Journal of
Arak University of Medical Sciences

October & November 2019. Vol 22. Issue 4

Research Paper

Evaluation of Antioxidant and Anticancer Effects of Nanoemulsions Prepared Using Dill Essential Oil

Haleh Sadat Tavakkol Afshari[1], *Masoud Homayouni Tabrizi[1], Touran Ardalan[2]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
2. Department of Chemistry, Faculty of Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Tavakkol Afshari HS, Homayouni Tabrizi M, Ardalan T. [Evaluation of Antioxidant and Anticancer Effects of Nanoemulsions Prepared Using Dill Essential Oil (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2019; 22(4):40-51. https://doi.org/10.32598/JAMS.22.4.40

https://doi.org/10.32598/JAMS.22.4.40

CC BY NC

Article Info:
Received: 10 Jun 2019
Accepted: 14 Aug 2019
Available Online: 01 Oct 2019

Key words:
Nanoemulsion, Dill, Antioxidant, Anticancer

ABSTRACT

Background and Aim Among nano-pharmaceutical materials, nanoemulsions are an important tool in the field of nanotechnology. They have been designed for clinical and therapeutic applications. Since the therapeutic efficacy of cancer is measured by the ability of the drug to reduce and eliminate tumors without damaging healthy tissues, nanoemulsions can be useful as a targeted drug carrier. Therefore, we are going to study the antioxidant and anticancer effects of nanoemulsions prepared using dill essential oil.

Methods and Materials Evaluate the antioxidant properties, we used DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid]) tests. We also applied MTT assay for the evaluation of induced cytotoxicity in liver hepatocellular carcinoma cells and normal human umbilical vein endothelial cells.

Ethical Considerations The Research Ethics Committee of Islamic Azad University (Mashhad Branch) approved this study (Code: IR.IAU.MSHD.REC.1398.027).

Results Nanoemulsions prepared using dill essential oil has a good potential for inhibiting DPPH (IC50=500 µg/mL) and ABTS (IC50=420 µg/mL) radicals. Nanoemulsions also caused a little toxicity to both cell lines. Nanoemulsions reduced cell viability in a dose-dependent manner and the cytotoxicity induced to cancer cells was higher than normal cells.

Conclusion The present study indicates that nanoemulsions prepared by dill essential oil will have the potential to become a therapeutic strategy for diseases caused by oxidative stress.

Extended Abstract

1. Introduction

Researchers have shown interest in using nanotechnology for the treatment of cancer in recent years. This technology presents unique ways to predict, prevent, or treat cancer at an early stage [1]. Since nanoparticles are 100 to 1000 times smaller than cancer cells, they can interact with tumor-specific proteins at the surface or within cancer cells and act as carriers of drug delivery into these cells [2]. As the efficacy of cancer treatment depends on the drug's potential to reduce and eliminate tumors without damaging healthy tissue, nanoemulsion as a targeted drug carrier can be useful in this area [8]. The anticancer properties of medicinal plants to inhibit cancer progression and induce apoptosis in cancer cells have

* *Corresponding Author:*
Masoud Homayouni Tabrizi, PhD.
Address: Department of Biology, Faculty of Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
Tel: +98 (915) 4505894
E-mail: mhomayouni6@gmail.com

been extensively investigated in many studies [16]. One of the medicinal plants is Anethum graveolens L. (dill), which has anticancer potential, and its effects have been reported in the treatment of cancers, including liver and cervical cancers [13]. This study aims to assess the antioxidant effects of nanoemulsion synthesized by the essential oil of dill and evaluate its cytotoxicity on HepG2 cell line in vitro.

2. Materials and Methods

Stable nanoemulsion derived from the dill essential oil was prepared using ultrasonic waves at 200 W for 30 min. Liver cancer cell lines (HepG2) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured in 96-well plates in sterile conditions and kept in the incubator at 37°C, 5% CO_2, and 95% humidity. The plates with a cell count of about 5000 per well were used to evaluate the toxicity of the drugs. This evaluation was performed using the MTT assay [17]. To evaluate the antioxidant activities of nanoemulsions, we ran two tests of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]) [18]. The viability of treated cells and the antioxidant activity of plant-derived nanoemulsion were analyzed in SPSS V. 22 by using one-way Analysis of Variance (ANOVA) and the Least Significant Difference (LSD) methods.

3. Results

The plant-derived nanoemulsion had a toxic effect on both cell lines, and this effect was dose-dependent. In other words, with increasing concentrations of this substance, the survival of both cell lines decreased but its impact on HepG2 was more significant than on HUVEC. Evaluation of the antioxidant effect of nanoemulsion using DPPH and ABTS tests showed that it had antioxidant activity, and its antioxidant activity increased by increasing its concentration. DPPH test results reported that about 500 µg/mL of nanoemulsion derived from dill plant could remove 50% of free radicals (Figure 1). ABTS test results indicated that 420 µg/mL of nanoemulsion could eliminate 50% of released free radicals in the environment (Figure 2).

4. Discussion

The results of this study showed that by increasing the concentration of nanoemulsion synthesized from dill essential oil, the percentage of free radicals inhibition increased. In other words, the antioxidant property of this substance is dose-dependent. The results of MTT assay on HepG2 and normal HUVEC cell lines showed that this substance had toxic effects on both cancerous and healthy cells but had a more poisonous effect on HepG2 than on HUVEC. The toxic effects of prepared nanoemulsion on the cells were dose-dependent; as its dose increases, its toxic effects also increase, and cell viability decreases.

Recently, new nanotechnology-based treatment strategies have emerged as an alternative to chemotherapy. Among different types of nanoproducts, nanoemulsions have several advantages for the delivery of anticancer drugs, which can increase the intracellular concentration of the drugs and thereby reducing the cytotoxicity of chemotherapy [21]. Various studies have shown that dill has multiple compounds such as carvone, limonene, and phellandrene, and its antioxidant and cytotoxic properties can be attributed to them [22].

In our study, dill essential oil-based nanoemulsion had potent antioxidant activity. This property indicates the poten-

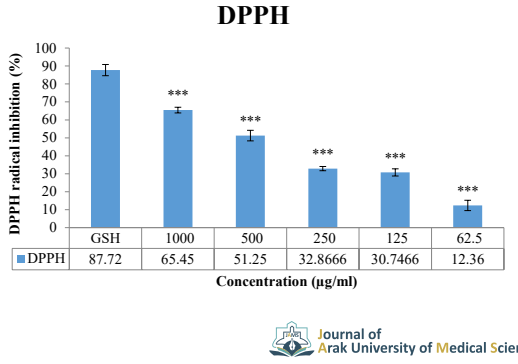


Figure 1. DPPH test results in evaluating the antioxidant activity of dill essential oil-based nanoemulsion. In this test, glutathione was used as a standard.

**Significant at P<0.001

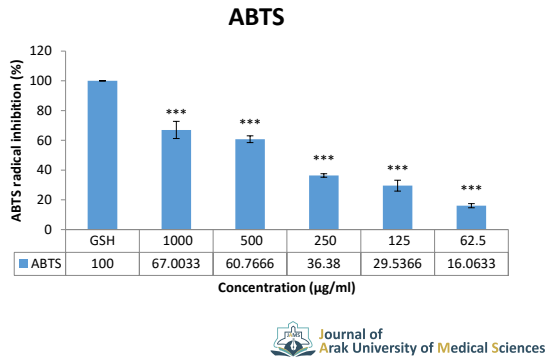


Figure 2. ABTS test results of evaluating the antioxidant activity of dill essential oil-based nanoemulsion. In this test, glutathione was used as a standard.

**Significant at P<0.001

tial of this nanoemulsion to become a therapeutic strategy for future diseases caused by oxidative stress and cancer. It is recommended to evaluate effective toxicity on other cancer cell lines.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All experiments in this study were according to the ethical guidelines of the Ethics Committee of Islamic Azad University of Mashhad (ethical code: IR.IAU.MSHD.REC.1398.02.7).

Funding

This study was extracted from a research proposal approved by the Ethics Committee of Mashahd University of Medical Sciences (Code: IR.IAU.MSHD.REC.1398.027)

Authors' contributions

Conceptualization, visualization, supervision, project administration, and funding by Masoud Homayouni Tabrizi; methodology and validation by Masoud Homayouni Tabrizi and Touran Ardalan; Analysis and investigation by Haleh Sadat Tavakkol Afshari; and resources by all authors.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی نانوامولسیون سنتزشده توسط اسانس گیاه شوید

هاله سادات توکل افشاری[۱]، *مسعود همایونی تبریزی[۱]، توران اردلان[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.
۲- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۰ خرداد ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۰۲ شهریور ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۳۹۸

چکیده

زمینه و هدف از بین نانوداروهای تولیدشده، نانوامولسیون یک ابزار مهم درعرصه فناوری نانو است که جهت کاربرد بالینی و درمانی طراحی شده است. از آنجا که اثربخشی درمانی سرطان از طریق توانایی دارو برای کاهش و ازبین‌بردن تومورها بدون آسیب‌رساندن به بافت سالم اندازه‌گیری می‌شود، نانوامولسیون به عنوان حامل دارویی هدفمند در این زمینه می‌تواند مفید واقع شود. بنابراین در این پژوهش اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطان نانوامولسیون تولیدشده توسط اسانس گیاه شوید بررسی شده است.

مواد و روش‌ها جهت سنجش ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی از آزمون‌های DPPH (۱،۱-دیفنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل) و ABTS (۲،۲-آزینو بیس (۳-اتیل بنزوتیازولین ۶-سولفونیک اسید)) استفاده شد و جهت ارزیابی سمیت سلولی القاشده به سلول‌های سرطانی کبد (HepG2) و سلول‌های نرمال اندوتلیال سیاهرگ بند ناف انسان آزمون MTT به کار گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی تمامی آزمایش‌های این تحقیق با رعایت موازین اخلاقی و طبق تأیید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد با شناسه مصوبه IR.IAU.MSHD.REC.1398.027 انجام گرفت.

یافته‌ها یافته‌های این مطالعه نشان داد نانوامولسیون تولیدشده توسط اسانس گیاه شوید دارای پتانسیل خوبی برای مهار رادیکال‌های DPPH (IC_{50}=500 µg/ml) و ABTS (IC_{50}=420 µg/ml)است. همچنین نتایج حاصل از آزمون MTT روی رده سرطانی HepG2 و رده نرمال HUVEC نشان داد میزان بقای سلول‌ها در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۲۱/۷۳ و ۷۷/۸۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. نانوامولسیون بقای سلول‌ها را به صورت وابسته به دُز کاهش داد؛ سمیت اعمال‌شده بر سلول‌های سرطانی از سلول‌های نرمال بیشتر بود.

نتیجه‌گیری مطالعه حاضر نشانگر پتانسیل تبدیل‌شدن نانوامولسیون سنتزشده توسط اسانس گیاه شوید به یک استراتژی درمانی برای بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو در آینده است.

کلیدواژه‌ها:
نانوامولسیون، گیاه شوید، آنتی‌اکسیدان، ضدسرطان

مقدمه

استفاده از فناوری نانو برای درمان سرطان، در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. این فناوری می‌تواند روش‌های منحصربه‌فردی را برای پیش‌بینی، پیشگیری و درمان اولیه سرطان ارائه کند [۱].

از آنجایی‌که نانوذرات ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر کوچک‌تر از سلول‌های سرطانی هستند، می‌توانند به‌راحتی از طریق رگ‌های خونی انتقال یابند و با پروتئین‌های اختصاصی تومور در سطح و نیز در داخل سلول‌های سرطانی ارتباط برقرار کنند. بنابراین استفاده از آن‌ها به عنوان ناقلین تحویل دارو به سلول‌های سرطانی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است [۲]. داروهای کپسوله‌شده در نانوذرات هدفمند، پتانسیل بهبود کارایی و ایمنی داروهای موجود را دارند. همچنین در حال حاضر نانوحامل‌های چندمنظوره برای کمک به پرتودرمانی و شیمی‌درمانی ظهور پیداکرده‌اند [۳]. از بین نانوداروهای تولیدشده، نانوامولسیون یک ابزار مهم در این عرصه است که به منظور کاربرد بالینی و درمانی طراحی‌شده است [۴]. نانوامولسیون درواقع یک سیستم ذرات کلوئیدی است که از دو مایع ناهمگن مانند مخلوط آب و روغن تشکیل می‌شود [۵]. نانوامولسیون‌ها تحت عنوان میکروامولسیون یا امولسیون بسیار ریز نیز شناخته می‌شوند و اندازه‌ای بین ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر دارند [۶].

* نویسنده مسئول:
دکتر مسعود همایونی تبریزی
نشانی: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی.
تلفن: ۴۵۰۵۸۹۴ (۹۱۵) ۹۸+
پست الکترونیکی: mhomayouni6@gmail.com

در برخی مطالعات نشان داده شده است نانوامولسیون‌ها مزایای بسیاری نسبت به امولسیون‌های معمولی دارند، از جمله این مزایا می‌توان به شفافیت نوری، پایداری جنبشی بالا و افزایش قابلیت زیستی اشاره کرد [۷]. پس از تحقیقات بسیار در بین نانومواد مختلف، نانوامولسیون به عنوان سیستم تحویل دارویی مناسب برای داروهای سمیت لیپوفیلی پیش‌بینی شده است و می‌تواند به طور مؤثری جایگزین شیمی‌درمانی باشد.

ویژگی‌های مناسب نانو امولسیون شامل سازگاری با محیط‌زیست و قابل‌تجزیه زیستی‌بودن، سطح بزرگ، سهولت آماده‌سازی و ثبات ترمودینامیک است [۴]. از آنجا که میزان اثربخشی درمان سرطان به پتانسیل دارو برای کاهش و ازبین‌بردن تومورها بدون آسیب‌رساندن به بافت سالم بستگی دارد، نانوامولسیون به عنوان حامل دارویی هدفمند در این زمینه می‌تواند مفید واقع شود [۸]. همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شد، درباره نانوامولسیون‌ها برای درمان بیماری‌هایی مانند سرطان و HIV مطالعه شده است [۹، ۱۰].

یک استراتژی امیدوارکننده برای درمان سرطان، تحویل داروهای شیمی‌درمانی با حامل دارویی هدفمند به بافت تومور است که با تزریق وریدی داخل شکمی (IA) عرضه می‌شود و در این راستا استفاده از نانوامولسیون‌ها می‌تواند مفید واقع شود [۱۱، ۱۲]. مطالعات نشان است گیاه دارویی شوید دارای پتانسیل ضدسرطانی است و اثرات مفید آن در درمان سرطان‌هایی از جمله کبد و دهانه رحم گزارش شده است [۱۳]. انتوفوران، ترکیب فعال و جداشده از روغن دانه گیاه شوید، دارای اثرات ضدسرطانی قابل‌توجهی در برابر انواع مختلف سرطان است [۱۴].

در ایران از این گیاه به عنوان دارویی برای هیپولیپیدمی استفاده می‌شود. به علاوه این گیاه دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی است و عملکرد خوبی در مهار رادیکال‌های آزاد دارد [۱۵]. دانه‌های گیاه شوید به طور گسترده در طب سنتی برای درمان یرقان و بیماری‌های کبدی استفاده می‌شوند [۱۴]. امروزه روش‌های موجود برای درمان سرطان کبد کافی نیست و از نظر اقتصادی هزینه‌های بسیار زیادی را به بیماران تحمیل می‌کند. در مقابل ترکیبات حاصل از گیاهان مقرون‌به‌صرفه و در دسترس و کارایی آن‌ها موردتوجه پژوهشگران قرار گرفته است. حدود ۶۵ درصد بیماران مبتلا به سرطان کبد از درمان گیاهی بدون هیچ‌گونه اثرات مخرب جانبی بهره‌مند شده‌اند [۱۴].

خواص ضدسرطان گیاهان دارویی به منظور جلوگیری از پیشرفت سرطان و القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی در تحقیقات بسیاری بررسی شده است [۱۶]. هدف از این پژوهش بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون سنتزشده توسط اسانس گیاه شوید و همچنین ارزیابی سمیت سلولی آن روی رده HepG2 در محیط in vitro است.

مواد و روش‌ها

تهیه نانوامولسیون

جهت تهیه نانوامولسیون، اسانس شوید از شرکت طبیب دارو کاشان خریداری شد، توئین ۲۰ و توئین ۸۰ از شرکت سیگما خریداری شد و به عنوان امولسیون فایر استفاده شد. همچنین اتیلن گلیکول به عنوان حلال کمکی از شرکت مرک تهیه شد. برای تهیه نانوامولسیون پایدار از امولسیون فایر و اسانس، از امواج ماورای صوت با قدرت ۲۰۰ وات به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد.

کشت سلول

رده‌های سلولی سرطان کبد (HepG2) و اندوتلیال سیاهرگ بند ناف انسان (HUVEC) از پژوهشکده بوعلی مشهد خریداری شد. به منظور کشت سلول‌های HepG2 از محیط کشت DMEM (GIB-CO, USA) و برای کشت سلول‌های HUVEC از محیط کشت RPMI (GIBCO, USA) استفاده شد. جهت فراهم‌کردن محیط کشت کامل DMEM و RPMI ۹۰ میلی‌لیتر، ۱۰ میلی‌لیتر سرم جنینی گاوی (GIBCO, USA) و یک میلی‌لیتر پنی‌سیلین /استرپتومایسین (GIB-CO, USA) مخلوط شدند. سپس هر دو رده‌ی سلولی در انکوباتور و دمای ۳۷ درجه سیلسیوس، ۵ درصد CO2 و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری شدند.

آزمون MTT

آزمون MTT (۳- [۴و۵- دی متیل تیازول- ۲- ئیل] -۲-۵- دیفنیل تترازولیوم برومید) بر اساس تبدیل MTT به بلورهای فورمازان توسط سلول‌های زنده است که فعالیت‌های میتوکندری را تعیین می‌کند. از آنجا که برای اکثر جمعیت‌های سلولی، فعالیت میتوکندریایی تام با تعداد سلول‌های زنده مرتبط است، این آزمایش به طور گسترده‌ای برای اندازه‌گیری اثرات سمیت داروها روی رده‌های سلولی یا سلول‌های اولیه بیمار استفاده می‌شود [۱۷].

در این روش سمیت نانوامولسیون به منظور مقایسه تأثیر آن بر سلول‌های سرطانی و نرمال بر رده سلولی سرطان کبد (HepG2) و سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بند ناف انسان (HUVEC) بررسی شد. به این منظور از پلیت‌های ۹۶خانه‌ای استفاده شد و در هر چاهک آن حدود ۵۰۰۰ سلول کشت داده شد. شمارش سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام هموسایتومتر انجام شد. پس از کشت، پلیت را انکوبه شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت محیط جدید شامل غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اضافه و انکوباسیون مجدد در زمان ۴۸ ساعت انجام شد. آزمایش برای هرغلظت از نانوامولسیون با سه بار تکرار انجام شد. در مرحله بعد پس از خارج‌کردن پلیت‌ها از انکوباتور و تخلیه محیط رویی، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT درون هر چاهک افزوده شد و پلیت‌ها چهار ساعت تحت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند. در مرحله بعد محیط کشت و MTT خارج شد و ۱۰۰

میکرولیتر DMSO به هریک از چاهک‌ها اضافه شد. DMSO سبب تغییر رنگ کریستال‌های فورمازان تولیدشده به محلول بنفش‌رنگی شد و شدت رنگ ایجادشده به وسیله دستگاه ELISA plate reader درطول موج ۵۷۰ نانومتر ارزیابی شد. نهایتاً میزان بقای سلول‌ها در هر غلظت به وسیله فرمول شماره ۱ محاسبه شد.

۱.

$$\text{درصد بقا} = \frac{\text{میانگین جذب نوری خانه‌های هر غلظت}}{\text{میانگین جذب نوری خانه‌های کنترل}} \times ۱۰۰$$

در در فرمول شماره ۱ کنترل نشانگر میزان جذب نوری فورمازان ایجادشده در شاهد منفی است. درنهایت با رسم یک منحنی دوبعدی درصد بقای سلول‌ها در مقابل غلظت نانواملسیون مشخص می‌شود که از این منحنی برای محاسبه IC50 (غلظتی که ۵۰ درصد سلول‌ها سالم و ۵۰ درصد سلول‌ها مرده‌اند) استفاده می‌شود.

ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدان

روش‌های بی‌شماری برای ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیبات طبیعی در غذاها یا سیستم‌های زیستی وجود دارند. دو رادیکالی که به طور معمول جهت سنجش اثرات آنتی‌اکسیدانی به صورت آزمایشگاهی استفاده می‌شوند، تحت عنوان DPPH (۱،۱- دیفنیل-۲- پیکریل- هیدرازیل) و ABTS (۲،۲-آزینو بیس (۳-اتیل بنزوتیازولین ۶- سولفونیک اسید)) شناخته می‌شوند. روش ABTS انعطاف‌پذیری بالایی دارد و می‌توان این روش را در pHهای مختلف استفاده کرد (بر خلاف DPPH که به pH اسیدی حساس است). مزیت دیگر روش ABTS نسبت به DPPH این است که ABTS در محلول بافر آبی به‌سرعت واکنش می‌دهد در حالی که DPPH به‌آهستگی با نمونه‌ها وارد واکنش می‌شود. در این پژوهش به منظور ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی نانواملسیون تولیدشده توسط اسانس گیاه شوید از هر دو آزمون DPPH و ABTS استفاده شد [۱۸].

آزمون DPPH

DPPH (۱،۱- دیفنیل-۲- پیکریل- هیدرازیل)، نوعی روش سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی بر مبنای انتقال الکترون است که در آن محلولی بنفش‌رنگ در اتانول تولید می‌شود و در طول موج ۵۱۷ نانومتر حداکثر جذب را دارد. این رادیکال که در دمای اتاق پایدار است در حضور یک مولکول آنتی‌اکسیدان کاهش می‌یابد و باعث ایجاد محلول اتانول بی‌رنگ و کاهش جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر می‌شود [۱۹].

جهت انجام این آزمون پودر DPPH از شرکت Sigma-Aldrich, USA تهیه شد. ابتدا محلول DPPH ۰/۱ میلی‌مولار در اتانول ۹۵ درصد آماده شد و در مرحله بعد با نسبت مساوی با نانواملسیون سنتزشده توسط اسانس گیاه شوید و ترکیب آنتی‌اکسیدان استاندارد مدنظر تحت عنوان گلوتاتیون احیا[1] مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. به منظور محاسبه غلظت لازم جهت مهار ۵۰ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی (IC_{50}) برای نانواملسیون و گلوتاتیون احیا (GSH)، آزمایش در شش غلظت مختلف (۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ازاین دو ماده انجام شد. هر آزمایش در سه تکرار انجام شد و از مقادیر میانگین حاصل جهت محاسبات استفاده شد. درصد مهار رادیکال DPPH به وسیله فرمول شماره ۲ به دست آمد:

۲.

$$\text{درصد فعالیت رادیکال‌زدایی DPPH} = (A_0 - A_1 / A0) \times 100$$

A_0=جذب شاهد (محلول آماده DPPH و به جای نانواملسیون آب‌مقطر)

A_1=جذب نمونه (محلول آماده ABTS و نانواملسیون)

آزمون ABTS

رادیکال ABTS (۲،۲-آزینو بیس (۳-اتیل بنزوتیازولین ۶-سولفونیک اسید)) به وسیله اکسیداسیون ABTS توسط پتاسیم پر سولفات ایجاد می‌شود و در حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدان کاهش می‌یابد [۲۰]. به منظور انجام این آزمون پودر ABTS از شرکت Sig-ma-Aldrich, USA تهیه شد. جهت آماده‌سازی محلول رادیکال ABTS، ابتدا ABTS هفت میلی‌مولار (2 ml) و پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی مولار (1 ml) جهت اکسیداسیون ABTS توسط پتاسیم پرسولفات با یکدیگر مخلوط شدند و سپس محلول حاصل به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سیلسیوس قرار داده شد. در مرحله بعد محلول رادیکالی رقیق شد و با نسبت یک‌به‌یک با نانواملسیون و گلوتاتیون احیا (GSH) به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد در غلظت‌های مختلف (۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مخلوط و در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس در تاریکی انکوبه شد. پس از گذشت یک ساعت، جذب آن‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر سنجیده شد. جهت به‌دست‌آوردن IC_{50} آزمایش در شش غلظت مختلف از نانواملسیون وگلوتاتیون احیا (GSH) انجام شد. هر آزمایش در سه تکرار انجام شد و مقادیر میانگین حاصل برای محاسبات به کار رفت. درصد مهار رادیکال ABTS به وسیله فرمول شماره ۳ محاسبه شد:

۳.

$$\text{درصد فعالیت رادیکال‌زدایی ABTS} = (A_0 - A_1/A_0) \times 100$$

A_0=جذب شاهد (محلول آماده ABTS و به جای نانواملسیون آب‌مقطر)

A_1=جذب نمونه (محلول آماده ABTS و نانواملسیون)

1. Glutathione (GSH)

آنالیز آماری

جهت ارزیابی میزان بقای سلول‌های تیمارشده و خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانواملسیون اسانس گیاه شوید از نسخه ۲۲ نرم‌افزار SPSS استفاده شد. تحلیل واریانس یک‌طرفه[2] و مقایسه میانگین‌ها با روش LSD[3] انجام شد.

یافته‌ها

سنجش سمیت سلولی القاشده توسط نانواملسیون سنتزشده با استفاده از اسانس گیاه شوید بر سلول‌های رده‌های سلولی سرطان کبدو اندوتلیال سیاهرگ بند ناف انسان

تصویر شماره ۱ نشان‌دهنده سمیت سلولی نانواملسیون سنتزشده توسط اسانس گیاه شوید علیه سلول‌های سرطان کبد (HepG2) و سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بند ناف انسان (HU-VEC) است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، نانواملسیون بر هر دو رده سلولی سمیت کمی را اعمال کرده است. میزان بقای هر دو رده سلولی در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری کاهش یافته است. سمیت با افزایش غلظت افزایش می‌یابد، در نتیجه نانواملسیون بقای سلول‌ها را به صورت وابسته به دُز کاهش می‌دهد. سمیت اعمال‌شده بر سلول‌های سرطانی از سلول‌های نرمال بیشتر است.

سنجش رادیکال‌زدایی DPPH

تصویر شماره ۲ نشان‌دهنده فعالیت نانواملسیون سنتزشده توسط اسانس گیاه شوید در حذف رادیکال‌های آزاد DPPH در مقایسه با گلوتاتیون به عنوان کنترل مثبت است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود نانواملسیون در حذف رادیکال‌های آزاد DPPH به صورت وابسته به غلظت عمل می‌کند؛ به طوری که با افزایش غلظت نانواملسیون، فعالیت رادیکال‌زدایی نیز افزایش می‌یابد. حدود ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH، در غلظت حدود ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانواملسیون مهار شدند (IC_{50}=500 µg/ml). در غلظت نهایی ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش از ۶۵ درصد رادیکال‌ها حذف شدند.

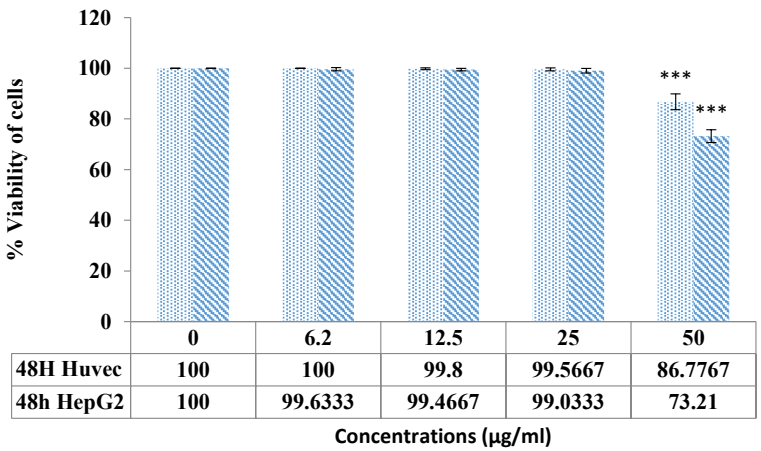
سنجش رادیکال‌زدایی ABTS

تصویر شماره ۳ فعالیت حذف رادیکال‌های ABTS نانواملسیون سنتزشده توسط اسانس گیاه شوید را در مقایسه با گلوتاتیون به عنوان کنترل مثبت نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌شود مشابه آزمون پیشین، فعالیت نانواملسیون در حذف رادیکال‌های ABTS به صورت وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت، درصد بیشتری از رادیکال‌ها توسط نانواملسیون حذف می‌شوند. حدود ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد ABTS، در غلظت حدود ۴۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانواملسیون مهار شدند (IC_{50}=420 µg/ml). نانواملسیون قادر به حذف بیش از ۶۸ درصد رادیکال‌ها در غلظت نهایی ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتراست.

بحث

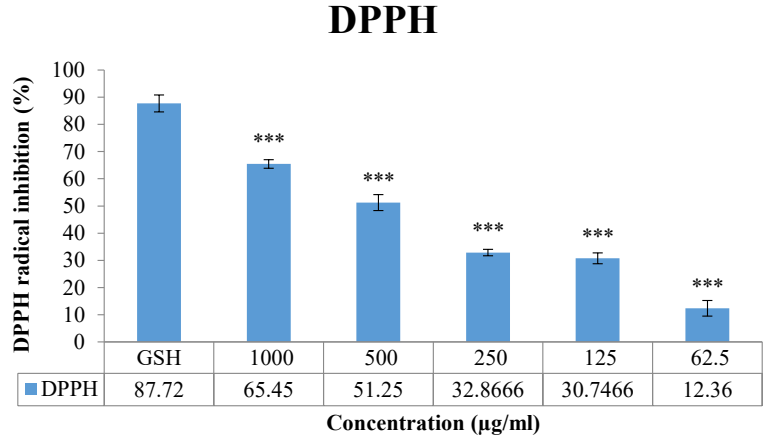
در مطالعه حاضر، اثرات آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی نانواملسیون سنتزشده توسط اسانس گیاه شوید بررسی شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد با افزایش غلظت نانواملسیون سنتزشده از اسانس گیاه شوید، درصد مهار رادیکال‌های آزاد ABST و DPPH به طور مؤثری مشابه گلوتاتیون (به عنوان کنترل مثبت) افزایش داشت. به گونه‌ای که حدود ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد

2. One way ANOVA
3. Least Significant Diffrences



	0	6.2	12.5	25	50
48H Huvec	100	100	99.8	99.5667	86.7767
48h HepG2	100	99.6333	99.4667	99.0333	73.21

تصویر ۱. سمیت سلولی القاشده توسط نانواملسیون سنتزشده با اسانس گیاه شوید بر سلول‌های سرطان کبد (HepG2) و سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بند ناف انسان (HUVEC). داده‌ها در سطح ***P<۰/۰۰۱ معنی‌دار است.

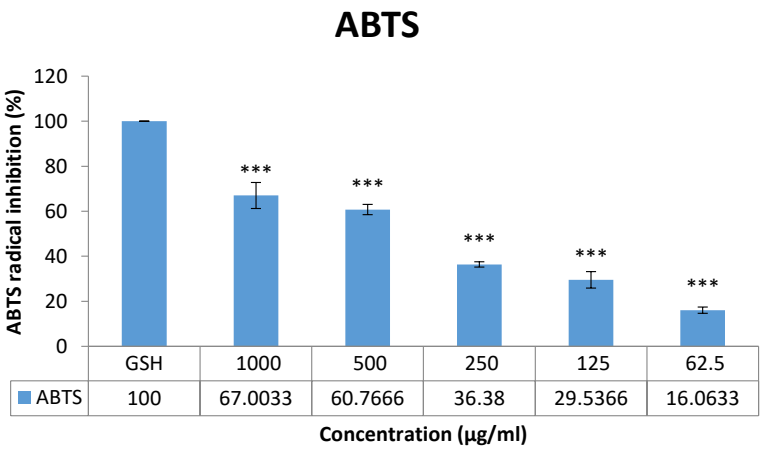


تصویر ۲. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون سنتزشده توسط اسانس گیاه شوید با استفاده از آزمون DPPH. در این آزمون گلوتاتیون به عنوان استاندارد استفاده شد. داده‌ها در سطح ***P<۰/۰۰۱ معنی‌دار است.

ABTS، در غلظت ۴۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و نیمی از رادیکال‌های آزاد DPPH، در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوامولسیون مهار شدند. همچنین نتایج حاصل از آزمون MTT روی رده سرطانی HepG2 و رده نرمال HUVEC نشان داد میزان بقای سلول‌ها در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۲۱/۷۳ و ۷۷/۸۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. با افزایش غلظت نانوامولسیون، به طور معنی‌داری زیستایی سلول‌ها کاهش داشت و سمیت نانوامولسیون سنتزشده توسط اسانس گیاه شوید در سلول‌های سرطانی نسبت به نرمال بیشتر بود. همانند اکثر مطالعات ذکرشده، نانوامولسیون مذکور دارای پتانسیل رادیکال‌زدایی بود و موجب حذف رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS شد. به علاوه کاهش معنی‌داری در بقای سلول‌ها در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد.

اخیراً، استراتژی‌های جدید درمانی مبتنی بر فناوری نانو به عنوان جایگزینی برای شیمی‌درمانی ظهور پیدا کرده‌اند. از بین انواع مختلف محصولات نانو، نانوامولسیون‌ها دارای مزایای متعددی برای داروهای ضدسرطان هستند و به کمک آن‌ها می‌توان غلظت داخل سلولی داروها را افزایش و درنتیجه سمیت سلولی شیمی‌درمانی را کاهش داد [۲۱]. مطالعات مختلف نشان می‌دهد گیاه شوید دارای ترکیبات مختلفی مانند کاروون، لیمونن و فلاندرن است که ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی این گیاه را می‌توان به وجود آن‌ها نسبت داد [۲۲]. ترکیب اصلی گیاه شوید کاروون است که یک ترکیب شیمیایی بالقوه برای حفاظت در برابر سرطان محسوب می‌شود [۲۳]. مطالعات اخیر گزارش دادند کاروون با فعال‌کردن P۵۳ و کاسپازها در سلول‌های سرطانی مختلف، آپوپتوز را القا می‌کند.

در مطالعه‌ای مشابه که توسط مقدسی و همکاران صورت گرفت، برای تهیه نانوامولسیون از کورکومین استفاده شد که یکی از ترکیبات



تصویر ۳. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون سنتزشده توسط اسانس گیاه شوید با استفاده از آزمون ABTS. در این آزمون گلوتاتیون به عنوان استاندارد استفاده شد. داده‌ها در سطح ***P>۰/۰۰۱ معنی‌دار است.

مهم پلی‌فنولیک است. Nano-CUR در روغن فلفل سیاه به عنوان فاز روغنی و Tween 80 به عنوان سورفکتانت آماده شد، سپس خواص آنتی‌اکسیدان و سمیت آن به کمک آزمون‌های DPPH و MTT سنجیده شد. Nano-CUR فعالیت بسیار خوبی را در حذف رادیکال‌های آزاد DPPH نشان داد و حدود درصد رادیکال‌های آزاد را مهار کرد. اما هیچ‌گونه اثر سمیتی علیه سلول‌های Neuro2A تیمارشده با Nano-CUR مشاهده نشد [۲۴].

در تحقیقی اثرات آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون تهیه‌شده از گیاه دست بودا[4] با ارزیابی مهار رادیکال‌های DPPH بررسی شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت بود و در غلظت ۰/۱۲میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت رادیکال‌زدایی نانوامولسیون در آزمون DPPH ۵۱/۶ درصد گزارش شد که به طور معنی‌داری از فعالیت رادیکال‌زدایی روغن خالص (۳۰/۵ درصد) بیشتر بود. همچنین در غلظت ۰/۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت رادیکال‌زدایی نانوامولسیون در آزمون هیدروکسیل ۳۵/۷ درصد گزارش شد که به طور معنی‌داری از فعالیت رادیکال‌زدایی روغن خالص (۹/۶ درصد) بیشتر [۲۵] و مشابه نتایج این پژوهش بود.

در مطالعه‌ای دیگر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه شوید به وسیله آزمون‌های FRAP، DMPD، DPPH و PRAP بررسی شد. در این پژوهش مشخص شد گیاه شوید را می‌توان به عنوان یک آنتی‌اکسیدان بالقوه استفاده کرد [۲۶]. به علاوه در تحقیقی فعالیت آنتی‌اکسیدان اسانس گیاه شوید با آزمون DPPH ارزیابی شد و بالاترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH ۷۹/۶۲ درصد گزارش شد [۲۷].

در پژوهش دیگری اثرات ضدسرطان نانوامولسیون تهیه‌شده با استفاده از گیاه سیاه‌دانه[5] به کمک آزمون MTT علیه رده سلولی سرطانی MCF-7 بررسی شد. کاهش قابل توجه بقای سلول‌های سرطانی نشان داد نانوامولسیون به‌راحتی به غشای سلولی نفوذ می‌کند و باعث مرگ سلول می‌شود. مقدار IC_{50} پس از ۴۸ ساعت تیمار با نانوامولسیون ۴/۵±۵۹ میکروگرم بر میلی‌لیترگزارش شد [۲۸].

در مطالعه دیگری اثرات سمیت سلولی نانوامولسیون تولیدشده با استفاده از گیاه چریش که نوعی گیاه دارویی است، ارزیابی شد. نانوامولسیون مذکور در غلظت‌های پایین (۱-۰/۷ µg/mL) علیه سلول‌های لنفوسیت انسانی غیرسمی گزارش شد، اما در غلظت‌های بالاتر (۲-۱/۲ µg/mL) سمیت علیه این سلول‌ها مشاهده شد [۲۹]. اما در این پژوهش نانوامولسیون در بالاترین غلظت روی سلول‌های سرطانی کبد سمیت کمی از خود نشان داد.

علاوه بر مطالعات فوق، در پژوهشی خواص ضدسرطان گیاه دارویی شوید ارزیابی شد. برای این منظور از آزمون MTT و رده سلولی سرطان کبد (HCC) استفاده شد. جهت بررسی تغییرات مورفولوژیکی، رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید استفاده شد و فعالیت پروآپوپتوزی با سنجش Annexin-V-FITC / PI و تغییرات چرخه سلولی بررسی شد. در مطالعه مذکور گیاه شوید بقای سلول‌های سرطانی را به صورت وابسته به غلظت کاهش داد و همچنین تغییرات مورفولوژیکی مانند جوانه‌زنی غشای سلولی و تراکم هسته‌ای نمایان شد که نشان از وقوع آپوپتوز داشت. سپس سنجش Annexin-V-FITC / PI و تغییرات چرخه سلولی رویداد آپوپتوز را اثبات کرد [۱۳].

در مطالعه‌ای که روی موش‌هایی با کلسترول بالا صورت گرفت مشخص شد مصرف عصاره شوید در دُز ۵۰۰ میلی‌گرم در روز به مدت ۳۰ روز سطح لیپید سرمی و پراکسیداسیون لیپیدی در کبد را کاهش می‌دهد [۳۰]. با توجه به نتایج این تحقیق و انجام مطالعات بیشتر روی سایر سلو ل‌ها و انجام آزمایشات بیشتر در محیط in vivo می‌توان از دُزهای مناسب این ترکیب برای اهداف زیست پزشکی بهره جست.

نتیجه‌گیری

در پژوهشی که انجام شد، نانوامولسیون سنتزشده توسط اسانس گیاه شوید دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی بود. این خاصیت نشانگر پتانسیل تبدیل‌شدن این نانوامولسیون به یک استراتژی درمانی برای بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو و سرطان در آینده است. پیشنهاد می‌شود به منظور بررسی سمیت مؤثر روی سایر رده‌های سلول‌های سرطانی نیز مطالعه صورت گیرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

تمامی آزمایش‌های این تحقیق با رعایت موازین اخلاقی و طبق تأیید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی با شناسه مصوبه IR.IAU.MSHD.REC.1398.027 انجام شد.

حامی مالی

این تحقیق هیچ کمک مالی خاصی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های دولتی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی: مسعود همایونی تبریزی؛ روش‌شناسی: مسعود همایونی تبریزی، تورن اردلان؛ اعتبارسنجی: مسعود همایونی تبریزی، تورن اردلان تحلیل، تحقیق و بررسی: هاله توکل افشار؛ منابع: هاله توکل افشار؛ نگارش پیش‌نویس:

4. Citrus medica L. var. sarcodactylis
5. Nigella sativa L

هالـه تـوکل افشـار؛ ویراسـتاری و نهایی‌سـازی نوشـته: مسـعود همایونـی تبریـزی، تـوران اردلان؛ بصری‌سـازی، نظـارت، مدیریت پـروژه، تأمیـن مالـی: مسـعود همایونـی تبریـزی

تعارض منافع

طبق نظر نویسندگان این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارد.

References

[1] Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. Drug Discov Today. 2010; 15(19-20):842-50. [DOI:10.1016/j.drudis.2010.08.006] [PMID]

[2] Wang X, Yang L, Chen ZG, Shin DM. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. CA Cancer J Clin. 2008; 58: 97-110. [DOI:10.3322/CA.2007.0003] [PMID]

[3] Alexis F, Rhee JW, Richie JP, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. Urologic Oncology. 2008; 26(1):74-85. [DOI:10.1016/j.urolonc.2007.03.017] [PMID]

[4] Sahu P, Das D, Mishra VK, Kashaw V, Kashaw SK. Nanoemulsion: A novel eon in cancer chemotherapy. Mini- Rev Med Chem. 2017; 17(18):1778-92. [DOI:10.2174/1389557516666160219122755] [PMID]

[5] Javadzadeh Y, Bahari L. Therapeutic nanostructures for dermal and transdermal drug delivery. In: Mihai Grumezescu A, editor. Nano-and Microscale Drug Delivery Systems. Amsterdam: Elsevier; 2017. [DOI:10.1016/B978-0-323-52727-9.00008-X]

[6] Priya LB, Baskaran R, Padma VV. Phytonanoconjugates in oral medicine. In: Andronescu E, Mihai Grumezescu A, editors. Nanostructures for oral Medicine. Amsterdam: Elsevier; 2017. [DOI:10.1016/B978-0-323-47720-8.00022-5]

[7] Teo A, Goh KK, Lee SJ. Nanoparticles and nanoemulsions. In: Kumar Anal A, Ahmad I, Noomhorm A, editors. Functional foods and dietary supplements: Processing effects and health benefits. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd. Publication; 2014. [DOI:10.1002/9781118227800.ch15] [PMID] [PMCID]

[8] Praveen Kumar G, Divya A. Nanoemulsion based targeting in cancer therapeutics. Med Chem. 2015; 5(5):272-84. [DOI:10.4172/2161-0444.1000275]

[9] Ostróżka-Cieślik A, Sarecka-Hujar B. The use of nanotechnology in modern pharmacotherapy. In: Mihai Grumezescu A, editor. Multifunctional systems for combined delivery, biosensing and diagnostics. Amsterdam: Elsevier; 2017. [DOI:10.1016/B978-0-323-52725-5.00007-1]

[10] Kundu B, Ghosh D, Sinha MK, Sen PS, Balla VK, Das N, et al. Doxorubicin-intercalated nano-hydroxyapatite drug-delivery system for liver cancer: An animal model. Ceram Int. 2013; 39(8):9557-66. [DOI:10.1016/j.ceramint.2013.05.074]

[11] Jeon MJ, Gordon AC, Larson AC, Chung JW, Kim YI, Kim D-H. Transcatheter intra-arterial infusion of doxorubicin loaded porous magnetic nano-clusters with iodinated oil for the treatment of liver cancer. Biomat. 2016; 88:25-33. [DOI:10.1016/j.biomaterials.2016.02.021] [PMID] [PMCID]

[12] Yu H, Huang Q. Investigation of the cytotoxicity of food-grade nanoemulsions in Caco-2 cell monolayers and HepG2 cells. Food Chem. 2013; 141(1):29-33. [DOI:10.1016/j.foodchem.2013.03.009] [PMID]

[13] Mohammed FA, Elkady AI, Syed FQ, Mirza MB, Hakeem KR, Alkarim S. Anethum graveolens (dill)-A medicinal herb induces apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 cell line. J Ethnopharmacol. 2018; 219:15-22. [DOI:10.1016/j.jep.2018.03.008] [PMID]

[14] Mohammed FA, Razvi SS, Abdul WM, Mohammed K, Hakeem KR, Banaganapalli B, et al. Protective role of medicinal herb anethum graveolens (Dill) against various human diseases and metabolic disorders. In: Ozturk M, Hakeem KH, editors. Plant and Human Health. Berlin:Springer; 2019. [DOI:10.1007/978-3-030-04408-4_8]

[15] Oshaghi EA, Tavilani H, Khodadadi I, Goodarzi MT. Dill tablet: A potential antioxidant and anti-diabetic medicine. Asian Pac J Trop Biomed. 2015; 5(9):720-7. [DOI:10.1016/j.apjtb.2015.06.012]

[16] Safarzadeh E, Shotorbani SS, Baradaran B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. Adv Pharm Bull. 2014; (Suppl. 1) 4(5):421-7. [DOI:10.5681/apb.2014.062] [PMID] [PMCID]

[17] Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: The MTT assay. Methods Mol Biol. 2011; 731:237-45. [DOI:10.1007/978-1-61779-080-5_20] [PMID]

[18] Shalaby EA, Shanab SM. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of Spirulina platensis. Indian J Geo-Marine Sci. 2013; 42(5):556-64.

[19] Garcia EJ, Oldoni TL, Alencar SM, Reis A, Loguercio AD, Grande RH. Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. Braz Dent J. 2012; 23(1):22-7. [DOI:10.1590/S0103-64402012000100004] [PMID]

[20] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Bio Med. 1999; 26(9-10):1231-7. [DOI:10.1016/S0891-5849(98)00315-3]

[21] Severino P, Fangueiro JF, Ferreira SV, Basso R, Chaud MV, Santana MH, et al. Nanoemulsions and nanoparticles for non-melanoma skin cancer: Effects of lipid materials. Clin Transl Oncol. 2013; 15(6):417-24. [DOI:10.1007/s12094-012-0982-0] [PMID]

[22] Yazdanparast R, Bahramikia S. Evaluation of the effect of anethum graveolens L. crude extracts on serum lipids and lipoproteins profiles in hypercholesterolaemic rats. Darg J Pharm Sci. 2008; 16(2):88-94.

[23] Zheng GQ, Kenney PM, Lam LK. Anethofuran, carvone, and limonene: Potential cancer chemoprotective agents from dill weed oil and caraway oil. Planta Medica. 1992; 58(4):338-41. [DOI:10.1055/s-2006-961480] [PMID]

[24] Moghaddasi F, Housaindokht MR, Darroudi M, Bozorgmehr MR, Sadeghi A. Synthesis of nano curcumin using black pepper oil by O/W nanoemulsion technique and investigation of their biological activities. LWT. 2018; 92:92-100. [DOI:10.1016/j.lwt.2018.02.023]

[25] Lou Z, Chen J, Yu F, Wang H, Kou X, Ma C, et al. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from Citrus medica L. var. sarcodactylis and its nanoemulsion. LWT. 2017; 80:371-7. [DOI:10.1016/j.lwt.2017.02.037]

[26] Orhan IE, Senol FS, Ozturk N, Celik SA, Pulur A, Kan Y. Phytochemical contents and enzyme inhibitory and antioxidant properties of Anethum graveolens L.(dill) samples cultivated under organic and conventional agricultural conditions. Food Chem Toxicol. 2013; 59:96-103.[DOI:10.1016/j.fct.2013.05.053] [PMID]

[27] Stanojevic L, Stanković MZ, Cvetković D, Danilović B, Stanojević J. Dill (anethum graveolens L.) seeds essential oil as a potential natural antioxidant and antimicrobial agent. Biologica Nyssana. 2016; 7(1):31-9.

[28] Periasamy VS, Athinarayanan J, Alshatwi AA. Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of Nigella sativa L.

essential oil on human breast cancer cells. Ultrason Sonochem. 2016; 31:449-55.[DOI:10.1016/j.ultsonch.2016.01.035] [PMID]

[29] Jerobin J, Makwana P, Kumar RS, Sundaramoorthy R, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Antibacterial activity of neem nanoemulsion and its toxicity assessment on human lymphocytes in vitro. Int J Nanomedicine. 2015; 10(1):77-86. [DOI:10.2147/IJN.S79983] [PMID] [PMCID]

[30] Meriem T. Chemical Composition And Anti-inflammatory Activity Of Myrtus Communis L. Essential Oil, Phytothérapie. Algerian J Arid Environ. 2016; 6(2):1-10.