Journal of
Arak University of Medical Sciences

April & May 2021. Vol 24. Issue 1

Research Paper

# Evaluating the Anti-proliferative Effects of Nanoemulsion Containing Licorice Extract and Lavender Essential Oil on Cancer

**Zohreh Karimi Taheri[1], Mohammad Hosein Aarabi[2], Ali Nazari-Alam[3], Majid Nejati[4], Mohammad Shayestehpour[3], Hamid Reza Gilasi[5], Afshin Salehi[6], *Mohammad Esmaeil Shahaboddin[1,7]**

1. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
2. Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
4. Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
5. Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Health, Kashan University of Medical Sciences, Kashan.
6. Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Paramedical Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
7. Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

Use your device to scan and read the article online

**Citation:** Karimi Taheri Z, Aarabi MH, Nazari-Alam A, Nejati M, Shayestehpour M, Gilasi H, et al. [Evaluation of Anti-proliferative Effects of Nanoemulsion Containing Licorice Extract and Lavender Essential Oil Against Cancer Cells and its Antimicrobial Properties: An in Vitro Study (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2021; 24(1):84-97. https://doi.org/10.32598/JAMS.24.1.6088.1

https://doi.org/10.32598/JAMS.24.1.6088.1

CC BY NC

**Article Info:**
Received: 21 Jan 2020
Accepted: 28 Jul 2020
Available Online: 01 April 2021

**Keywords:**
Emulsions, Lavender, Licorice, Anti-infective agents, Anticancer agent

## ABSTRACT

**Background and Aim** Despite the anti-cancer and antimicrobial properties of licorice extract and lavender essential oil, some factors, such as low bioavailability and biodegradable, limit their therapeutic use. Using nanoparticles is a method to overcome these restrictions. This study aimed to investigate the anti-proliferative effects of nanoemulsion containing licorice extract and lavender essential oil on cancer cells; we also evaluated its antimicrobial properties in vitro.

**Methods & Materials** In this experimental study, nanoemulsions, containing licorice extract and lavender essential oil were developed by the spontaneous emulsion method. The anti-proliferative effect of nanoemulsion was investigated using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) colorimetric method on two cell lines HepG2 and SK-MEL-3. To measure the antimicrobial effect of 4 standard strains of Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermidis, and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method was used.

**Ethical Considerations** This study was approved by the Ethics Committee of Kashan University of Medical Sciences (Code: IR.KAUMS.MEDNT.REC.1396.106).

**Results** The results of MTT test on HepG2 cells indicated that the concentrations of 630, 1250, and 2500 µg/mL nanoemulsions caused toxicity to the cell and led to the death of >50% of the cells (IC50=401µg/mL; P<0.05). Evaluating SK-MEL3 cells revealed that except for 75 µg of nanoemulsion, other concentrations induced death in >50% of the cells (IC50 = 82 µg/mL; P<0.05). In addition, nanoemulsions, with antimicrobial properties, were studied in 4 strains of bacteria; the highest antimicrobial properties were observed in Staphylococcus epidermidis.

**Conclusion** Nanoemulsion containing licorice extract and lavender essential oil presents antimicrobial and antiproliferative effects on the two cell lines studied. The current study results indicated that the nano emulsification of lavender essential oil and licorice extract can enhance their biological impact; thus, they can be used as a drug formulation.

***Corresponding Author:***
**Mohammad Esmaeil Shahaboddin, PhD.**
**Address:** Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
**Tel:** +98 (31) 55540021
**E-mail:** shahaboddin@kaums.ac.ir

## Extended Abstract

### 1. Introduction

Licorice and lavender plants have anticancer [4, 13] and antimicrobial [5, 15] properties; however, due to their low bioavailability and degradability, their use as a medicine has limitations [16, 17]. One approach to overcome these restrictions is to use nanoparticles. Nanoemotions ensure the protection of biological compounds and their controlled release [19]. This study aimed to evaluate the antiproliferative effects of nanoemulsions containing licorice extract and lavender essential oil on liver cancer cell lines (HepG2) and skin cancer cells (SK-MEL3). We also explored its antimicrobial properties on Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Staphylococcus epidermidis in vitro.

### 2. Materials and Methods

In this experimental study, nanoemulsions containing licorice extract and lavender essential oil were generated by the spontaneous emulsion method. To make the nanoemulsion, the aqueous phase, consisting of glycerol, polyethylene glycol solvent, and water, as well as the oil phase, including lavender essential oil, licorice extract, and emulsifiers (Tween 20 & Tween 80), were each prepared separately and combined and homogenized after heating. Single-Phase and transparent nanoemulsions were obtained. The antiproliferative effect of nanoemulsion on HepG2 and SK-MEL3 cell lines was investigated using MTT colorimetric method. Four standard bacterial strains and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method were used to measure the antimicrobial effect. The last batch of nanoemulsion, in which no growth was observed, was considered as MIC. To analyze the obtained data, a one-way Analysis of Variance (ANOVA) was employed in SPSS at $P<0.05$.

### 3. Results

The results of the examination on HepG2 cells revealed that the IC50 level of nanoemulsion was 401 µg/mL ($P<0.05$). However, the concentration of 2500 licorice extracts could only kill 28% of the cells. The IC50 value for lavender essential oil was measured as 450 ($P<0.05$) (Figure 1). Examining SK-MEL3 cells suggested that the IC50 nanoemulsion concentration was 82 µg/mL ($P<0.05$). Lavender essential oil had similar toxicity to nanoemulsions; however, licorice extract was toxic only at the concentrations of 1250 and 2500 ($P<0.05$) (Figure 2).

In the study of nanoemulsion toxicity, the desired bacterial strains were subjected to concentrations of 0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10 mg/mL nanoemulsion (Figure 1). The collected results indicated that the nanoemulsion presented an inhibitory effect on the growth of all bacterial used strains. The highest inhibitory effect concerned Staphylococcus aureus with MIC 5 mg/mL. The MIC for the other 3 strains was equal to 10 mg. Licorice extract did not affect Staphylococcus aureus and Escherichia coli but inhibited the growth of Pseudomonas and Staphylococcus epidermidis. The lavender essential oil also inhibited the growth of all strains except Pseudomonas (Table 1).

### 4. Discussion and Conclusion

The current study results revealed that the nanoemulsion is toxic to cancer cells. The anti-proliferative effect of licorice extract and lavender essential oil has been proven in previous studies [10, 20]. When cancer cells become malignant, they produce sustained ROS, leading to tumor growth and progression [21]. Using antioxidants, such as lavender essential oil, licorice extract, or nanoemulsions prepared from them can help improve the function of anti-cancer agents by reducing the amount of ROS.

Considering the effects of licorice and lavender, it was expected that the nanoemulsion form of licorice extract and

**Table 1.** The MIC of nanoemulsion, lavender essential oil, and licorice extract on 4 bacterial strains

| Bacteria | MIC Rate (mg / ml) | | |
|---|---|---|---|
| | Nanoemulsion | Essence | Licorice Extract |
| Staphylococcus aureus | 10 | 5 | - |
| Escherichia coli | 10 | 2.5 | - |
| Pseudomonas aeruginosa | 10 | - | 1.25 |
| Staphylococcus epidermidis | 5 | 5 | 5 |

Journal of Arak University of Medical Sciences

(-): No effect on bacterial growth.

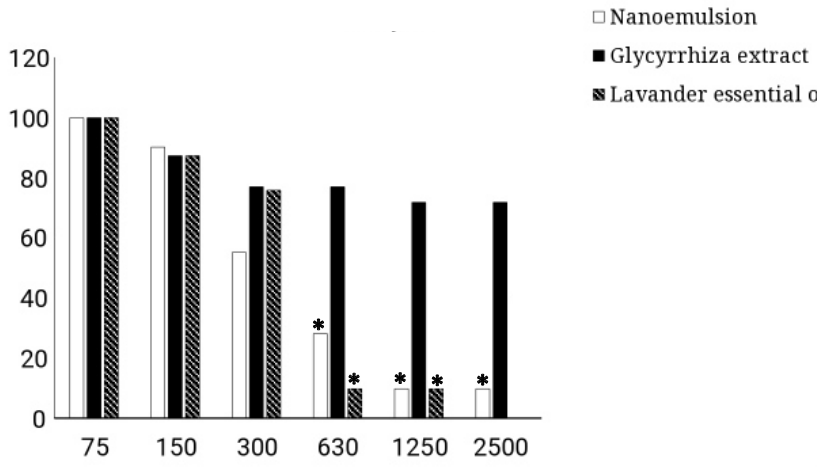



**Figure 1.** The percentage of HEPG2 cells surviving against different concentrations of nanoemulsion

*A significant difference of >50% (P<0.05).

lavender essential oil present a high potential to become a formulation with anti-proliferative properties against cancer cells due to its physical stability. The present study revealed that the mentioned nanoemulsion has such a property. Furthermore, the cytotoxicity of nanoemulsion is higher than licorice extract and equal to lavender essential oil. Given the hydrophobicity and volatility of the essential oils, the conversion of the essential oil into a stable nanoemulsion can be useful. These results were consistent with those of the study of Ziaee and associates [25].

The antimicrobial effects of nanoemulsion highlighted that this nanoemulsion had the highest level of inhibition on the growth of Staphylococcus epidermidis; its inhibitory effect was the same on other strains. The antibacterial effect of lavender essential oil was greater than nanoemulsion in all strains; however, licorice extract provided an inhibitory effect only on Pseudomonas and Staphylococcus epidermidis.

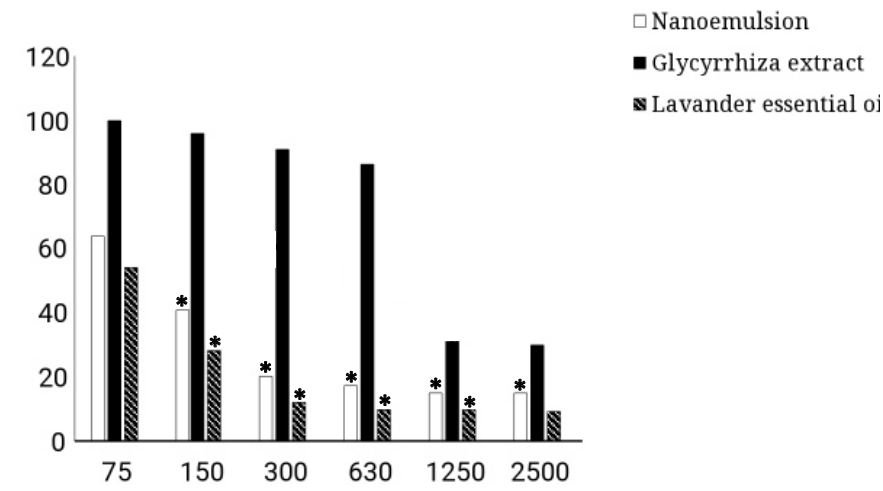



**Figure 2.** The survival percentage of SK-MEL3 cells against different concentrations of nanoemulsion

*A significant difference of >50% (P<0.05).

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Research Ethics Committee of Kashan University of Medical Sciences (Code: IR.KAUMS.MEDNT.REC.1396.106).

### Funding

The paper was extracted from the MSc. thesis of the first author, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of medicine, Kashan University of Medical Sciences (KAUMS, Grant No: 96203).

### Authors' contributions

Conceptualization and validation methodology of data analysis: Mohammad Esmaeil Shahaboddin, Mohammad Hossein Aarabi; Research, analysis, and sources: Ali Nazari-Alam, Mohammad Shayestehpour, Majid Nejati, Hamidreza Gilasi, and Afshin Salehi; Drafting: Zohreh Karimi Taheri.

### Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

### Acknowledgements

We would like to thank the esteemed the Vice Chancellor for Research and Technology of Kashan University of Medical Sciences.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

# بررسی اثرات ضد تکثیری نانوامولسیون حاوی شیرین بیان و لاواند بر علیه سلول‌های سرطانی و خواص ضد میکروبی آن

زهره کریمی طاهری[۱]، محمدحسین اعرابی[۲]، علی نظری عالم[۳]، مجید نجاتی[۴]، محمد شایسته‌پور[۳]، حمیدرضا گیلاسی[۵]، افشین صالحی[۶]، *محمد اسماعیل شهاب‌الدین[۱۷]

۱. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.
۲. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.
۴. مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.
۵. گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.
۶. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.
۷. مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران .

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۰۱ بهمن ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۰۷ مرداد ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۲ فروردین ۱۴۰۰

## چکیده

**زمینه و هدف** گیاهان شیرین‌بیان و لاواند دارای اثرات ضدسرطانی و ضدمیکروبی هستند، اما به دلیل فراهمی زیستی پایین و تخریب‌پذیر بودن، استفاده از آنها به عنوان دارو محدودیت‌هایی دارد. یکی از راه‌های رفع این محدودیت‌ها، استفاده از نانو ذرات است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات ضدتکثیری نانوامولسیون حاوی عصاره شیرین‌بیان و اسانس لاواند علیه سلول‌های سرطانی و خواص ضدمیکروبی آن در محیط برون‌تنی است.

**مواد و روش‌ها** در این مطالعه تجربی نانوامولسیون حاوی عصاره شیرین‌بیان و اسانس لاواند به روش امولسیون‌سازی خودبه‌خودی ساخته شد. اثر ضدتکثیری نانوامولسیون با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT روی دو رده سلولی HepG2 و SK-MEL-3 بررسی شد. برای سنجش اثر ضدمیکروبی از چهار سویه باکتری استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و روش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) استفاده شد.

**ملاحظات اخلاقی** این مطالعه با کد اخلاق IR.KAUMS.MEDNT.REC.1396.106 در مورخ ۹۶/۱۱/۹ به تصویب کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان رسید.

**یافته‌ها** نتایج حاصل از تست MTT روی سلول‌های HepG2 نشان داد غلظت‌های ۲۵۰۰، ۱۲۵۰ و ۶۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوامولسیون برای سلول سمیت ایجاد کرده و موجب مرگ بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها شده‌اند (IC50=401µg/ml) (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از این ارزیابی روی سلول‌های SK-MEL3 نشان داد که به استثنای غلظت ۷۵ میکروگرم نانوامولسیون، بقیه غلظت‌های آن سبب مرگ بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها شده‌اند (IC50=۸۲) (P<۰/۰۵). به علاوه، نانوامولسیون دارای خواص ضدمیکروبی در چهار سویه باکتری مورد مطالعه شده و بیشترین خاصیت ضدمیکروبی آن در باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری** نانوامولسیون حاوی عصاره شیرین‌بیان و اسانس لاواند دارای اثرات ضدمیکروبی و ضدتکثیری علیه دو رده سلولی مورد مطالعه است. نتایج این مطالعه نشان داد که تبدیل عصاره و اسانس به شکل نانوامولسیون می‌تواند اثرات بیولوژیک آنها را افزایش داده و به عنوان یک فرمولاسیون دارویی جدید به کار رود.

**کلیدواژه‌ها:**
شیرین‌بیان، لاواند، نانوامولسیون، ضدمیکروبی، ضدتکثیری

* **نویسنده مسئول:**
**دکتر محمد اسماعیل شهاب‌الدین**
**نشانی:** کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک.
**تلفن:** ۵۵۵۴۰۰۲۱ (۳۱) ۹۸+
**پست الکترونیکی:** shahaboddin@kaums.ac.ir

## مقدمه

استفاده از گیاهان برای درمان بیماری‌ها پیشینه تاریخی داشته و گیاهان دارویی پایه و اساس بسیاری از درمان‌ها در طب سنتی بوده‌اند. امروزه گیاهان دارویی به دلیل داشتن عوارض جانبی کم، تنوع در مواد مؤثر، اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی قوی و توانایی پیشگیری از رشد تومورها محل توجه ویژه بسیاری از محققین حوزه سلامت هستند [۱].

در دهه‌های اخیر گیاهان به عنوان یکی از منابع اصلی برای تولید داروهای ضدسرطان و آنتی‌بیوتیک‌های جدید اهمیت جهانی یافته‌اند. شیرین‌بیان[1] و اسطوخودوس، ازجمله این گیاهان دارویی هستند. شیرین‌بیان گیاهی است از خانواده باقلاییان که بومی مناطق آسیایی است. ریشه شیرین‌بیان سرشار از مواد فعالی همچون ترپن‌ها و ترکیبات فنولی است که موجب ایجاد خواصی نظیر اثر ضدمیکروبی، ضدسرطان، ضدزخم، ضدالتهاب و ضدحساسیت شیرین بیان می‌شوند [۲].

در مطالعات مختلف اثر ضدسرطانی این گیاه بررسی شده است. در مطالعه نامورا و همکاران نشان داده شد که عصاره ریشه شیرین‌بیان می تواند از تکثیر سلول‌های سرطانی در بدن جلوگیری کند [۳]. در مطالعه دیگری نشان داده شد که عصاره شیرین‌بیان می‌تواند موجب مرگ سلول‌های سرطان کبد (HepG2) در محیط In Vitro شود [۴].

ریشه شیرین‌بیان اثر ضدباکتری نیز دارد. نیتالیکار و همکاران، اثر عصاره ریشه شیرین‌بیان را بر چند گونه باکتری گرم مثبت (Bacillus subtili و Stapphylococcus aureus) و گرم منفی (Escherichia coli و Pseudomonas aeruginosa) بررسی کرده و نشان دادند که تمامی این باکتری‌ها به عصاره شیرین‌بیان حساس هستند [۵].

اسطوخودوس یا لاواند[2]، گیاهی متعلق به خانواده نعناعیان است که با طعمی تلخ جهت داشتن بوی مطبوع در عطرسازی استفاده می‌شود [۶]. در گذشته از این گیاه برای درمان بیماری‌های پوستی مانند اگزما و زخم استفاده می‌شده است [۷]. در مطالعات مختلف، اثرات ضددردی [۶، ۸، ۹]، آنتی‌اکسیدانی [۱۰]، آرام‌بخشی [۱۱]، ضدالتهابی و تعدیل‌کننده سیستم ایمنی [۱۲] آن نیز گزارش شده است. در پژوهش دالیلان و همکاران، نشان داده شده که لاواند می‌تواند از رشد سلول‌های سرطانی لنفوم هوچکین جلوگیری کند [۱۳].

اثر ضدمیکروبی لاواند نیز به اثبات رسیده است. برای مثال، در مطالعه رولر و همکاران نشان داده شده که اسانس لاواند می‌تواند از رشد باکتری‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) جلوگیری کند [۱۴]. در مطالعه دیگری نشان داده شده که اسانس لاواند می‌تواند از رشد شش گونه باکتریایی در محیط کشت جلوگیری کند [۱۵].

با وجود پتانسیل بالای این گیاهان در جلوگیری از رشد سلول‌های سرطانی و میکروبی در محیط برون‌تنی، استفاده از آن‌ها به صورت بالینی با محدودیت‌های بسیاری رو به رو است. برای مثال، ترکیبات گیاهی فرّار و ناپایدار بوده و در صورتی که در برابر عوامل محیطی مانند اکسیداسیون، تبخیر و نور محافظت نشوند، به راحتی تخریب می شوند [۱۶].

به علاوه، حلالیت پایین در آب و وزن مولکولی بالا سبب شده تا این ترکیبات فراهمی زیستی پایینی داشته و این امر موجب نیاز به دُز مصرفی بالا و تجویز مکرر دارو شده است [۱۷]. سیستم‌های داررسانی نوین با افزایش فراهمی زیستی و پایداری فیزیکی توانسته‌اند استفاده از این ترکیبات را کارامدتر کنند [۱۸].

یکی از این روش‌های نوین، نانوامولسیونه کردن ترکیبات گیاهی است. نانوامولسیون‌ها قطرات کوچکی به قطر بیست تا دویست نانومتر بوده که حفاظت از ترکیبات بیولوژیک و رهاسازی کنترل‌شده آنها را تضمین می‌کند. نانوامولسیون‌ها غیرسمی بوده و پایداری کینتیکی بالایی دارند [۱۹].

محققان نشان داده‌اند که کارایی بعضی از اسانس‌های گیاهی طبیعی حتی در بعضی موارد بهتر از مواد مصنوعی است، اما مشکل عمده آن‌ها فرّاریت بالا و متعاقب آن ناپایداری است. به منظور مقابله با این مشکل یکی از بهترین راه‌حل‌ها استفاده از فرمولاسیون نانوامولسیون است که در واقع با استفاده از فناوری نانو، پایداری و کارایی ترکیب مورد نظر را به نحو چشمگیری افزایش می‌دهد [۱۸]. تحقیقات نشان داده که می‌توان با استفاده از فناوری نانو، مزایای فراوانی را در مواد ضدمیکروبی نظیر کاهش مصرف مواد ضدمیکروبی، افزایش کارایی، سازگاری بالا با محیط‌زیست و بهبود کیفیت ایجاد کرد [۱۹].

با توجه اثرات مطلوب دو گیاه شیرین‌بیان و لاواند و با در نظر گرفتن مزایای نانوامولسیون، در مطالعه‌ای که توسط محققین مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه دانشگاه علوم پزشکی کاشان انجام گرفت، نانوامولسیون حاوی عصاره گیاه شیرین‌بیان و اسانس لاواند ساخته شد، در این پژوهش بر آن شدیم تا اثرات ضدمیکروبی این نانوامولسیون و همچنین اثرات ضدتکثیری آن بر دو رده سلول سرطانی را بررسی کنیم.

## مواد و روش‌ها

ساخت نانوامولسیون حاوی گیاهان لاواند و شیرین‌بیان: اسانس لاواند و عصاره شیرین‌بیان از شرکت داروسازی باریج اسانس خریداری شد. جهت ساخت نانوامولسیون از روش

1. Glycyrrhiza Glabra
2. Lavandula Angustifolia

امولسیون‌سازی خودبه‌خودی۳ استفاده شد [۱۹]. در مطالعه قبلی انجام‌گرفته توسط محققین مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه دانشگاه علوم پزشکی کاشان به منظور رسیدن به بهترین فرمولاسیون جهت تشکیل یک نانو امولسیون پایدار نسبت‌های مختلفی از امولسیفایرها با اسانس و عصاره ترکیب شدند (نتایج منتشر نشده است).

نتایج حاکی از آن بود که بهترین نسبت برای امولسیفایرها نسبت ۱:۲ به ترتیب برای توئین بیست و توئین هشتاد است. همچنین کمک حلّال‌های گلیسرین و پلی‌اتیلن گلایکول با نسبت ۱:۱ استفاده شد.

به منظور تهیه نانوامولسیون، فاز آبی شامل کمک حلّال‌ها و آب و فاز روغنی شامل امولسیفایرها، ۲ درصد اسانس لاواند و ۲ درصد عصاره شیرین‌بیان هرکدام به صورت جداگانه تهیه شده و درون بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

در مرحله بعد، فاز آبی به آرامی به فاز روغنی که در حال همگن شدن بود، اضافه شد. فرایند همگن‌سازی به مدت بیست دقیقه و با سرعت بالا ادامه پیدا کرد تا نانوامولسیون تک فاز و شفاف حاصل شد. جهت مقایسه اثر نانوامولسیون با عصاره شیرین‌بیان و اسانس لاواند از عصاره و اسانس ۲ درصد استفاده شد.

تعیین اثر ضدتکثیری نانوامولسیون علیه سلول‌های سرطانی: جهت تعیین سیتوتوکسیسیته نانوامولسیون از رده‌های سلولی سرطان کبد (HepG2) و سلول سرطانی پوست (SK-MEL3) استفاده شد. رده‌های سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد.

به منظور بررسی سمیت سلولی از روش MTT استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشت دارای ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (هزار میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین (صد واحد بر میلی‌لیتر) کشت داده شدند. محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه و در حضور ۵ درصد $CO_2$ انکوبه شد.

جهت انجام تست MTT در هر خانه از یک پلیت ۹۶تایی تعداد پنج هزار سلول قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، غلظت‌های از نانوامولسیون، حلّال نانوامولسیون، عصاره، اسانس و حلّال اسانس تهیه و به مدت ۲۴ ساعت روی رده‌های سلولی تیمار شد.

پس از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک‌ها به دقت خارج شده و به آنها دویست میکرولیتر رنگ MTT اضافه شد. میکروپلیت به مدت چهار ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد و پس از آن محیط رویی تخلیه شده و به هر چاهک دویست میکرولیتر محلول DMSO اضافه شد.

در مرحله بعد، جذب نمونه‌ها با دستگاه میکروپلیت ریدر (Dena، ایران) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و درصد سلول‌های زنده نسبت به جذب نوری سلول‌های کنترل محاسبه شد.

تعیین اثر ضدمیکروبی: به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی[۴] از روش رقیق‌سازی میکرودایلوشن و با سه بار تکرار استفاده شد. در این روش، اسانس لاواند در دی متیل سولفوکساید ۱۰ درصد تهیه شد.

همچنین نانوامولسیون با غلظت‌های ۰/۶۲۵ mg / ml، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درون چاهک‌هایی با حجم صد میکرولیتر ریخته شد. به همه چاهک‌ها پنج میکرولیتر از کشت باکتری‌های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با غلظت نیم مک فارلند به همراه ۹۵ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث اضافه شد.

از مولر هینتون براث و سوسپانسیون باکتری به تنهایی به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. آخرین رقتی از نانوامولسیون که در آن هیچ‌گونه رشدی مشاهده نشد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری داده‌ها: به منظور آنالیز داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. داده‌ها برای هر آزمون حاصل سه بار تکرار بوده و به صورت میانگین ± انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شدند. تمام آنالیزها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و مقادیر خطای آلفای کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

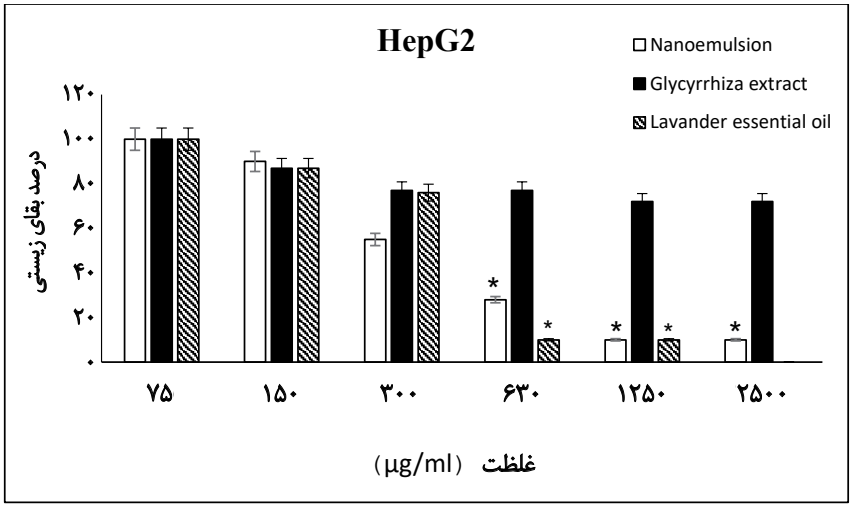
سمیت سلولی غلظت‌های مختلف نانوامولسیون حاوی عصاره شیرین‌بیان و اسانس لاواند بر سلول‌های کبدی رده HepG2 و سلول‌های سرطانی پوست رده SK-MEL-3 با روش MTT بررسی شده و درصد زنده ماندن سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد.

نتایج حاصل از این ارزیابی روی سلول‌های HepG2 نشان داد غلظت‌های ۲۵۰۰، ۱۲۵۰ و ۶۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوامولسیون برای سلول سمیت ایجاد کرده و موجب مرگ بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها شده‌اند (IC50=401µg/ml) (P<۰/۰۵).

عصاره شیرین‌بیان در مقایسه با نانوامولسیون سمیت کمتری داشت، به طوری که تنها ۲۸ درصد سلول‌ها در مواجهه با غلظت ۲۵۰۰ آن دچار مرگ سلولی شده بودند. این در حالی است که اسانس لاواند سمیت بالایی داشته و میزان IC50 آن برابر ۴۵۰ بود (تصویر شماره ۱) (P<۰/۰۵).

3. Spontaneous Emulsification

4. Minimum Inhibitory Concentration




**تصویر ۱.** درصد بقای سلول‌های HEPG2 در برابر غلظت‌های مختلف نانواملسیون

* نشان‌دهنده اختلاف معنادار و بیش از ۵۰درصد (P<۰/۰۵).

نتایج حاصل از تست MTT روی سلول‌های SK-MEL3نشان داد که به استثنای غلظت ۷۵ میکروگرم نانواملسیون، بقیه غلظت‌های آن سبب مرگ بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها شده‌اند (IC50=۸۲) (P<۰/۰۵).

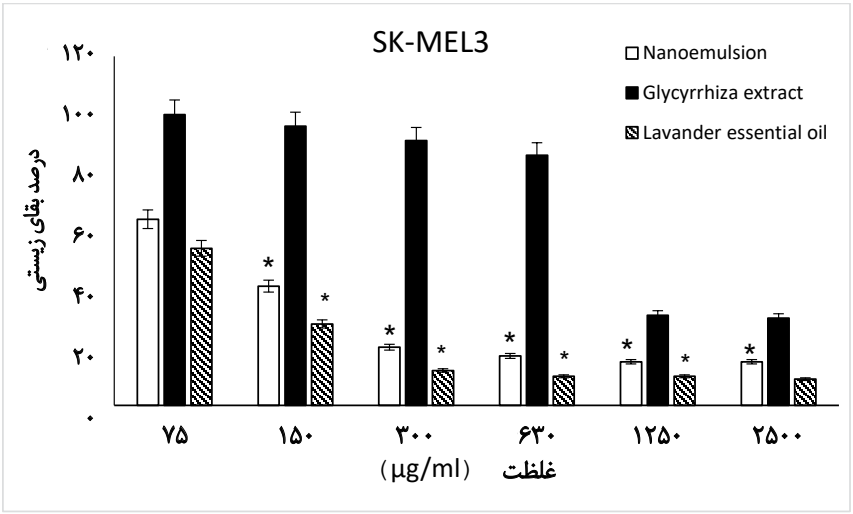
اسانس لاواند نیز سمیتی مشابه نانواملسیون ایجاد کرده بود، این در حالی است که عصاره شیرین‌بیان تنها در غلظت‌های ۱۲۵۰ و ۲۵۰۰ موجب سمیت (مرگ بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها) شده بود (تصویر شماره ۲) (P<۰/۰۵).

### بررسی اثر ضدمیکروبی

در این مطالعه به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی نانواملسیون از روش MIC استفاده شد. در این روش، سویه‌های باکتری مورد نظر تحت غلظت‌های ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نانواملسیون بر رشد تمام سویه‌های باکتری استفاده شده اثر مهاری داشته است. بیشترین اثر مهاری مربوط به استاف اپیدرمیدیس با MIC پنج میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. میزان MIC برای سه سویه دیگر برابر ده میلی‌گرم به دست آمد. عصاره شیرین‌بیان روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلای اثری نداشت، اما موجب مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس شد. اسانس لاواند نیز مانع رشد تمامی سویه‌ها به جز سودوموناس آئروژینوزا شد (جدول شماره ۱).

## بحث

هدف از این مطالعه بررسی اثر ضدمیکروبی نانواملسیون




**تصویر ۲.** درصد بقای سلول‌های SK-MEL3در برابر غلظت‌های مختلف نانواملسیون

* نشان‌دهنده اختلاف معنادار و بیش از ۵۰درصد (P<۰/۰۵).

جدول ۱. میزان CIM نانوامولسیون، اسانس لاواند و عصاره شیرین‌بیان بر چهار سویه باکتری

| باکتری | میزان MIC (mg / ml) | | |
|---|---|---|---|
| | نانوامولوسیون | اسانس | عصاره شیرین‌بیان |
| استافیلوکوکوس اورئوس | ۱۰ | ۵ | – |
| اشریشیا کلای | ۱۰ | ۲/۵ | – |
| سودوموناس آئروژینوزا | ۱۰ | – | ۱/۲۵ |
| استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس | ۵ | ۵ | ۵ |

(–) نشان‌دهنده عدم تأثیر بر رشد باکتری است.

حاوی عصاره شیرین‌بیان و اسانس لاواند و همچنین مطالعه خواص ضدتکثیری آن علیه دو رده سلول سرطانی بود. نتایج به‌دست آمده نشان داد که این نانوامولسیون برای سلول‌های رده HepG2 و SK-MEL-3 سمیت داشته و می‌تواند موجب مرگ سلول‌های سرطانی شود.

مطالعات متعددی در زمینه سمیت سلولی و اثر ضدسرطانی عصاره شیرین‌بیان و اسانس لاواند انجام شده است. به طور مثال، مطالعه خضرایی و همکاران نشان داده که عصاره گیاه شیرین‌بیان بر رده‌های سلولی سرطان‌های معده‌ای و روده‌ای تأثیر معناداری داشته و از طریق القای آپوپتوزیس، موجب از بین رفتن سلول‌های سرطانی شده، درحالی‌که بر سلول‌های نرمال هیچ‌گونه تأثیر معنادار و منفی ندارد [۲۰]. همچنین در مطالعه فو و همکاران، اثر ضدتوموری فلاونوئید استروژنی Licochalcone استخراج‌شده از ریشه گیاه شیرین‌بیان بر سلول‌های سرطانی پروستات (PC3) بررسی شده و نشان داده شده است که غلظت بالای این عصاره برای سلول‌های سرطان پستان سمیت دارد [۲۱].

در پژوهش دیگری بیان شد که غلظت ده میکروگرم شیرین‌بیان روی سلول‌های سرطانی سمیت نداشته، اما غلظت سی میکروگرم آن موجب مرگ سلول‌های سرطان پستان (رده‌های MCF7، MDA-MB-231، T47D، و MDA-MB-361) می‌شود [۲۲]. همچنین ثابت شده که لاواند موجب مرگ سلول‌های سرطانی کبد در محیط برون‌تنی می‌شود [۱۰]. نتایج بررسی مهدی‌نژاد و همکاران نیز نشان داد که عصاره اتانولی گیاه لاواند به صورت وابسته به دُز قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی رده C8305 است [۲۳]. سِوگی و همکاران نشان دادند که اسانس لاواند می‌تواند هر دو مسیر آپوپتوز و نکروز را در سلول‌های سرطانی فعال کرده و از این طریق از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری کند.

به علاوه، در این پژوهش بیان شده است که اثر مهاری اسانس لاواند بر رشد سلول توموری به دلیل وجود ترکیبات فعالی همچون cineole، linalyl acetate، linalool و α-ocimene مؤثر است [۲۴].

در سلول‌های سرطانی میزان بالای ROS می‌تواند بر اثر فعالیت متابولیک بالا، نقص در عملکرد میتوکندریایی، فعالیت پراکسیزوم، افزایش سیگنالینگ گیرنده سلولی، فعالیت انکوژن، افزایش فعالیت اکسیداز، سیکلواکسیژناز، لیپواکسیژناز در سلول‌های ایمنی باشد. بعد از اینکه سلول‌های سرطانی به شکل بدخیم درآمدند، تولید پایدار ROS را انجام می‌دهند که منجر به رشد و پیشرفت تومور می‌شود [۲۱].

بنابراین استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی همانند اسانس لاواند یا عصاره شیرین‌بیان یا نانوامولسیون تهیه‌شده از این ترکیبات، با کاهش میزان ROS می‌تواند در جهت کاهش تولید ROS در جایگاه تومور و بهبود عملکرد عوامل ضدسرطان کمک کند.

با توجه به اثرات و خواص یادشده از گیاه شیرین‌بیان و لاواند، انتظار می‌رفت فرم نانوامولسیونی عصاره گیاه شیرین‌بیان و اسانس لاواند به دلیل فراهم‌آوری پایداری فیزیکی و میکروبی پتاسیل بالایی برای تبدیل شدن به یک ماده که دارای خواص ضدتکثیری علیه سلول‌های سرطانی هستند و این امر در مطالعه حاضر بررسی شده و نتایج حاصل نشان داد که نانوامولسیون یادشده دارای چنین خاصیتی است.

همچنین، در مقایسه اثر سمیت سلولی نانوامولسیون با اسانس لاواند و عصاره شیرین‌بیان نشان داده شد که نانوامولسیون نسبت به عصاره شیرین‌بیان سمیت بسیار بیشتری داشته است. این در حالی است که سمیت سلولی اسانس لاواند شبیه به نانوامولسیون به دست آمد. اگرچه سمیت سلولی نانوامولسیون و اسانس حدوداً به یک اندازه بوده است، اما با توجه به هیدورفوب و فرار بودن اسانس‌ها می‌توان نتیجه گرفت که تبدیل اسانس به نانوامولسیونی پایدار می‌تواند مفید باشد.

در مطالعه ضیایی و همکاران در بررسی تأثیر اسانس و نانوامولسیون لاواند برتریکوموناس واژینالیس، نشان داده شد که اثر مهاری نانوامولسیون یادشده در تمامی غلظت‌ها و ساعات تأثیری مشابه با اسانس این گیاه داشت، اما در مجموع می‌تواند

انتخاب مطلوبی به عنوان مهارکننده رشد بر تریکوموناس واژینالیس باشد [۲۵]. در مطالعه ما نیز اسانس و نانواملسیون نتایج مشابهی را در میزان مهار زیست سلول‌های سرطانی در رده‌های سلولی مورد مطالعه داشتند.

در بخش دوم این پژوهش، اثر ضدمیکروبی نانواملسیون حاوی عصاره شیرین‌بیان و اسانس لاواند بر سویه‌های باکتریایی استانداردداستافیلوکوکوس‌اورئوس،استافیلوکوکوس‌اپیدرمیدیس، اشریشیاکلای، سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد.

نتایج نشان داد این نانواملسیون بیشترین میزان مهارکنندگی را بر رشد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس داشته و اثر مهاری آن روی سایر سویه‌ها یکسان بوده است. اثر ضدباکتریایی اسانس لاواند بر تمام سویه‌ها بیشتر از نانواملسیون بود، اما عصاره شیرین‌بیان تنها بر سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس اثر مهاری داشت. اثر ضدمیکروبی لاواند روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پیوژنز در یک مطالعه بررسی و نشان داده شد که این گیاه خاصیت آنتی‌باکتریال دارد [۲۶].

در مطالعه معصومی و همکاران در بررسی اثرات ضدمیکروبی نانواملسیون اسانس آویشن شیرازی علیه باکتری اشریشاکلی میزان MIC اسانس آویشن شیرازی و نانواملسیون ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد و تفاوتی بین اسانس خالص و نانواملسیون مشاهده نشد [۲۷].

نتایج حاصل از این بررسی با مطالعه حاضر یکسان بود، با این تفاوت که در مطالعه ما میزان MIC نانواملسیون و اسانس با هم تفاوت داشت. وجود برخی تفاوت‌ها در میزان اثرات ضدمیکروبی مشاهده شده در این مطالعه و تحقیقات مشابه می‌تواند به دلیل تفاوت مکان‌های رشد گیاهان [۴] و استفاده از روش‌های مختلف برای استخراج اسانس و عصاره باشد [۲۸، ۲۹].

با وجود این، اثرات ضدمیکروبی سویه‌های مختلف این گیاهان را به وجود ترکیباتی همچون ترپن‌ها و ترپنوئیدها نسبت داده‌اند. برای مثال، اثر ضدباکتریایی لاواند را به وجود مواد فعالی نظیر لینالول، تریپنال، سینئول، کامفور و تیمول مربوط دانسته‌اند.

ثابت شده است این ترکیبات می‌توانند با مختل کردن کار ساختارهای غشای سلولی باعث اختلال در نفوذپذیری سدهای غشایی شده، با به هم‌زدن کنترل شیمیواسمزی سلول باعث مرگ باکتری‌ها شود [۲۸، ۲۹].

تحقیقات در مورد مکانیسم عمل ترکیبات اسانس‌های حاوی ترکیبات فنولی نشان‌دهنده تأثیر این ترکیبات بر غشای سلولی است. ترکیبات فنولی به غشای سیتوپلاسمی حمله کرده و موجب تخریب آنها و افزایش قابلیت نفوذپذیری آن شده و باعث آزاد شدن اجزای اصلی داخل سلول (مثل ریبوز و گلوتامات سدیم) می‌شوند. از سوی دیگر این ترکیبات می‌توانند موجب اختلال عملکرد در انتقال الکترون، فعالیت آنزیم ATPase و جذب مواد مغذی شوند [۲۶، ۲۷].

بنابراین با توجه به این که آزمون ضدمیکروبی انجام‌شده در محیط مایع و امولسیونی صورت گرفته و نتیجه نهایی فعالیت بالای نانواملسیون را نشان می‌دهد، می‌توان این گونه استنتاج نمود که نانواملسیون حاوی عصاره گیاه شیرین بیان و اسانس گیاه لاواند به طور مستقیم غشای باکتری را تخریب کرده و باعث از بین بردن آن شده است که این پدیده نشان‌دهنده مؤثر بودن سیستم ضدمیکروبی سنتز شده است. ذکر این نکته ضروری است که بررسی مکانیسم دقیق عملکرد ضدمیکروبی نانواملسیون سنتزشده نیاز به تحقیقات گسترده‌تری دارد.

## نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانواملسیون حاوی عصاره گیاه شیرین‌بیان و اسانس گیاه لاواند در غلظت‌های مورد مطالعه دارای خواص ضدمیکروبی بوده و با توجه به میزان قابلیت زیستی مطلوب نانواملسیون در رده سلول‌های سرطانی HEPG2،SK-MEL-3 می‌توان از آنها در مطالعات حیوانی آینده در قالب فرمولاسیون‌های دارویی استفاده کرد.

## ملاحظات اخلاقی

### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد اخلاق IR.KAUMS.MEDNT.REC.1396.106 در مورخ ۹۶/۱۱/۹ به تصویب کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان رسید و تمام کدهای اخلاقی مورد تأیید کمیته نظارت بر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی کاشان در طول انجام آزمایشات رعایت شد.

### حامی مالی

نتایج این تحقیق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول در رشته بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی کاشان است.

### مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی و روش‌شناسی اعتبارسنجی تحلیل داده‌ها: محمداسماعیل شهاب‌الدین، محمدحسین اعرابی؛ تحقیق، بررسی، تحلیل و منابع: علی نظری عالم، شایسته‌پور، مجید نجاتی، حمیدرضا گیلاسی و افشین صالحی؛ نگارش پیش‌نویس: زهره کریمی طاهری.

## تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

## تشکر و قدردانی

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

## Reference

[1] Bent S. Herbal medicine in the United States: Review of efficacy, safety, and regulation. J Gen Intern Med. 2008; 23(6):854-9. [DOI:10.1007/s11606-008-0632-y] [PMID] [PMCID]

[2] Hosseinzadeh H, Nassiri-Asl M. Pharmacological effects of Glycyrrhiza spp. and its bioactive constituents: Update and review. Phytother Res. 2015; 29(12):1868-86. [DOI:10.1002/ptr.5487] [PMID]

[3] Nomura T, Fukai T, Akiyama T. Chemistry of phenolic compounds of licorice (Glycyrrhiza species) and their estrogenic and cytotoxic activities. Pure Appl Chem. 2002; 74(7):1199-206. [DOI:10.1351/pac200274071199]

[4] Basar N, Oridupa OA, Ritchie KJ, Nahar L, Osman NMM, Stafford A, et al. Comparative cytotoxicity of Glycyrrhiza glabra roots from different geographical origins against immortal human keratinocyte (HaCaT), lung adenocarcinoma (A549) and liver carcinoma (HepG2) cells. Phytother Res. 2015; 29(6):944-8. [DOI:10.1002/ptr.5329] [PMID]

[5] Nitalikar MM, Munde KC, Dhore BV, Shikalgar SN. Studies of antibacterial activities of Glycyrrhiza glabra root extract. Int J Pharm Tech Res. 2010; 2(1):899-901.

[6] Ghadiri MK, Gorji A. Lavender for medicine: A brief review of clinical effects. Avicenna. 2002; 1:23-7. http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.116.6864&rep=rep1&type=pdf#page=24

[7] Shiina Y, Funabashi N, Lee K, Toyoda T, Sekine T, Honjo S, et al. Relaxation effects of lavender aromatherapy improve coronary flow velocity reserve in healthy men evaluated by transthoracic Doppler echocardiography. Int J Cardiol. 2008; 129(2):193-7. [DOI:10.1016/j.ijcard.2007.06.064] [PMID]

[8] Shahnazi M, Nikjoo R, Yavarikia P, Mohammad-Alizadeh-Charandabi S. Inhaled lavender effect on anxiety and pain caused from intrauterine device insertion. J Caring Sci. 2012; 1(4):255. [doi: 10.5681/jcs.2012.035]

[9] SILVA GL, Luft C, Lunardelli A, Amaral RH, MELO DA, Donadio MV, et al. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. An Acad Bras Cienc. 2015; 87(2 S):1397-408. [DOI:10.1590/0001-3765201520150056] [PMID]

[10] Kozics K, Srancikova A, Sedlackova E, Horvathova E, Melusova M, Melus V, et al. Antioxidant potential of essential oil from Lavandula angustifolia in in vitro and ex vivo cultured liver cells. Neoplasma. 2017; 64(4):485-93. [DOI:10.4149/neo_2017_401] [PMID]

[11] Prusinowska R, Śmigielski KB. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (Lavandula angustifolia L). A review. Herba Pol. 2014; 60(2):56-66. [DOI:10.2478/hepo-2014-0010]

[12] Imre S, Eşianu S, Miklos A, Tiuca I, Dicher I, Tero-Vescan A, et al. Qualitative assay of essential oils of Lavender and Peppermint in commercial products through spectral and chromatographic methods. Farmacia. 2016; 64(6):857-62. https://farmaciajournal.com/wp-content/uploads/2016-06-art-09-Imre_857-862.pdf

[13] Dalilan S, Rezaei-Tavirani M, Nabiuni M, Heidari-Keshel S, Azodi MZ, Zali H. Aqueous extract of Lavender angustifolia inhibits lymphocytes proliferation of Hodgkin's lymphoma patients. Iran J Cancer Prev. 2013; 6(4):201-8. [PMCID]

[14] Roller S, Ernest N, Buckle J. The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and-resistant Staphylococcus aureus (MSSA and MRSA). J Altern Complement Med. 2009; 15(3):275-9. [DOI:10.1089/acm.2008.0268] [PMID]

[15] Hossain S, Heo H, De Silva B, Wimalasena S, Pathirana H, Heo G-J. Antibacterial activity of essential oil from lavender (Lavandula angustifolia) against pet turtle-borne pathogenic bacteria. Lab Anim Res. 2017; 33(3):195-201. [DOI:10.5625/lar.2017.33.3.195] [PMID] [PMCID]

[16] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-a review. Food Chem Toxicol. 2008; 46(2):446-75. [DOI:10.1016/j.fct.2007.09.106] [PMID]

[17] Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. Ind Crops Prod. 2014; 62:250-64. [DOI:10.1016/j.indcrop.2014.05.055]

[18] Thakkar PJ, Madan P, Lin S. Transdermal delivery of diclofenac using water-in-oil microemulsion: Formulation and mechanistic approach of drug skin permeation. Pharm Dev Technol. 2014; 19(3):373-84. [DOI:10.3109/10837450.2013.788658] [PMID]

[19] El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EA, Casabianca H, et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. Int J Pharm. 2015; 483(1-2):220-43. [DOI:10.1016/j.ijpharm.2014.12.069] [PMID]

[20] Khazraei-Moradian S, Ganjalikhani-Hakemi M, Andalib A, Yazdani R, Arasteh J, Kardar GA. The effect of licorice protein fractions on proliferation and apoptosis of gastrointestinal cancer cell lines. Nutr Cancer. 2017; 69(2):330-9. [DOI:10.1080/01635581.2017.1263347] [PMID]

[21] Fu Y, Chen J, Li Y-J, Zheng Y-F, Li P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. Food Chem. 2013; 141(2):1063-71. [DOI:10.1016/j.foodchem.2013.03.089] [PMID]

[22] Vlaisavljević S, Šibul F, Sinka I, Zupko I, Ocsovszki I, Jovanović-Šanta S. Chemical composition, antioxidant and anticancer activity of licorice from Fruska Gora locality. Ind Crops Prod. 2018; 112:217-24. [DOI:10.1016/j.indcrop.2017.11.050]

[23] Mehdinezhad Doghikolayi S, Mohammadi M. [The antioxidant and cytotoxic effects of lavandulla anguostifouliya on the 8305C cell line (Persian)]. New Cell Mol Biotechnol J. 2018; 8(32):91-8. https://ncm-bjpiau.ir/browse.php?a_id=1146&sid=1&slc_lang=en

[24] Gezici S. Promising anticancer activity of lavender (Lavandula angustifolia Mill.) essential oil through induction of both apoptosis and necrosis. Ann Phytomed. 2018; 7(2):38-45. [DOI:10.21276/ap.2018.7.2.5]

[25] Ziaei Hezarjaribi H, Nadeali N, Saeedi M, Soosaraei M, Jorjani ON, Momeni Z, et al. [The effect of lavender essential oil and nanoemulsion on Trichomonas vaginalis in vitro (Persian)]. Feyz. 2017; 21(4):326-34. http://feyz.kaums.ac.ir/article-1-3154-en.html

[26] Giovannini D, Gismondi A, Basso A, Canuti L, Braglia R, Canini A, et al. Lavandula angustifolia mll. Essential oil exerts antibacterial and anti-inflammatory effect in macrophage mediated immune response to staphylococcus aureus. Immunol Invest. 2016; 45(1):11-28. [DOI:10.3109/08820139.2015.1085392] [PMID]

[27] Masoomi VO, Tajik H, Moradi M, Forough M, Shahabi N. [Antimicrobial effects of Zataria multiflora boiss. Essential oil nanoemulsion against Escherichia coli O157: H7 (Persian)]. Stud Med Sci. 2016; 27(7):608-17. http://umj.umsu.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-2520-1&sid=1&slc_lang=en

[28] Sabbioni C, Ferranti A, Bugamelli F, Forti GC, Raggi MA. Simultaneous HPLC analysis, with isocratic elution, of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in liquorice roots and confectionery products. Phytochem Anal. 2006; 17(1):25-31. [DOI:10.1002/pca.877] [PMID] [PMCID]

[29] Bradley PR. British herbal compendium: A handbook of scientific information on widely used plant drugs. United Kingdom: British Herbal Medicine Association; 1992. https://books.google.com/books/about/British_Herbal_Compendium.html?id=lrUFBAAACAAJ