนูทดลอง

ผลของสารสกัดชาเขียวต่อการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง

จากรูปที่ 2 พบว่าหนูทดลองในกลุ่ม U ที่มีการติดเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอไอ และไม่ได้รับทั้งสารสกัดชาเขียวและยามาลาเรียมาตรฐานไพริเมทามีน จะมีระดับของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับหนูทดลองในกลุ่ม P ที่ติดเชื้อและได้รับยาด้านมาเรียมาตรฐานเพียงอย่างเดียว แต่หากหนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอไอและได้รับสารสกัดชาเขียว พบว่าระดับของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่าที่ปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่ม N ที่ไม่ได้รับการติดเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอไอ แต่ผลของสารสกัดชาเขียวนั้นสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงได้หากหนูทดลองได้รับสารสกัดชาเขียวเป็นเวลา 4-6 วัน (G4 และ G6) จากผลการทดลองยังพบว่าเมื่อหนูทดลองที่ติดเชื้อได้รับสารสกัดชาเขียวเป็นเวลา 10 วัน ระดับของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีระดับที่ใกล้เคียงกับหนูทดลองในกลุ่ม U (G10)



รูปที่ 2 แสดงผลของสารสกัดชาเขียวต่อการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงในหนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม-เบอร์เกอ N (normal) หนูทดลองปกติที่ไม่ได้ติดเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอ U (untreated) หนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอแต่ไม่ได้รับสารสกัดชาเขียวหรือยา P (pyrimethamine) หนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม-เบอร์เกอและได้รับยาต้านมาลาเรียมาตรฐานไพริเมตามีน G4 (GTE 4 days) หนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม-เบอร์เกอและได้รับสารสกัดชาเขียวเป็นเวลา 4 วันติดต่อกัน G6 (GTE 6 days) หนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม-เบอร์เกอและได้รับสารสกัดชาเขียวเป็นเวลา 6 วันติดต่อกัน G10 (GTE 10 days) หนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม-เบอร์เกอและได้รับสารสกัดชาเขียวเป็นเวลา 10 วันติดต่อกัน * $p < 0.05$

การอภิปรายผล

จากการที่โรคมลาเรียยังคงเป็นปัญหาในปัจจุบัน เนื่องจากยังคงมีการเสียชีวิตด้วยโรคนี้เป็นประจำทุกปี ซึ่งสาเหตุหนึ่งของการตายด้วยโรคมลาเรียนั้นคือการเกิดภาวะแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงอย่างรุนแรงอันเนื่องมาจากการมีภาวะเครียดออกซิเดชันมากขึ้น จากการศึกษาพบว่าภาวะเครียดออกซิเดชันจะมีระดับที่มากขึ้นและมีความสัมพันธ์กับปริมาณของเชื้อมาลาเรียที่มี และจากการที่มีภาวะเครียดออกซิเดชันจึงทำให้เม็ดเลือดแดงทั้งเม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ มีความเปราะบางและแตกทำลายได้ง่าย (Rodriguez, Uribe et al, 2011) การหาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการรักษาหรือป้องกันการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงจากการติดเชื้อมาลาเรียจึงมีความจำเป็น โดยในการศึกษานี้ให้ความสนใจสารสกัดชาเขียว จากการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดชาเขียวจำนวนมาก พบว่าสามารถช่วยรักษาและลดภาวะเครียดออกซิเดชันรวมทั้งลดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายได้ (Khalaf, Moselby et al, 2012) ดังนั้นการศึกษานี้จึงศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวต่อการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงในหนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอ จากการศึกษาพบว่าหนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอ-ไอจะมีระดับของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดลง เนื่องจากการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันจากการติดเชื้อ และจากการใช้ยาต้านมาลาเรียมาตรฐานไพริเมตามีนที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ แต่ทำให้เกิดการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงมากอย่างมีนัยสำคัญ เพราะยาต้านมาลาเรียมาตรฐานไพริเมตามีนนอกจากจะทำให้เชื้อตายแล้วยังสามารถทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันได้ด้วยเช่นกัน (Legorreta-Herrera, Retana-Ugalde et al, 2010) แต่สิ่งที่น่าสนใจคือสารสกัดชาเขียวสามารถป้องกันการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงจากการติดเชื้อได้เนื่องจากฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวในการต้านอนุมูลอิสระ และการลดภาวะเครียดออกซิเดชัน แต่หากหนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอได้รับสารสกัดชาเขียวเป็นเวลา 10 วัน การแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงจะเพิ่มมากขึ้นอย่างมี

นัยสำคัญเนื่องจากเคยมีรายงานว่า สารสกัดชาเขียวนั้นสามารถเป็นได้ทั้งสารต้านอนุมูลอิสระและสารอนุมูลอิสระ (Ko, Li et al, 2006) ขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลาในการออกฤทธิ์ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ว่า หนูทดลองที่ได้รับสารสกัดชาเขียวเป็นเวลา 4 และ 6 วันติดต่อกัน ระดับของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นจะยังคงปกติเพราะฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวที่ยังคงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แต่เมื่อหนูทดลองได้รับสารสกัดชาเขียวเป็นเวลา 10 วัน การแตกของเม็ดเลือดแดงจะมากขึ้น อาจเป็นเพราะฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวที่กลายเป็นสารอนุมูลอิสระนั่นเอง จากการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถนำมาใช้ในการช่วยลดและป้องกันการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง ในหนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม-เบอร์เกียไอได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากสำนักวิจัยและบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น, ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมโปรตีน-ลิแกนและชีววิทยาโมเลกุล ไบโอเทค สวทช.

เอกสารอ้างอิง

- Khalaf, A. A., W. A. Moselhy, et al. (2012). "The protective effect of green tea extract on lead induced oxidative and DNA damage on rat brain." *Neurotoxicology* 33(3): 280-289.
- Ko, C. H., K. Li, et al. (2006). "Pro-oxidative effects of tea and polyphenols, epigallocatechin-3-gallate and epigallocatechin, on G6PD-deficient erythrocytes in vitro." *Int J Mol Med* 18(5): 987-994.
- Legorreta-Herrera, M., R. Retana-Ugalde, et al. (2010). "Pyrimethamine induces oxidative stress in *Plasmodium yoelii* 17XL-infected mice: a novel immunomodulatory mechanism of action for an old antimalarial drug?" *Exp Parasitol* 126(3): 381-388.
- Nanda, N. K. and B. S. Das (2000). "Presence of pro-oxidants in plasma of patients suffering from falciparum malaria." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(6): 684-688.
- Ounjaijean, S., C. Thephinlap, et al. (2008). "Effect of green tea on iron status and oxidative stress in iron-loaded rats." *Med Chem* 4(4): 365-370.
- Pekal, A., P. Drozd, et al. (2012). "Screening of the antioxidant properties and polyphenol composition of aromatised green tea infusions." *J Sci Food Agric* 92(11): 2244-2249.
- Peters, W., J. H. Portus, et al. (1975). "The chemotherapy of rodent malaria, XXII. The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity." *Ann Trop Med Parasitol* 67(2): 155-171.
- Rodriguez, J. C., G. A. Uribe, et al. (2011). "Epidemiology and control of malaria in Colombia." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 Suppl 1: 114-122.
- Vuong, Q. V., J. B. Golding, et al. (2011). "Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water." *J Sep Sci* 34(21): 3099-3106