فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۶، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۴۳۷-۴۲۳ (۱۳۸۹)

فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، هماتولوژی و سمیت سلولی اسانس لیموترش (*Citrus limon* L.)

سیده مریم شرفی[۱]، ایرج رسولی[۲*]، طلوع‌الله قدری[۱]، محمدرضا جلالی ندوشن[۳] و محمدباقر رضایی[٤]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران
۲*- نویسنده مسئول، استاد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، پست الکترونیک: rasooli@shahed.ac.ir
۳- دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران
٤- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: دی ۱۳۸۸ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۸

چکیده

در مطالعه حاضر فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، هماتولوژی و سیتوتوکسسیته اسانس لیموترش (*Citrus limon* L.) مورد آزمایش قرار گرفت. نمای حساسیتی میکروارگانیسم‌ها در برابر اسانس لیمو براساس حساسترین به مقاومترین به‌ترتیب زیر بود: *E.coli*> *K. pneumonia*> *S. aureus*> *Streptococcus faecalis*> *Candida albicans*> *P. aeruginosa*. حداقل غلظت‌های مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس تازه تعیین گردید. اسانس، خاصیت کشندگی و مهارکنندگی میکروبی خوبی بجز در خصوص *Pseudomonas aeruginosa* نشان داد. از این رو خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با روش بتا-کاروتن‌زدایی انجام و نتایج مقایسه‌ای آنها با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک استاندارد انجام شد. بازدارندگی پراکسیداسیون لیپید به وسیله اسانس لیمو تقریباً برابر یا بیش از قدرت آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک BHT و BHA بود. مقدار اسانس لازم برای ۵۰٪ رادیکال‌زدایی اسانس لیمو ۲۲/۸۱ µg/ml بود. به‌طوری که محتوای فنلی و ظرفیت DPPHزدایی برای هر اسانس مشخص و بعد نسبت بین محتوای فنلی و ظرفیت DPPHزدایی تعیین گردید. فنل کل اسانس خالص لیمو ۵۷/٤۳ µgGAE/mg بود. بازدارندگی پراکسیداسیون لیپید به وسیله اسانس لیمو تقریباً برابر یا بیش از قدرت آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک BHT و BHA بود. قدرت آنتی‌اکسیدانی احیا فریک در سرم خون موشهایی که به مدت یک ماه و روزانه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اسانس گاواژ شده بودند افزایش نشان داد. به‌نحوی که تأثیرات درمانی در نتیجه تغذیه اسانس توسط موشها در خون آنها دیده شد. غلظت ۵۰٪ کشندگی (IC_{50}) اسانس لیمو بر علیه سلولهای Hela و خون محیطی به‌ترتیب ۰/۹۷ و ۰/۵۷ میکروگرم در هر میلی‌لیتر تعیین گردید. بنابراین نتایج نشان می‌دهد که اسانس لیمو با احتیاط و فقط پس از تعیین دوز مورد مصرف قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ضد میکروبی، سیتوتوکسسیته، آنتی‌اکسیدان، روغن‌های اسانسی، لیموترش (*Citrus limon* L.).

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

روغن‌های اسانسی دارای ترکیب‌های پیچیده معطر و فرآر حاصل از متابولیسم ثانویه گیاهان هستند که به‌طور وسیعی در صنایع آرایشی و بهداشتی به صورت ترکیب‌های معطر و در صنایع غذایی به‌عنوان افزودنی‌های معطر یا نگهدارنده طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر خواص معطر، بسیاری از روغن‌های اسانسی و اجزاء آنها دارای فعالیت‌های آرام‌بخش عضلانی، آنتی‌باکتریال و ضد قارچ هستند (Lu *et al.*, 2002؛ D'Auria *et al.*, 2001). روغن‌های اسانسی و ترکیب‌های مهم آنها دارای طیف وسیعی از فعالیت بیولوژیکی هستند که ممکن است اهمیت زیادی در زمینه‌های شیمی غذایی، فارماکولوژی، آرایشی و بهداشتی داشته باشد. فایده اصلی روغن‌های اسانسی، اینست که این روغن‌ها می‌توانند در خیلی از غذاها استفاده شوند و به‌عنوان generally recognized as safe (GRAS) بررسی شوند (Kabara, 1991). برخی از فعالیت‌های ضد میکروبی به دلیل حضور مواد بیولوژیک فعال مثل فلاونوئیدها، ترپن‌ها، کومارین‌ها و کاروتن‌هاست (Tepe *et al.*, 2005). این روغن‌ها به دلیل بوی معطر و مطبوعی که دارند به‌طور وسیعی استفاده می‌شوند. استفاده از مواد مصنوعی و شیمیایی که دارای فعالیت ضد میکروبی هستند (به‌عنوان مهارکننده‌ها، کاهش‌دهنده رشد و یا حتی غیرفعال‌کننده‌ها) یکی از قدیمیترین تکنیک‌ها برای کنترل رشد میکروارگانیسم‌هاست. مواد ضد میکروبی، طبیعی هستند و عمر مفید مواد غذایی را افزایش می‌دهند و از تغییر رنگ، مشکلات بافتی و مشکلات مرتبط با سلامتی که اساساً به دلیل یک سری فعالیت‌های آنزیماتیک و متابولیکی میکروارگانیسم‌هاست که منجر به تغییر مواد غذایی می‌شود، جلوگیری می‌کنند (Feng & Zheng, 2007؛ Lopez-Malo *et al.*, 2000). از مواد آنتی‌میکروبی طبیعی، روغن‌های اسانسی استخراج شده از بسیاری از گیاهان و میوه‌ها هستند که اثر ضد میکروبی آنها بررسی شده است (Dehghan *et al.*, 2007؛ Been *et al.*, 2007). تکنیک‌های جدیدی از قبیل فشار زیاد، نانوتکنولوژی، پرتوافکنی و غیره به‌طور وسیعی در خنثی‌سازی ویژگی‌های مواد غذایی استفاده می‌شود، در حالی که ترکیب‌های جدید با ویژگی‌های عملکردی به بهبود سلامتی کمک می‌کنند. حذف افزودنی‌های غذایی که به‌طور وسیعی استفاده می‌شود، مورد تقاضاست، در حالی که افزودنی‌های طبیعی هم از نظر کیفیت و هم از نظر ایمنی مورد تأیید هستند. به همین منظور محققان بدنبال منابع جدیدی از ترکیب‌ها و یا افزودنی‌ها هستند. این عصاره‌ها دارای خاصیت ضد میکروبی در چندین ماده غذایی هستند (Fernandez-Lopez *et al.*, 2005). سایز کوچک ملکول‌های روغن‌های اسانسی به آنها اجازه می‌دهد که از بین دیواره سلولی نفوذ کنند و فرایندهای بیوشیمیایی مختلف را تحت تأثیر قرار دهند. همچنین روغن‌های اسانسی دارای تأثیر روحی روانی می‌باشند که در رایحه درمانی استفاده می‌شوند. فعالیت بیولوژیکی روغن اسانسی وابسته به ترکیب‌هایشان است. روغن‌های اسانسی که دارای ترکیب‌های فنولی مثل تیمول و کارواکرول هستند، دارای تأثیرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی قوی هستند (Misharina & Samusenko, 2008). یکی دیگر از پژوهشهای مهم امروز دنیا، بررسی اثر ضد سرطانی گیاهان و امکان تهیه داروهای مؤثر از آنها برای درمان بیماری سرطان می‌باشد که در ابعاد بسیار وسیع در حال انجام می‌باشد. استفاده از روغن‌های

Archive of SID

www.SID.ir

اسانسی عاری از واکنشهای سیستمیک مضر یا اثرهای سمّی نیست. به‌نحوی که برخی روغن‌های اسانسی می‌توانند مسمومیت همراه با انقباض حرکات روده‌ای را سبب شوند (Millet *et al.*, 1981) و برخی مانند روغن لیمو فتوتوکسسیته ایجاد نمایند (Naganuma *et al.*, 1985). گزارشهای منتشره تأثیر in vivo بر حیوانات مختلف (Orafidiya *et al.*, 2004) و سیتوتوکسسیته in vitro بر سلولهای گوناگون را توضیح داده‌اند (Hayes & Markovic, 2002). حصول اطمینان از سلامت و ایمنی هر ترکیب دارویی آرایشی یا مکمل غذایی جدید برای مصرف‌کنندگان پیش از ورود محصول به بازار دارویی ضروری می‌باشد. به همین منظور آزمایش‌های بررسی سمیت ترکیب‌های جدید به صورت in vitro روی حیوانات آزمایشگاهی یا به طریق in vitro روی انواع سلولها انجام می‌شود. این مطالعه با هدف فوق طراحی شده است.

مواد و روشها

اسانس لیمو

اسانس لیمو از منابع تولیدی داخل کشور (شرکت باریج اسانس) که در داروخانه‌ها به فروش می‌رسد تهیه گردید.

سویه‌های میکروبی

میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه بشرح زیر بودند:

E.coli (ATCC25922)
Streptococcus faecalis (PTCC33186)
Klebsiella pneumonia (ATCC13883)
S.aureus (ATCC 25923)
Pseudomonas aeruginosa (ATCC8830)
Candida albicans (ATCC 5027)

بررسی اثر ضد میکروبی

اثر ضد میکروبی با روش Yadegarinia و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد. برای مطالعه اثر ضد میکروبی از دو روش انتشار (Diffusion test) و رقت (Dilution test) استفاده شد که از میان روشهای انتشار از روش دیسک پلیت (Disk -plate method) و از میان روشهای رقت از روش رقت لوله‌ای استفاده شد. مقدار ۳۰µl اسانس با رقت‌های ۱/۸، ۱/٤، ۱/۲ و ۱ در ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی ریخته و پس از هم‌زدن در انکوباتور به مدت ۲٤–۱۸ ساعت قرار داده شد و بعد به وسیله اسپکتروفتومتر جمعیت میکروبی تعیین و در نتیجه حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimal Inhibitory concentration) مشخص گردید. بعد از هر کدام از لوله‌ها که رشد جمعیت نشان نداده بودند ۰/۱ میلی‌لیتر روی پلیت حاوی نوترینت آگار کشت داده شد و حداقل غلظت کشندگی (Minimal Bactericidal concentration) ماده ضد میکروبی تعیین گردید. به‌طوری که برای مطالعه سینتیک میکروب‌کشی اسانس، پس از تعیین MBC از سوسپانسیون‌های میکروبی محتوی 10^6 سلول میکروبی تهیه و مقدار ۵۰µl اسانس در 5ml سوسپانسیون ریخته شد. در فواصل زمانی معین، مقدار ۱۰µl از هر لوله برداشته و پس از رقیق‌سازی بر سطح محیط نوترینت آگار به‌طور یکنواخت گسترده و به مدت ۲٤ ساعت داخل انکوباتور گذاشته شد. بعد تعداد کلنی‌ها با کلنی کانتر شمارش و با ضرب عکس رقت در تعداد کلنی‌ها، تعداد باکتریهای زنده در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون تعیین گردید.

بنابراین حلالهای مختلف که در اسانس‌گیری یا رقیق‌سازی اسانس مورد استفاده قرار می‌گرفتند قبلاً در

Archive of SID

www.SID.ir

رقت‌های مختلف تهیه و تأثیر آنها روی میکروبهای مورد مطالعه با روشهای انتشار و رقت آزمایش شد. متانول و DMSO (Dimethyl Sulfoxide) تأثیر ضد میکروبی نداشتند و مورد استفاده رقیق‌سازی قرار گرفتند. در کلیه مراحل آزمایش‌ها از DMSO به‌عنوان شاهد مواد ضد میکروبی استفاده شد.

تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس

خواص آنتی‌اکسیدانی با دو روش بتا-کاروتن‌زدایی و تعیین قدرت رادیکال‌زدایی با روشهای استاندارد (Rasooli *et al.*, 2008) انجام شد. به‌طور خلاصه در آزمایش بتا-کاروتن‌زدایی ۲۰۰ میکرولیتر از هر کدام از آنتی‌اکسیدان‌ها با ۵ میلی‌لیتر از امولسیون بتا-کاروتن در کووت مخلوط گردید. ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر امولسیون لینولئیک‌اسید اضافه کرده و به‌عنوان شاهد منفی مورد استفاده قرار گرفت. همه نمونه‌ها فوراً با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شدند (زمان صفر یا t= 0) و بعد در هر ۱۵ دقیقه تا ۱۲۰ دقیقه با طول موج ٤٧٠nm یادداشت شدند. کووتها در دمای ۵۰ درجه در فاصله میان اندازه‌گیریهای اسپکتروفتومتری ترموستاته می‌شدند. همه اندازه‌گیریها سه بار تکرار شدند.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی (AAC= Antioxidant Activity Coefficient) با فرمول زیر محاسبه شد:

$$AAC= [(A_{A(120)} - A_{C(120)}/(A_{C(0)} - A_{C(120)}] \times 1000$$

$A_{A(120)}$= جذب آنتی‌اکسیدان در زمان ۱۲۰ دقیقه (t= 120)

$A_{C(120)}$= جذب شاهد در زمان ۱۲۰ دقیقه (t= 120)

$A_{C(0)}$= جذب شاهد در زمان صفر دقیقه (t= 0)

برای تعیین فعالیت رادیکال‌زدایی با تست DPPH، ۱۰µl اسانس را با ۹۰۰µl میکرولیتر 100mM (pH 7.4) Tris-HCl؛ ٤٠ میکرولیتر اتانول و ۵۰ میکرولیتر TWEEN 20 (۰/۵٪ w/w) مخلوط کرده و مخلوط فوق به یک میکرولیتر DPPH (0.5 mM= 0.2 mg/ml) در اتانول اضافه شد. مخلوط را بشدت هم زده و جذب فوراً با طول موج ۵۱۷ nm ثبت گردید. ثبت تا ۷۰ دقیقه ادامه یافت و نوسانها یادداشت شد تا جایی که دیگر نوسانی دیده نشد. برای شاهد به جای اسانس از آب مقطر و Trolox (1 mM) به‌عنوان آنتی‌اکسیدان پایدار استفاده شد.

فعالیت رادیکال‌زدایی اسانس با فرمول زیر و براساس درصد ممانعت DPPH محاسبه گردید:

Inhibition percentage (IP)= $[(A_B - A_A)/A_B] \times 100$
Absorbance value of blank checked after 70 minutes =A_B
Absorbance value of sample checked after 70 minutes =A_A

تعیین فنل کل اسانس (Total phenolic content (TPC

فنل کل اسانس با روش (Kahkonen *et al.*, 1999) و با استفاده از سنجش فولین سیوکالتیو (Folin–Ciocalteau assay) انجام شد. به‌طوری که ۳۰۰ میکرولیتر نمونه در لوله آزمایش ریخته و ۱/۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالتیو با رقت ۱۰ برابر و ۱/۲ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم (۷/۵٪ وزنی حجمی) به آن افزوده شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شده و بعد جذب در طیف نوری ٧٦٥ nm اندازه‌گیری شد. گالیک اسید (Sigma Co., 0.2–1 mg/ml gallic acid) به‌عنوان استاندارد استفاده شد ($y = 0.0111x - 0.0148$; $r^2= 0.9998$). فنل کل معادل میلی‌گرم گالیک اسید [gallic acid equivalent (GAE)] در ۱۰۰گرم نمونه تعریف شد.

Archive of SID

www.SID.ir

تعیین قدرت احیای فریک آنتی‌اکسیدان (FRAP) اسانس لیمو در سرم موش

این سنجش براساس روش Benzie و Strain (۱۹۹۶) انجام شد. به‌نحوی که نمونه‌ها (۴۰-۱۰ میکرولیتر) با ۳ میلی‌لیتر ferric-TPTZ (tripyridyl-s-triazine) مخلوط شد. تغییر جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر در زمان صفر و تا ۹۰ دقیقه اندازه‌گیری شد تا ثابت شد. غلظت‌های مختلف محلول Fe(II) از ($FeSO_4.7H_2O$) برای کالیبراسیون سنجش قدرت احیای فریک آنتی‌اکسیدان (FRAP) اسانس لیمو در سرم موش استفاده شد.

تعیین سمیت حاد و تحت مزمن اسانس (Acute and Subchronic toxicity)

برای تعیین توکسسیته حاد، روغن‌های اسانسی با دوز ۳۰۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم در کیلو وزن بدن به طریق خوراکی در موشهای Wistar rats (Rattus norvegicus; 180–200 g) مصرف گردید (Fontenelle *et al.*, 2007). نتایج با گروه شاهد [3% (v/v) Tween 80 in saline] مقایسه شدند. LD_{50} با استفاده از نرم‌افزار Excel سنجیده شدند. حیوانات به مدت ۱ ساعت مورد مشاهده قرار گرفته و بعد مشاهدات ثبت شدند. برای سنجش توکسسیته تحت حاد (Subchronic txicity) ۳۰ روز پس از مصرف خوراکی اسانس توسط Wistar rats پارامترهای زیر مورد مطالعه قرار گرفتند: هماتولوژیک، هیستوپاتولوژیک و بیوشیمی سرم (urea، creatinine، glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) و glutamic-pyruvic transaminase (GPT)). نمونه‌های خون جمع‌آوری شده در روزهای صفر و سی برای آنالیز WBCs، RBC و هماتوکریت هموگلوبین مورد استفاده قرار گرفتند.

تعیین سمیت سلولی اسانس

دو رده سلول سرطانی و سلولهای تک‌هسته‌ای خون محیطی با روش MTT مورد مطالعه قرارگرفتند (Plumb *et al.*, 1989). در این روش احیا MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] به وسیله دی‌هیدروژناز میتوکندری‌ها به محصول آبی فرمازان انجام می‌شود که نشان‌دهنده عملکرد طبیعی میتوکندری و حیات سلول است (Lau *et al.*, 2004). پس از برداشت از فلاسک‌های کشت، سلولها به تعداد 1×10^4 تا 5×10^5 (براساس پروتکل کشت هر سلول سرطانی) در پلیت‌های ۹۶ چاهکی محتوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت در هر چاهک انکوبه شدند. سلولها برای چسبیدن ۲۴ ساعت زمان می‌برند و پس از آن با رقت‌های مختلف اسانس به مدت ۴۸ ساعت مواجه می‌شوند. ۲۰ میکرولیتر از MTT (۵ mg/ml) در سالین بافر فسفاته (PBS) به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. محیط تخلیه شده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جذب شاهد (مواجه شده با ۰/۱٪ DMSO و نمونه‌های مواجه شده با اسانس در دستگاه الایزا ریدر با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده و ثبت شدند. منحنی بقا (سلولهای زنده) با توجه به سلولهای انکوبه شده شاهد ترسیم می‌شود. سیتوتوکسسیته عبارت خواهد بود از غلظت ماده مانع رشد به میزان ۵۰٪ (IC_{50}). همه تستها به صورت سه بار تکرار انجام شدند.

نتایج

نمای حساسیتی میکروارگانیسم‌ها در برابر اسانس لیمو براساس حساسترین به مقاومترین به‌ترتیب زیر بود (جدول ۱).

Archive of SID
www.SID.ir

E. coli>K. pneumonia>S. aureus>Streptococcus faecalis>Candida albicans>P. aeruginosa

جهت تعیین حداقل غلظت‌های مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس تازه را در رقت‌های مختلف در برابر سوسپانسیونهای میکروبی محتوی 10^7 میکروارگانیسم در میلی‌لیتر قرار دادیم. رقت‌های تعیین‌شده در آزمایش MBC در برابر سوسپانسیون میکروبی قرار داده شدند تا سیتتیک مرگ میکروبی (شکل ۱) و رابطه آن با هاله ممانعت رشد میکروبی (شکل ۲) بدست آید. اسانس، خاصیت کشندگی و مهارکنندگی میکروبی خوبی بجز در خصوص *Pseudomonas aeruginosa* نشان داد.

خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با روش بتا-کاروتن‌زدایی نیز انجام و نتایج مقایسه‌ایی آنها با آنتی‌اکسیدانهای سنتتیک استاندارد در شکل ۳ نشان داده شده است. بازدارندگی پراکسیداسیون لیپید به وسیله اسانس لیمو تقریباً برابر یا بیش از قدرت آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک BHT و BHA بود. مقدار اسانس لازم برای ۵۰٪ رادیکال‌زدایی اسانس لیمو ۲۲/۸۱ µg/ml بود. پس از ترسیم شکل استاندارد فنل براساس میکروگرم گالیک اسید، محتوای فنلی و ظرفیت DPPHزدایی برای هر اسانس مشخص و سپس نسبت بین محتوای فنلی و ظرفیت DPPHزدایی تعیین گردید (شکل ٤). فنل کل اسانس خالص لیمو ۵۷/۴۳ µgGAE/mg بود. بازدارندگی پراکسیداسیون لیپید به وسیله اسانس لیمو تقریباً برابر یا بیش از قدرت آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک BHT و BHA بود (جدول ۲).

جدول ۱- تأثیر ضد میکروبی اسانس لیمو براساس ایجاد هاله عدم رشد

نام میکروارگانیسم	میانگین هاله ممانعت رشد (میلی‌متر)	انحراف معیار	ارزش D (دقیقه)
E. coli	۱۵/۷۵	۱/۷۱	۸/۵۷
Streptococcus faecalis	۱۰/۲۵	۰/۹۶	٦/٤۲
K. pneumonia	۱۱	۰/۸۲	۸/۵۷
S. aureus	۱۰/۵	۰/۵۸	۸/۵۷
P. aeruginosa	۰	۰	–
Candida albicans	۹	۱/۱۵	٦/٤۲

جدول ۲- محتوای فنلی معادل گالیک اسید و تعیین قدرت رادیکال‌زدایی (٪) و غلظت ۵۰٪ رادیکال‌زدایی (IC_{50}) اسانس لیمو در آزمایش DPPH و مقایسه با آنتی‌اکسیدانهای استاندارد

مقدار اسانس (µg)	DPPH درصد ممانعت inhibition(%)	انحراف معیار	معادل میکروگرم گالیک اسید در هر میلی‌گرم نمونه	انحراف معیار	IC_{50} (µg)
۱۰ µg	۲۱/٤۷	۰/٤٦	۵۷/٤۳	۱/۵۳	۲۲/۸۱
۵ µg	۱۱/۱۸	۰/۱٤	۲٦/۱۰	۱	
۲/۵ µg	٤/۱۸	۰/۱٦	۸/۷۷	۰/۵۸	
BHT 1mM	۱۲/٦٦				
BHA 1mM	۱۸/۱۲				
Trolox 1mM	۹۹/٦٤				

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- قدرت احیای فریک آنتی‌اکسیدان (FRAP) اسانس لیمو در سرم موش

نمونه	معادل $FeSO_4.7H_2O$ (µg/ml)	نسبت اسانس به شاهد (٪)
اسانس خالص لیمو	۴۰۵/۱۹±۸/۷	۱۷۸
شاهد	۲۲۶/۲۵±۵/۸	۱۰۰

جدول ٤- نتایج هماتولوژیک و شیمی بالینی نمونه‌های سرم خون موشهایی که به مدت یک ماه اسانس لیمو (*Citrus limon*) ۱۰۰ میکرولیتر در روز مصرف کردند

Parameters	Control	Mean value (Test)	% change	P value
Initial Body weight (g)	142.50±2.89	155±5	108.77	0.0083
Final Body weight (g)	157.50±5.00	199.67±4.51	126.77	0.0001
Weight gain (%)	110.53±2.92	128.84±1.26	18.31	0.0002
Erythrocyte count (RBC) ($\times10^6$/lL)	8.81±0.27	9.17±0.84	104.11	0.4461
Total white blood cell (WBC) and differential leukocyte count ($\times10^3$/µL)	9400±668.33	11666±1553.49	124.11	0.0442
Hemoglobin concentration (HGB) (g/dL)	15.83±0.17	16.4±1.35	103.63	0.4220
Hematocrit (HCT) (%)	48.18±1.31	47.9±1.65	99.43	0.8149
Platelet count (PLT) ($\times10^3$/µL)	238500±16583.12	566333±38475.10	237.46	0.0000
Red Cell Distribution Width [RDW (%)]	13.13±0.88	14.7±3.32	112.00	0.3928
Mean Platelet Volume (MPV)	7.20±0.39	7.23±0.51	100.46	0.9256
Mean corpuscular volume (MCV) (fL)	54.70±1.46	51.33±2.52	93.85	0.0735
Mean corpuscular hemoglobin (MCH) (pg)	18.25±0.57	17.83±0.15	97.72	0.2804
Mean corpuscular hemoglobin Concentration [MCHC (g/dL)]	33.40±1.19	34.47±1.52	103.19	0.3423
Fasting glucose (GLUC) (mg/dL)	221±7.79	199.67±1.53	90.35	0.0060
Blood Urea nitrogen (BUN) (mg/dL)	45.33±2.68	38.1±3.42	84.06	0.0253
Blood creatinine (CREA) (mg/dL)	0.64±0.10	0.56±0.12	87.66	0.3861
Uric acid	6.08±0.22	6.43±0.71	105.90	0.3737
Total cholesterol(CHOL) (mg/dL)	75.75±0.96	73±1.73	96.37	0.0417
Triglycerides (TRIG) (mg/dL)	45±9.20	54.67±5.51	121.48	0.1715
HDL	45.50±4.01	27.33±2.52	60.07	0.0010
LDL	15.05±1.92	23.67±0.58	157.25	0.0007
Cholesterol/HDL ratio	1.68±0.16	2.69±0.25	160.30	0.0013
LDL/HDL ratio	0.33±0.03	0.87±0.06	263.20	0.0000
SGOT	530.75±68.64	521.33±8.50	98.23	0.8267
SGPT	236.75±49.73	133.67±6.51	56.46	0.0176
Alkaline phosphatase (ALKP) (U/L)	136.75±33.42	231.33±11.93	169.17	0.0059

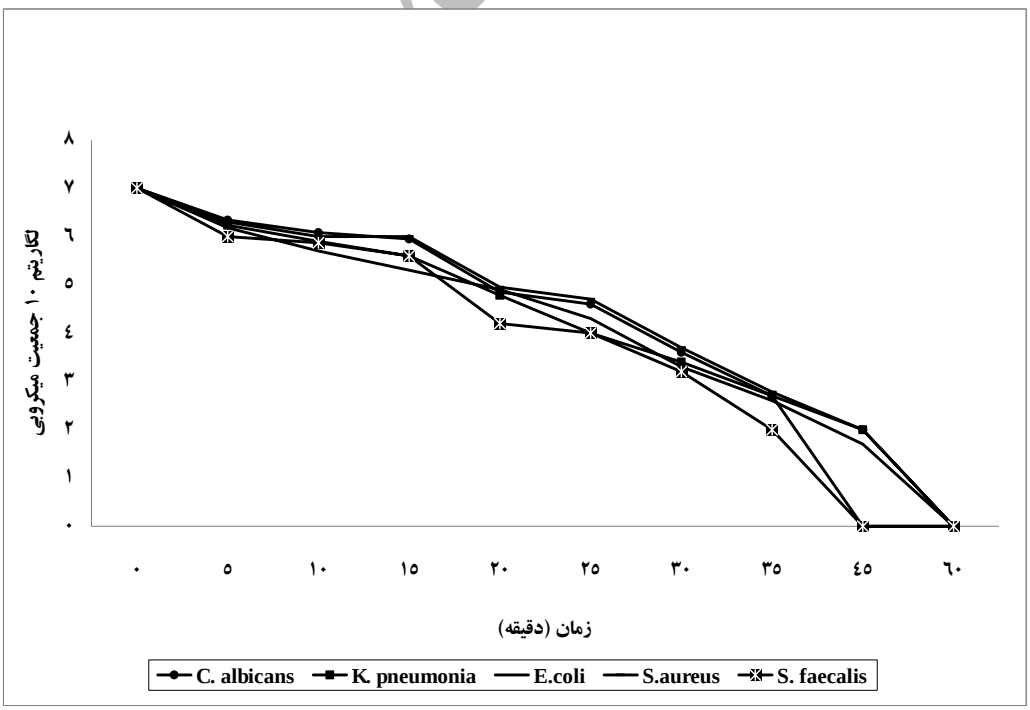
Archive of SID

www.SID.ir

قدرت آنتی‌اکسیدانی احیا فریک در سرم خون موشهایی که به مدت یک ماه و روزانه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اسانس گاواژ شده بودند، افزایش نشان داد (جدول ۳). تأثیرات درمانی در نتیجه تغذیه اسانس توسط موشها در خون آنها دیده شد (جدول ٤). غلظت ۵۰٪ کشندگی (IC_{50}) اسانس لیمو بر علیه سلولهای Hela و خون محیطی به‌ترتیب ۰/۹۷ و ۰/۵۷ میکروگرم در هر میلی‌لیتر ارزیابی گردید (جدول ۵).

جدول ۵- نتایج تاثیر توکسیک رقتهای مختلف اسانس لیمو بر سلولهای سرطانی و طبیعی انسان

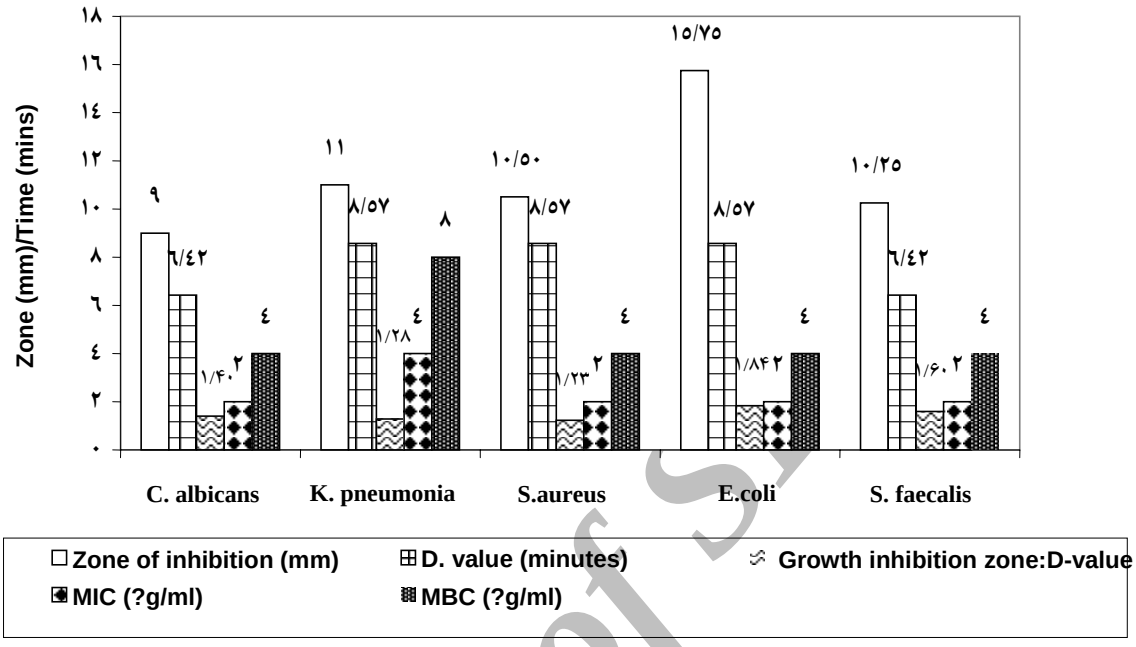
رقت لیمو	درصد سلول زنده Hela	درصد مرگ سلول Hela	رقت لیمو	درصد لنفوسیتهای زنده	درصد مرگ لنفوسیتها
۰	۱۰۰±۱۱/۳۲	۰	۰	۱۰۰±۳/۰۹	۰
۰/۱	۰/۲۱±۰	۹۹/۷۹	۰/۱	۷۳/۲۷±۱/۱۳	۲٦/۷۳
۰/۰۵	۳/٤۲+۱/۱۹	۹٦/۵۸	۰/۰۱	۷۹/۷۰±۸/۸۰	۲۰/۳۰
۰/۰۲۵	۱۲/۳۳±۲/۰۵	۸۷/٦۷	۰/۰۰۱	۹۲/۵۷±۳/۳۵	۷/٤۳
۰/۰۱۲۵	٤۲/٤۷±۱/۱۹	۵۷/۵۳	–	–	–
۰/۰۰٦۲۵	٦۳/۷۰±۱۵/۵۱	۳٦/۳۰	–	–	–
IC_{50}	۰/۹۷ µg			۰/۵۷ µg	



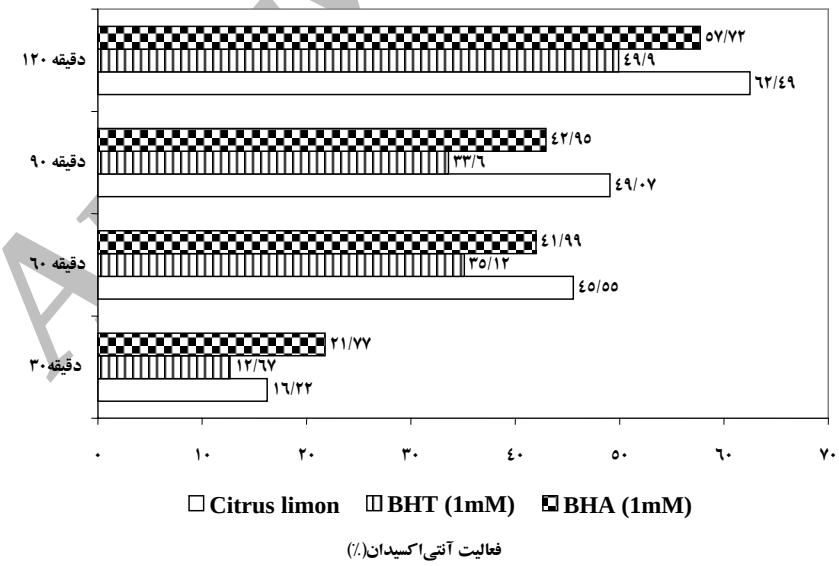
شکل ۱- سینتیک مرگ میکروبی در مواجهه با اسانس لیمو

Archive of SID

www.SID.ir

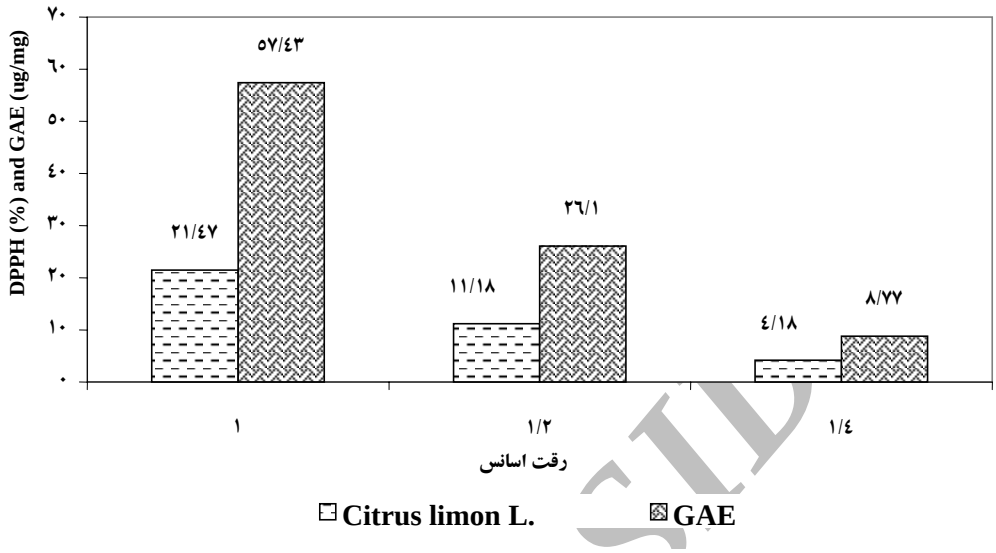


شکل ۲- رابطه قطر هاله ممانعت رشد با سینتیک مرگ میکروبی در مواجهه با اسانس لیمو



شکل ۳- مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس لیمو با آنتی‌اکسیدان‌های استاندارد با روش بتا-کاروتن

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ٤- رابطه فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) اسانس لیمو با محتوای گالیک اسید (GAE) آن

بحث

در مطالعه حاضر ترکیب شیمیایی و فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسسیته اسانس لیمو مورد آزمایش قرار گرفت. حساسیت میکروبی در مواجهه با اسانس متفاوت بود. خاصیت ضد قارچی اسانس لیمو با هدف نگهداری مواد غذایی با موفقیت گزارش شده‌است (Viuda-Martos *et al.*, 2008). مطالعه تأثیر ضد میکروبی اسانس تفاوت عمده‌ای را نسبت به هر میکروارگانیسم در رقت‌های مختلف نشان داد که مؤید نظر Bagci و Digrak (۱۹۹٦) در مقایسه با سایر روغن‌های فرار می‌باشد. این محققان روغن‌های اسانسی را از نظر قدرت میکروب‌کشی به سه دسته غیرفعال، تقریباً فعال و بسیار فعال تقسیم‌بندی نموده‌اند. ضمن تأیید این مطلب، می‌توان اضافه کرد که چنین تقسیم‌بندی در خصوص میزان تأثیرپذیری میکروارگانیسم‌های متنوع از یک نوع اسانس نیز صحیح است. تأثیر بازدارندگی رقت‌های مختلف روغن‌های اسانسی بر رشد میکروارگانیسم‌ها نشان داده که باکتریها و مخمرها حساستر از سایرمیکروارگانیسم‌ها هستند (Kivanc & Agkul, 1986). به‌طوری که بررسی هاله عدم رشد میکروبی و حداقل زمان لازم برای کشتن میکروارگانیسم‌ها نشان می‌دهد که اندازه قطر هاله عدم رشد ارتباط چندانی با سینتیک میکروب‌کشی آن ندارد (شکل ۲). همان‌طوری که در این مطالعه نشان داده شد هر چند قدرت ضد میکروبی اسانس بیشتر بود ولی در تست انتشار، بعضاً هاله‌هایی با قطر کمتر ولی قدرت میکروب‌کشی بیشتر دیده می‌شد که این موضوع با نظر Pandey و همکاران (۱۹۹٦) مطابقت دارد. ممکن است اسانس با ایجاد هاله بزرگ، زمان بیشتری نیز برای میکروب‌کشی لازم داشته باشد. بنابراین می‌توان استنباط نمود که اندازه قطر هاله‌های عدم رشد دقیقاً نمی‌تواند بیانگر MIC یا MBC باشد و برای تعیین میزان حساسیت

Archive of SID
www.SID.ir

هر میکروارگانیسم به هر ماده ضد میکروبی تعیین قطر هاله و MIC و MBC لازم است. این اختلاف تأثیر روغن‌های فرآر بر عوامل بیماری‌زا، نشان‌دهنده ترکیب‌های شیمیایی مؤثر، متفاوت و خاص آنها نسبت به یکدیگر و نسبت به عوامل بیماری‌زاست و این اختلاف با گیاهان مختلف و گونه‌های متفاوت بیشتر می‌شود که نشان‌دهنده وابستگی ترکیب‌های شیمیایی اسانس‌ها از گونه‌های مختلف گیاهی و شرایط اقلیمی آنها (Shu & Lawrence, 1997) و حتی احتمال موارد استفاده دارویی گوناگون یک گونه گیاهی می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد بیشترین خاصیت ضد میکروبی در کلیه اسانس‌های مورد مطالعه مرهون ترکیب‌های منوترپنی مانند لیمونن باشد (Lis-Balchin *et al.*, 1998).

به هر حال گزارشی از مطالعه خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس لیمو در دسترس است (Misharina & Samusenko, 2008). فنل کل اسانس خالص لیمو ۵۷/۴۳ µg GAE/mg بود (جدول ۲). فنلها و فلاونوئیدهای گیاهی ممانعت پراکسیداسیون لیپید را با فرونشانی رادیکالهای پروکسی و احیا یا کلاته‌کردن آهن در آنزیم لیپوکسیژناز و نهایتاً ممانعت از شروع واکنش پراکسیداسیون لیپید، انجام می‌دهند (Takahama, 1985؛ orel *et al.*, 1986). روشهای زیادی برای ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های بیولوژیکی وجود دارد که همگی به‌طور کلی زیر دو مجموعه و براساس نوع واکنش طبقه‌بندی می‌شوند (Huang *et al.*, 2005). روشهای دربرگیرنده واکنش انتقال الکترون شامل سنجش فنل کل با استفاده از Folin–Ciocalteu reagent، TEAC و DPPH radical-scavenging assay هستند. آزمایش سنجش رادیکال‌زدایی DPPH روش حساس و مستقل از قطبیت سوبستر است (Yamaguchi *et al.*, 1998). DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که می‌تواند با گرفتن یک الکترون یا رادیکال هیدروژن به یک مولکول دیامغناطیس پایدار تبدیل شود. نسبت معنی‌داری بین محتوای فنلی و ظرفیت DPPH زدایی برای هر ادویه‌ای گزارش شده است (Ho *et al.*, 2008). در این مطالعه ظرفیت DPPH زدایی اسانس با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک استاندارد مقایسه شد (شکل ۳). به‌طوری که تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند مربوط به توانایی زدودن رادیکالهای پروکسی، رادیکالهای آزاد DPPH و رادیکالهای هیدروکسی باشد (Singh *et al.*, 2005). بنابراین اسانس‌ها با محتوای فنلی بالا و خاصیت خوب آنتی‌اکسیدانی می‌توانند برای اهداف تغذیه‌ای و نگهداری مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند (Thippeswamy & Naidu, 2005). نسبت مثبت بین محتوای فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و اسانس‌ها گزارش شده (Tzung-Hsun *et al.*, 2008) و مطالعه حاضر مؤید آن است (شکل ٤). تحقیقات قبلی دیگران مبنی بر تأثیر خوراکی ادویه‌ها بر سلامتی مبتنی بر وجود گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی مانند سوپراکسید، پروکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل در بدن است (Suhaj, 2006). نتایجی مانند فراوانی نسبی ترکیب‌های فنلی و ارتباط معنی‌دار با خاصیت آنتی‌کسیدانی براساس روشهای سنجشی بتا-کاروتن یا DPPH می‌تواند در تأیید مطالعات دیگران باشد (Dragland *et al.*, 2003؛ Shan *et al.*, 2005).

قدرت آنتی‌اکسیدانی احیا فریک در سرم خون موشهایی که به مدت یک ماه و روزانه به میزان ۱۰۰µl اسانس گاواژ شده بودند افزایش نشان داد (جدول ۳). فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به محتوای فنلی اسانس

Archive of SID

www.SID.ir

مربوط باشد و محتوای فنلی ادویه‌جات مختلف ظاهراً با تأثیر محافظتی در برابر پراکسیداسیون لیپید نسبت مستقیمی دارند (Ho *et al*., 2008). تأثیرات درمانی در نتیجه تغذیه اسانس‌ها توسط موشها در خون آنها دیده شد (جدول ٤). افزایش وزن در موشها دیده شد که در خصوص مصرف لیمو معنی‌دار بود. مصرف اسانس لیمو میزان پلاکت‌ها را به‌طور چشمگیری افزایش داد (جدول ٤) و موجب کاهش معنی‌دار ١٠ درصدی (P=٠/٠٠٦) قندخون ناشتا و ١٦ درصدی نیتروژن اوره خون (P= ٠/٠٢) و کاهش آنزیم کبدی SGPT شد که حکایت از آثار مفید لیمو و در عین حال کاهش HDL و از طرف دیگر افزایش معنی‌دار نسبت Cholesterol/ HDL و LDL/ HDL و آنزیم آلکالین فسفاتاز از محل نگرانی در مصرف بی‌رویه این اسانس داشته که لزوم تعیین دوز مصرفی را می‌طلبد تا مانع اثر سوء مصرف اسانس گردد. البته اسانس‌ها و عصاره‌های محتوی فنل زیاد و خاصیت آنتی‌اکسیدانی خوب برای مصارف غذایی مناسب هستند. اخیراً Dragland و همکاران (٢٠٠٣) نشان دادند که مصرف یک گرم از ادویه‌هایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر بسزایی در سلامتی دارد. غلظت ٥٠٪ کشندگی (IC_{50}) اسانس لیمو بر علیه سلولهای Hela و خون محیطی به‌ترتیب ٠/٩٧ و ٠/٥٧ میکروگرم در هر میلی‌لیتر ارزیابی گردید(جدول ٥). با توجه به تأثیر منفی مقدار کم اسانس لیمو بر سلولهای سالم خون محیطی، می‌توان تأثیر منفی خوراکی این اسانس و عصاره را با توجه به نتایج هماتولوژیک و شیمی بالینی نمونه‌های سرم خون توجیه کرد. تأثیر اسانس و عصاره فوق و مخصوصاً عصاره رُز بر سلولهای سرطانی امیدوارکننده بود. پیشگیری شیمیایی سرطان عبارت است از استفاده ترکیب‌های شیمیایی یا غذایی برای بلوکه، ممانعت یا برگشت ایجاد سرطان در بافت طبیعی یا پری نئوپلاستیک (Samarth *et al*., 2006). نتایج این مطالعه ارزش توجه از دریچه خاصیت آنتی‌اکسیدانی و کموتراپی ضد نئوپلاستی (anti-neoplastic chemotherapy) پیدا می‌کنند که می‌تواند پایه یک تحقیق ارزشمند دیگر قرار گیرد. نتایج نشان می‌دهد که اسانس لیمو با احتیاط و فقط پس از تعیین دوز مورد مصرف قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی وزارت بهداشت و نیز جناب آقای محمدعلی رضایی (مدیر عامل شرکت ایمان مهر) که با تأمین هزینه‌های این طرح امکان عملی‌شدن آن را فراهم نمودند کمال تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

منابع مورد استفاده

- Bagci, E. and Digrak, M., 1996. Antimicrobial acyvity of essential oils of some *Abies* (Fir) species from Turkey. Flavour and Fragrance Journal, 11: 251-256.
- Been, J., Akhila, R. and Abraham, E., 2007. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Hedychium coronarium*. Phytotherapy Research, 21(5): 439-443.
- Benzie, I.F.F. and Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.
- D'Auria, F.D., Laino, L., Strippoli, V., Tecca, M., Salvatore, G., Battinelli, L. and Mazzanti, G., 2001. In vitro activity of the Tea tree oil against *Candida albicans* mycelial conversion and other pathogenic fungi. Journal of Chemotherapy, 13: 377-383.
- Dehghan, G., Solaimanian, R., Shahverdi, A.R., Amin, G., Abdollahi, M. and Shafiee, A., 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Ferula szowitsiana* D.C. Flavour and Fragrance Journal, 22(3): 224-227.
- Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K. and Blomhoff, R., 2003. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. Journal of Nutrition, 133: 1286-1290.

Archive of SID

www.SID.ir

- Feng, W. and Zheng, X., 2007. Essential oils to control *Alternaria alternata in vitro* and *in vivo*. Food Control, 18: 1126-1130.
- Fernandez-Lopez, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Perez-Alvarez, J.A. and Kuri, V., 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application on cooked meat balls. Meat Science, 69: 371-380.
- Fontenelle, R.O.S., Morais, S.M., Brito, E.H.S., Kerntopf, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Tome, A.R., Queiroz, M.G.R., Nascimento, N.R.F., Sidrim, J.J.C. and Rocha, M.F.G., 2007. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59: 934-940.
- Hayes, A.J. and Markovic, B., 2002. Toxicity of the Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. Food and Chemical Toxicology, 40: 535-543.
- Ho, S.C., Tsai, T.H., Tsai, P.J. and Lin, C.C., 2008. Protective capacities of certain spices against peroxynitrite-mediated biomolecular damage. Food and Chemical Toxicology, 46: 920-928.
- Huang, D., Boxin, O.U. and Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 1841-1856.
- Kabara, J.J., 1991. Phenols and chelators. 200-214, In: Russell, N.J. and Gould, G.W., (Eds.), Food preservatives, Blackie, Glasgow, 381p.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K. and Kujala, T.S., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 3954-3962.
- Kivanc, M. and Akgul, A., 1986. Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. Flavour and Fragrance Journal, 1: 175-179.
- Lau, C.B.S., Ho, C.Y., Kim, C.F., Leung, K.N., Fung, K.P., Tse, T.F., Chan, H.H.L. and Chow, M.S.S., 2004. Cytotoxic activities of Coriolus versicolor (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. Life Science, 75: 797-808.
- Lis-Balchin, M., Deans, S.G. and Eaglesham, E., 1998. Relationship between biactivity and chemical composition of commercial essential oils. Flavour and Fragrance Journal, 13: 98-104.
- Lopez-Malo, A., Alzamora, S.M. and Guerrero, S., 2000. Natural antimicrobials from plants. 237-363, In: Stella, M. Alzamora, S.M. Tapia M.S. and Lopez-Malo, A., (Eds.), Minimally processed fruits and vegetables, fundamental aspects and applications, Aspen Publishers, Gaithersburg, 361p.
- Lu, M., Battinelli, L., Daniele, C., Melchioni, C., Salvatore, G. and Mazzanti, G., 2002. Muscle relaxing activity of *Hyssopus officinalis* essential oil on isolated intestinal preparations. Planta Medica, 68: 213-216.
- Millet, Y., Jouglard, J., Steinmetz, M.D., Tognetti, P., Joanny, P. and Arditti, J., 1981. Toxicity of some essential oils, clinical and experimental study. Clinical Toxicology, 18: 1485-1498.
- Misharina, T.A. and Samusenko, A.L., 2008. Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove and their mixtures. Applied Biochemistry and Microbiology, 45(4): 438-442.
- Naganuma, M., Hirose, S., Nakayama, Y., Nakajima, K. and Someya, T., 1985. A study of phototoxicity of lemon oil. Archives of Dermatology Research, 278: 31-36.
- Orafidiya, L.O., Agbani, E.O., Iwalewa, E.O., Adelusola, K.A. and Oyedapo, O.O., 2004. Studies on the acute and sub-chronic toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. leaf. Phytomedicine, 11: 71-76.
- Pandey, M.C., Sharma, J.R. and Anupam, D., 1996. Antifungal evaluation of the essential oil of *Cymbopogon pendulus* (Nees ex St. eud) wats. cv. Praman. Flavour and Fragrance Journal, 11: 257-260.
- Plumb, J.A., Milroy, R. and Kaye, S.B., 1989. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. Cancer Research, 49: 4435-4440.
- Rasooli, I., Taghizadeh, M., Rezaei, M.B. and Alipoor Astaneh, S.D., 2008. Antibacterial and antioxidative characterization of essential oils from *Mentha piperita* and *Mentha spicata* grown in Iran. ACTA Alimentaria, 37: 41-52.
- Samarth, R.M., Panwar, M., Kumar, M. and Kumar, A., 2006. Protective effects of Mentha piperita Linn on benzo[a]pyrene-induced lung carcinogenicity and mutagenicity in Swiss albino mice. Mutagenesis, 21: 61-66.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M. and Corke, H., 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 7749-7759.
- Shu, C. and Lawrence M.B., 1997. Reasons for the variation in composition of some commercial essential oils. 138-159, In: Sara, J.R. and Chi-Tang H. (Eds.), Spices, Flavor Chemistry and Antioxidant Properties. ACS Symposium Series, 660p.
- Singh, G., Marimuthu, P., Murali, H.S. and Bawa, A.S., 2005. Antioxidative and antibacterial

Archive of SID

www.SID.ir

- Tzung-Hsun, T., Tsung-Hsien, T., You-Chia, C., Chi-Wei, L. and Po-Jung, T., 2008. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. Food Chemistry, 110: 859-864.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. and Perez-Alvarez, J., 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. Food Control, 19(12): 1130-1138.
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. and Terato, J., 1998. HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 62: 1201-1204.
- Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Darvish, A. Astaneh, S. and Rasooli, I., 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. Phytochemistry, 67(12): 1249-1255.

potentials of essential oils and extracts isolated from various spice materials. Journal of Food Safety, 25: 130-145.
- Suhaj, M., 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. Journal of Food Composition Analysis, 19: 531-537.
- Takahama, U., 1985. Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: Mechanism of antioxidative function. Phytochemistry, 24: 1443-1446.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M. and Polissiou, M., 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). Food Chemistry, 90: 333-340.
- Thippeswamy, N.B. and Naidu, K.A., 2005. Antioxidant potency of cumin varieties-cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systems. European Food Research and Technology, 220: 472-476.
- Torel, J., Cillard, J. and Cillard, P., 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. Phytochemistry, 25: 383-385.

Archive of SID

www.SID.ir

Antimicrobial, antioxidant, hematologic and cytotoxic properties of *Citrus limon* L. essential oil

S.M. Sharafi[1], I. Rasooli[2*], T. Allahghadri[1], M.R. Jalali Nadoushan[3] and M.B. Rezaei[4]

1- MSc Student, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Biology, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
E-mail: rasooli@shahed.ac.ir
3- Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
4- Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran

Received: December 2009 Revised: January 2010 Accepted: March 2010

Abstract

In the present study the antimicrobial, antioxidative, hematologic and cytotoxic properties of *Citrus limon* L. essential oil were studied. The bacterial strains sensitive to *Citrus limon* L. oil were in the following order: *E. coli*> *K. pneumonia*> *S. aureus*> *Streptococcus faecalis*> *Candida albicans*> *P. aeruginosa*. The minimum inhibitory and bactericidal concentrations of the fresh oil were determined. The essential oils had good bactericidal and bacteriostatic properties except for *P. aeruginosa*. Antioxidative property of the oil was carried out by using beta-carotene bleaching test and the results were compared to the standard synthetic antioxidants. Lipid peroxidation inhibitions were comparable or higher than the synthetic antioxidant BHT and BHA. The oil concentration required for 50% free radical scavenging (IC_{50}) was 22.81 µg/ml with total phenol contents of 57.43 µg GAE/mg for *C. limon* L. oil. Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) in the blood sera of the rats gavaged with a daily dose of 100 µl oil increased. Therapeutic effects were noted as a result of feeding the rats with lemon essential oil. The volatile oil of lemon displayed cytotoxic effects on the human tumor cell line (Hela cells) and peripheral blood cells with the IC_{50} of 0.97 and 0.57µg/ml respectively. The results showed that the lemon oil might be consumed with precautions after dose determination.

Key words: Antimicrobial, cytotoxcicity, antioxidant, essential oils, *Citrus limon* L.

Archive of SID

www.SID.ir