جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱٤، شماره ۱: از ۳۷-٤۷
بهار ۱۳۹۰

فعالیت ضد میکروبی، رادیکال‌زدایی نیتریک اکساید و سمیت سلولی اسانس آویشن دنایی

مهدی داداش‌پور[۱]، ایرج رسولی[۲*]، رحیم سروری‌زنجانی[۳]، فاطمه سفیدکن[٤]، مسعود تقی‌زاده[٥]، شکیبا درویش‌علیپور آستانه[٦]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران ایران
۳- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...، تهران، ایران
۴- استاد، گروه شیمی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران، ایران
۵- استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۶- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۹/۰۹/۲۰ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۱/۲۶

چکیده

هدف: با وجود اثر سمی برخی از روغن‌های اسانسی، استفاده آن‌ها تحت کنترل نیست. با توجه به گسترش مصرف فرآورده‌های گیاهی، ابعاد مختلف زیست‌شناختی اسانس آویشن دنایی برای اولین بار گزارش می‌شود.

مواد و روش‌ها: فعالیت ضد باکتریایی با دو روش انتشار و رقت، رادیکال‌زدایی نیتریک اکساید با روش مارکوکسی و همکاران و سمیت سلولی با روش احیا دی متیل تیازولیل دی فنیل تترازولیوم بروماید به‌وسیله اسانس‌های آویشن دنایی و تجاری و ترکیب شیمیایی اصلی آن‌ها، تیمول، بررسی و مقایسه شد.

نتایج: نمای حساسیتی میکروارگانیسم‌ها براساس حساس‌ترین به مقاوم‌ترین سودوموناس آئروژینوزا< استافیلوکوکوس اورئوس< اشریشیا کولی< کاندیدا آلبیکنس و کم‌ترین غلظت مهار کنندگی و کشندگی ۰/۰٤-۱۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بود. رادیکال‌زدایی نیتریک اکساید وابسته به دوز با IC_{50} برابر ۵، ۷۵ و ۸٦۳ میکروگرم و فنل کل معادل ٦٤٤/۰۷±٦/۷۹، ۱٦/۹٤±۲/۵۵ و ۱۰/۳۳±۲/۳۱ میکروگرم گالیک اسید در هر میلی‌گرم نمونه به‌ترتیب در اسانس آویشن دنایی، اسانس تجاری و تیمول تعیین شد. سمیت سلولی آن‌ها بر سلول‌های طبیعی انسان به‌صورت ۵۰ درصد غلظت ممانعت (IC_{50}) به‌ترتیب ۱٤۵۵، ۱۲/۱۰ و ۲۸٦۷ میکروگرم و در خصوص سلول‌های سرطانی به‌ترتیب ٤/۹۵، ۳/٦۱ و ۱۷۳۰ میکروگرم بود.

نتیجه‌گیری: آویشن با خاصیت خوب ضد میکروبی، می‌تواند در پیشگیری از تشکیل محصولات سمّی نیتروژن واکنش‌گر نیز مؤثر بوده و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان خوب مستقیماً NO و O_2^- را بزداید. تأثیر کشندگی غلظت کم اسانس بر سلول‌های سرطانی بدون تأثیر منفی بر سلول‌های طبیعی نویدبخش امکان استفاده در مبارزه با سلول‌های سرطانی است.

کلیدواژگان: آویشن، ضد میکروب، آنتی‌اکسیدان، نیتریک اکساید، روغن‌های اسانسی

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه شاهد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، کدپستی: ۳۳۱۹۱۱۸٦۵۱
Email: rasooli@shahed.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۱- مقدمه

گیاهان منابع طبیعی خوبی از ترکیب‌ها، با فعالیت زیستی هستند و می‌توانند در فرمولاسیون‌های غذایی به‌عنوان افزودنی و اجزای مؤثر در سلامتی کاربرد داشته باشند [۱]. بسیاری از ترکیب‌های طبیعی به‌دست آمده از گیاهان دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی است. ترکیب‌های شیمیایی در خواص زیستی اسانس‌ها تأثیر دارد. در بین انواع مختلف مواد اولیه، عوامل طبیعی بالقوه‌ای مانند روغن‌های اسانسی استخراج شده از گیاهان معطر و دارویی دارای خواص ضد میکروبی، ضد قارچی، آنتی‌اکسیدانی است. با توجه به این‌که در سال‌های اخیر فشار قابل توجهی از طرف مصرف کننده‌ها برای کاهش یا محدود کردن استفاده از افزودنی‌های مصنوعی در غذاهایشان، اعمال می‌شود، یک راه جدید برای جلوگیری از تکثیر میکروارگانیسم‌ها و گسترش عوامل بیماری‌زا، استفاده از این ترکیب‌ها به‌عنوان نگهدارنده در مواد غذایی است. روغن‌های اسانسی دارای تأثیرات مختلف دارویی مانند برطرف کنندگی انقباض عضلات، ضد نفخ، محافظت از کبد، ضد ویروسی و ضد سرطانی نیز است [۲-٤]. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیب‌هایی است که محصولات فعال شیمیایی مانند رادیکال‌های آزاد آسیب‌رسان به بدن که در نتیجه متابولیسم تولید می‌شود را خنثی می‌کند. فنل‌ها و پلی فنل‌های گیاهان به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانیشان نقش مهمی در جلوگیری از شرایط بیماری‌زایی مختلف از قبیل سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی و بیماری‌های تخریب اعصاب مرتبط با استرس‌های اکسید کنندگی، ایفا می‌کند. این ترکیب‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد ویروسی، آنتی‌بیوتیکی، ضد توموری نیز هست [۵]. اکسیژن و نیتروژن واکنش دهنده رادیکالی (Reactive Oxygen Species: ROS/ Reactive Nitrogen Species: RNS) به‌طور مداوم در بدن انسان تولید می‌شوند و توسط آنزیم‌های داخلی مانند سوپر اکسید دسموتاز (Superoxide Dismutase)، گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione Peroxidase) و کاتالاز کنترل می‌شود. زمانی که تولید این رادیکال‌ها بیش از حد باشد، سوبستراها در معرض اکسیداسیون قرار می‌گیرد، مکانیسم‌های دفاعی بدن ناتوان می‌شود و تخریب مولکول‌ها زیستی (DNA، لیپید، پروتئین) اتفاق می‌افتد [٦]. برخی آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند از خطر اکسید کنندگی توسط ROS و RNS، بروز بیماری‌های خاصی مثل سرطان و روند پیری جلوگیری کند و می‌تواند از طریق فرایند اکسیداسیون، واکنش با رادیکال‌های آزاد، کلاته کردن (Chelating) فلزات و همچنین واکنش به‌عنوان رادیکال زداینده اکسیژن، مداخله کند [٦]. تحقیقات اخیر کشف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از گیاهان را نشان می‌دهد. استفاده از گونه‌ها و گیاهان به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها در فرآیندهای غذایی، امیدی برای استفاده از آن‌ها به جای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی است. گزارش‌ها نشان می‌دهد که با توجه به فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه، مصرف آن‌ها به‌عنوان افزودنی‌های طبیعی افزایش یافته است [۷]. در زمینه سمّیت مزمن این ترکیب‌ها نظیر ناقص‌الخلقه‌سازی، جهش‌زایی و سرطان‌زایی بالقوه نیز مقالات کمی وجود دارد [۸]. جنس آویشن (*Thymus*) حدوداً دارای ٤۰۰ گونه از گیاهان علفی مقاوم، چند ساله، معطر همیشه سبز یا نیمه‌سبز است که به‌طور عمده بومی نواحی معتدل شمالی نظیر اروپای جنوبی وآسیا هستند. نام این جنس برگرفته از یک واژه یونان باستان است؛ این گیاهان معطر به‌طور معمول با نام تایم (*Thyme*) شناخته می‌شوند [۹]. شیمی، فرآوری وکاربردهای اعضای جنس آویشن قبلاً بررسی شده است [۱]. با وجود این‌که گزارش‌ها در مورد ترکیب‌های روغن‌های اسانسی و استفاده از گونه‌های مختلف آویشن کاملاً متداول است، ولی هنوز تحقیقات در مورد فعالیت‌های زیست‌شناختی آن‌ها نادر است [۱۰] و در دهه‌های اخیر این گیاهان هدف مطالعات در زمینه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و عوامل ضد میکروبی شده‌اند [۱۱]. نتایج مطالعات بسیاری که روی ترکیب روغن‌های اسانسی قسمت‌های هوایی گونه‌های مختلف آویشن انجام شده است نشان می‌دهد که ترکیب‌های فرّار اصلی به‌دست آمده عبارتند از تیمول (Thymol)، کارواکرول (Carvacrol)، پارا- سیمین (ρ-Cymene)، گاما- ترپنین (γ-Terpinen)، β- کاریوفیلن (β-Caryophyllene) و

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

غیره [۱۲-۱٤]. با وجود این‌که برخی از روغن‌های اسانسی دارای اندکی اثر سمّی حاد است، استفاده از روغن‌های اسانسی در خیلی از کشورها تحت کنترل نیست. با توجه به گسترش مصرف فرآورده‌های گیاهان دارویی در کشورمان لازم است که جوانب مختلف این محصولات به دلیل کاربردهای مفید و احیاناً ضررهای آن‌ها در سلامتی انسان مورد توجه قرار گیرد. به دلیل بومی بودن گونه آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) لازم است ابعاد مختلف زیست‌شناختی آن بررسی شود؛ بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اسانس آویشن دنایی و مقایسه با اسانس آویشن تجاری (Commercial *Thymus vulgaris*) و ترکیب اصلی آن، تیمول برای اولین بار انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- اسانس آویشن دنایی

آویشن دنایی در مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع شناسایی و اسانس‌گیری شد. اسانس تجاری آویشن از منابع تولیدی داخل کشور که در داروخانه‌ها به فروش می‌رسد تهیه شد. تیمول تولیدی شرکت مرک (Merck) آلمان مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- سویه‌های میکروبی

میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه به شرح زیر بودند:

اشریشیا کولی (*Escherichia coli*) (ATCC25922)، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) (ATCC 25923)، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) (ATCC8830)، کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) (ATCC 5027)

۲-۳- بررسی آثار ضد میکروبی

آثار ضد میکروبی با روش یادگاری‌نیا و همکاران (۲۰۰٦) انجام شد [۱۵]. برای مطالعه آثار 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 ۳۰ میکرولیتر اسانس معادل یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر با رقت‌های ۱/۸، ۱/٤، ۱/۲ و ۱ در ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی در محیط کشت نوترینت براث (Nutrient Broth) ریخته و پس از هم زدن در انکوباتور به‌مدت ۱۸-۲٤ ساعت قرار داده شد وسپس به‌وسیله اسپکتروفتومتر جمعیت میکروبی تعیین و در نتیجه حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimal Inhibitory concentration: MIC) مشخص شد. سپس از هر کدام از لوله‌ها که رشد جمعیت نشان نداده بود، ۰/۱ میلی‌لیتر روی پلیت حاوی نوترینت آگار (Nutrient Agar) کشت داده شد و حداقل غلظت کشندگی (Minimal Bactericidal concentration: MBC) ماده ضد میکروبی تعیین شد. برای مطالعه فعالیت (سینتیک) میکروب‌کشی اسانس پس از تعیین *MBC* از سوسپانسیون‌های میکروبی محتوی 10^6 سلول میکروبی تهیه و مقدار ۵۰ میکرولیتر اسانس در ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون ریخته شد و در فواصل زمانی صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ٤۵، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه، مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر لوله برداشته شد و پس از رقیق‌سازی بر سطح محیط نوترینت آگار به‌طور یکنواخت گسترده و به‌مدت ۲٤ ساعت داخل انکوباتور گذاشته شد. سپس تعداد کلونی‌ها با کلونی شمار شمارش و با ضرب عکس رقت در تعداد کلونی‌ها تعداد باکتری‌های زنده در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون تعیین شد. با استفاده از فعالیت (سینتیک) مرگ میکروبی ارزش D (Decimal Reduction Value) براساس زمان لازم برای کاهش ۹۰ درصد جمعیت میکروبی در نمونه محاسبه شد.

حلال‌های مختلف که در اسانس‌گیری یا رقیق‌سازی اسانس مورد استفاده قرار می‌گیرد قبلاً در 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.

۲-٤- تعیین محتوای کل فنل (Total Phenolic Content: TPC)

با استفاده از روش کاهکونن (Kahkonen) و همکاران [١٦] فنل اسانس‌ها به شرح زیر سنجیده شد:

۳۰۰ میکرولیتر از نمونه در لوله آزمایش ریخته شده و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ده برابر رقیق فولین سیوکلتیوس لیتر (Folin–Ciocalteau's reagent) (رقت ۱۰x) و ۱/۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد ریخته شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و جذب در ٧٦٥ نانومتر سنجیده شد. فنل کل براساس معادل میلی‌گرم گالیک اسید در هر ۱۰۰ گرم نمونه بیان شد:

r^2= ۰/۹۹۹۸ ؛y= ۰/۰۱۱۱x–۰/۰۱٤۸

(r= ضریب همبستگی)

۲-۵- فعالیت رادیکال‌زدایی نیتریک اکساید (Nitric Oxide Radical Scavenging)

قدرت رادیکال‌زدایی نیتریک اکساید اسانس‌ها با روش مارکوکسی (Marcocci) و همکارانش (١٩٩٤) انجام شد [١٧]. نیم میلی‌لیتر رقت هر اسانس یا کنترل مثبت حل شده در KH_2PO_4–KOH (۵۰ میلی‌مول در هر لیتر، pH=۷/٤) با ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم نیتروپروسید (Sodium Nitroprusside) (۱۰ میلی‌مول در هر لیتر) مخلوط می‌شود. این مخلوط به‌مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط نور معمولی اتاق و سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در محیط تاریک نگهداری شد. پس از آن یک میلی‌لیتر محلول واکنشگر گریس (Griess reagent) با ترکیب زیر به آن اضافه شد:

یک گرم در لیتر ان-(۱-نفتیل) اتیلین دی آمین و ۱۰ گرم در لیتر سولفانامید محلول در ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر اسید فسفریک آبی [Griess reagent (1 g/l *N*-(1-naphtyl) ethylene-diamine and 10 g/l sulphanilamide dissolved in 20 [ml/l aqueous H_3PO_4)

پس از ٤٠ دقیقه جذب در ٥٤٦ نانومتر اندازه‌گیری شد و درصد ممانعت با فرمول زیر محاسبه شد:

درصد ممانعت =[($A_{کنترل}$–$A_{نمونه}$)/$A_{کنترل}$]×۱۰۰

۲-٦- تعیین سمّیت سلولی اسانس

دو رده سلول سرطانی و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با روش MTT -3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) مطالعه شد [١٨]. در این روش احیای MTT به‌وسیله دی هیدروژناز میتوکندری‌ها به محصول آبی فرمازان (Formazan) انجام می‌شود که نشان دهنده عملکرد طبیعی میتوکندری و حیات سلول است [١٩]. پس از برداشت از فلاسک‌های کشت، سلول‌ها به تعداد $۱×۱۰^{٤}$ تا $۵×۱۰^{٥}$ (براساس برنامه کشت هر سلول سرطانی) در پلیت‌های ٩٦ چاهکی محتوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت در هر چاهک انکوبه شدند. سلول‌ها برای چسبیدن ٢٤ ساعت زمان بردند و پس از آن با رقت‌های مختلف اسانس به‌مدت ٤٨ ساعت مواجه شدند. ۲۰ میکرولیتر از ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT در سالین بافر فسفاته (Phosphate Buffered Saline: PBS) به هر چاهک اضافه شد و به‌مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس محیط تخلیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جذب شاهد (مواجهه شده با ۰/۱ درصد DMSO) و نمونه‌های مواجه شده با اسانس در دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA Reader) با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده و ثبت شد. منحنی بقا (سلول‌های زنده) ترسیم شد و سمیت سلولی (Cytotoxicity) عبارت بود از غلظتی از ماده مورد آزمایش که مانع رشد ۵۰ درصد سلول‌ها (IC_{50}) شد. همه آزمون‌ها به‌صورت سه بار تکرار انجام شد.

جدول ۱ تأثیر ضد میکروبی اسانس‌ها و تیمول براساس ایجاد هاله عدم رشد

	میانگین هاله ممانعت رشد* و غلظت اسانس**	۱۰	۵	۲/۵	MIC-MBC**	ارزش D در هر دقیقه
اشریشیا کولی	آویشن دنایی	٤٣/٦٧±١/١٥	٣١ ± ٢	١٥ ± ١	٠/٠٨–٠/٠٤	٣/٥٧
	آویشن تجاری	١٩/٦٧±٢/٥٢	١٥±١	١٠/٦٧±٠/٥٨	٥–٢/٥	٦/٤٣
	تیمول	١٥/٦٧±١/١٥	١١ ± ١	٧/٣٣±٠/٥٨	١٠–٥	١٧/١٤
استافیلوکوکوس اورئوس	آویشن دنایی	٢٤±١/٧	١١± ٠	٩/٣٣±٠/٥	٠/١٦–٠/٠٨	٦/٤٣
	آویشن تجاری	١٥/٦٧±١/٥	١٤/٦٧±٠/٥	٩/٦٧±٠/٥	١٠–٥	١٧/١٤
	تیمول	١٧/٦٧±٠/٥٧	١٣/٦٧±١/٥	١١ ± ١	٥–٢/٥	١٧/٦٧
سودوموناس آئروژینوزا	آویشن دنایی	١٦/٦٧±١/٥	١١/٦٧±٠/٥٨	١٠/٦٧±٠/٥٨	٥–٢/٥	٦/٤٣
	آویشن تجاری	١١±١	٩±١	٧/٦٧±٠/٥	٢٠–١٠	١٧/١٤
	تیمول	١٣±١	٨/٣٣±٠/٥	٠	١٠–٥	١٧/٧
کاندیدا آلبیکنس	آویشن دنایی	٦٣±٢/٦	٥٥/٣±١/٥	٤٨/٣±٢	٠/٠٤–٠/٠٢	٣/٥٧
	آویشن تجاری	٢٠/٧±٠/٥	١٦±٠/٥	١٣±٠/٥	٥–٢/٥	٦/٤٣
	تیمول	٢٠±١	١٦±١	١٣±١	٥–٢/٥	١٧/١٤

* بر حسب میلی‌متر

** بر حسب میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر

جدول ۲ قدرت رادیکال‌زدایی نیتریک اکساید اسانس‌ها و تیمول

اسانس آویشن دنایی		اسانس آویشن تجاری		تیمول	
مقدار اسانس (میکروگرم)	درصد رادیکال‌زدایی	مقدار اسانس (میکروگرم)	درصد رادیکال‌زدایی	مقدار اسانس (میکروگرم)	درصد رادیکال‌زدایی
٠/٥	١/٥±٠/١٣	٧/٨	٢٧/٤±٠/٣	٦٢/٥	١٥/٣±٠/٤
١	٨/٢٥±٠/٦	١٥/٦٢٥	٤٤/٧±٠/٤	١٢٥	١٨/٠٦±٠/٣١
٢	١٤/٠٣±٠/٧١	٣١/٢٥	٤٦/٤±٠/٩	٢٥٠	٢٣/٧±٠/٠٥
٤	٤٠/١±٠/٥	٦٢/٥	٤٩/٣±٠/٧	٥٠٠	٣١/٤±٠/٦
٨	٧٠/٦٤±١/٤	١٢٥	٥٤/٢±٠/٨	١٠٠٠	٥٧/١±٠/٨٤
IC_{50} (میکروگرم)	٥	**IC_{50} (میکروگرم)**	٧٥	**IC_{50} (میکروگرم)**	٨٦٣
محتوای فنلی (µg/mg GAE*)	٦٤٤/٠٧±٦/٧٩	**محتوای فنلی (µg/mg GAE*)**	١٦/٩٤±٢/٥٥	**محتوای فنلی (µg/mg GAE*)**	١٠/٣٣±٢/٣١

*: میکروگرم در هر میلی‌گرم معادل گالیک اسید

۳- نتایج

نمای حساسیتی میکروارگانیسم‌ها در برابر اسانس آویشن دنایی، آویشن تجاری و تیمول براساس حساس‌ترین به مقاوم‌ترین سودوموناس آئروژینوزا< استافیلوکوکوس اورئوس< اشریشیا کولی< کاندیدا آلبیکنس بود. تیمول اثر ضد میکروبی بیشتری بر استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با اشریشیا کولی داشت. اسانس‌ها خاصیت کشندگی و مهار کنندگی میکروبی خوبی نشان داد (جدول ۱). MIC و MBC اسانس‌ها در طیف ٠/٠٤ تا ١٠ میکروگرم در هر میلی‌لیتر قرار داشت. در رقت‌های تعیین‌شده در آزمایش MBC در برابر سوسپانسیون میکروبی قرار داده شد تا جنبش مرگ میکروبی و ارزش D به‌دست آید (جدول ۱). توانایی رادیکال‌زدایی نیتریک اکساید رقت‌های مختلف اسانس‌ها نشان داد که رادیکال‌زدایی نیتریک اکساید وابسته به دوز بوده و مقدار اسانس لازم برای ٥٠ درصد رادیکال‌زدایی نیتریک اکساید اسانس

آویشن دنایی، اسانس تجاری و تیمول به‌ترتیب ۵، ۷۵ و ۸۶۳ میکروگرم بود (جدول ۲). فنل کل اسانس‌های آویشن دنایی، اسانس تجاری و تیمول به‌ترتیب معادل ۶/۷۹±۶۴۴/۰۷، ۲/۵۵±۱۶/۹۴ و ۲/۳۱±۱۰/۳۳ میکروگرم گالیک اسید در هر میلی‌گرم نمونه تعیین شد (جدول ۲). سمّیت سلولی رقت‌های مختلف اسانس آویشن دنایی، اسانس تجاری و تیمول بر سلول‌های طبیعی انسان به‌صورت ۵۰ درصد غلظت ممانعت (IC_{50}) به‌ترتیب ۱۴۵۵، ۱۲/۱۰ و ۲۸۶۷ میکروگرم (جدول ۳) و این سمّیت در خصوص سلول‌های سرطانی به‌ترتیب ۴/۹۵، ۳/۶۱ و ۱۷۳۰ میکروگرم (جدول ۴) بود.

جدول ۳ سمّیت سلولی رقت‌های مختلف اسانس‌های آویشن و تیمول بر سلول‌های طبیعی انسان

آویشن دنایی (میکروگرم در هر میلی‌لیتر)	درصد مرگ لنفوسیت‌ها	آویشن تجاری (میکروگرم در هر میلی‌لیتر)	درصد مرگ لنفوسیت‌ها	تیمول (میکروگرم در هر میلی‌لیتر)	درصد مرگ لنفوسیت‌ها
شاهد	۰	شاهد	۰	شاهد	۰
۵۰	۱۶/۱۵	۰/۲۵	۸/۲۵	۲۵	۲۸/۴۵
۱۰۰	۲۲/۳۵	۰/۵	۱۵/۲۱	۵۰	۳۳/۵۱
۲۰۰	۳۰/۵۹	۱	۳۰/۵۵	۱۰۰	۳۸/۳۶
۴۰۰	۳۴/۷۶	۲	۳۵/۴۲	۲۰۰	۳۹/۴۴
۸۰۰	۴۱/۱۸	۴	۴۱/۱۱	۲۰۰۰	۴۷/۶۳
۱۶۰۰	۵۲/۶۲	۱۰	۴۶/۸۱	۴۰۰۰	۵۴/۳۱
IC_{50}	۱۴۵۵ میکروگرم	IC_{50}	۱۲/۱۰ میکروگرم	IC_{50}	۲۸۶۷ میکروگرم

جدول ۴ سمّیت سلولی رقت‌های مختلف اسانس‌های آویشن و تیمول بر سلول‌های سرطانی انسان

آویشن دنایی (میکروگرم در هر میلی‌لیتر)	درصد مرگ لنفوسیت‌ها	آویشن تجاری (میکروگرم در هر میلی‌لیتر)	درصد مرگ لنفوسیت‌ها	تیمول (میکروگرم در هر میلی‌لیتر)	درصد مرگ لنفوسیت‌ها
شاهد	۰	شاهد	۰	شاهد	۰
۰/۵	۲۲/۰۳	۰/۵	۳۲/۷۴	۵۰	۴۰/۰۳
۱	۲۸/۶۱	۱	۳۷/۷۲	۱۰۰	۴۲/۶۷
۲	۳۴/۶۸	۲	۴۳/۴۶	۲۰۰	۴۵/۶۳
۴	۴۹/۱۱	۴	۵۱/۱۸	۲۰۰۰	۵۱/۵۷
۱۰	۷۵/۹۵	۲۰	۶۷	۴۰۰۰	۶۳/۱۰
IC_{50}	۴/۹۵ میکروگرم	IC_{50}	۳/۶۱ میکروگرم	IC_{50}	۱۷۳۰ میکروگرم

۴- بحث

در این مطالعه فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌های آویشن دنایی، آویشن تجاری و ترکیب شیمیایی اصلی آویشن، تیمول توسط روش‌های انتشار در آگار و رقت‌های مایع ارزیابی شد و نتایج نشان داد که اسانس‌ها دارای پتانسیل‌های ضد میکروبی بالایی است. فعالیت ضد میکروبی روغن اسانسی بعضی از گونه‌های آویشن علیه خیلی از باکتری‌های مولد فساد و مسمومیت‌های غذایی گزارش شده است. فعالیت ضد میکروبی وآنتی‌اکسیدانی اعضای جنس آویشن به‌ویژه یکی از مهم‌ترین آن‌ها تیموس ولگاریس (*Thymus vulgaris*) به‌طور گسترده گزارش شده است [۲۰]. خاصیت ضد میکروبی روغن‌های اسانسی و عصاره متانولی به‌دست آمده از قسمت‌های هوایی تیموس ولگاریس و بذر پینپینلا آنیسوم (*Pimpinella anisum*) به‌صورت مجزا و ترکیبی علیه ۹ باکتری بیماری‌زا گرم مثبت و

گرم منفی: باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*)، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کولی، پروتئوس ولگاریس (*Proteus vulgaris*)، پروتئوس میرابیلیس (*Proteus mirabilis*)، سالمونلا تیفی (*Salmonella typhi*)، سالمونلا تیفی‌موریوم (*Salmonella typhimurium*)، کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) و سودوموناس آئروژینوزا، ارزیابی شده است. این مواد فعالیت ضد میکروبی قابل قبولی علیه بیماری‌زاهای مورد استفاده در روش رقت لوله‌ای دارد. بیشترین فعالیت روغن‌های اسانسی و عصاره متانولی تیموس ولگاریس (MIC ۱۵/٦) بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و پروتئوس ولگاریس مشاهده شده است. ترکیب روغن‌های اسانسی و عصاره متانولی فعالیت فزاینده‌ای را علیه بیماری‌زاهای مورد استفاده به‌ویژه سودوموناس آئروژینوزا نشان داده است [۲۱]. نتایج مطالعه حاضر ضمن تأیید گزارش فوق، در برابر استافیلوکوکوس اورئوس با MIC ۵ میلی‌گرم بر اسانس تیموس ولگاریس برتری دارد. بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها و ترکیب‌های مهم به‌دست آمده از مراحل رویشی، گل‌دهی، جوانه‌زنی گل، دانه‌دهی تیموس کارامانیکوس (*Thymus caramanicus*) بر علیه هفت باکتری گرم مثبت و گرم منفی به‌وسیلهٔ روش انتشار در آگار و تعیین MIC نشان داده است که ناحیهٔ ممانعت و میزان MIC برای سویه‌های باکتریایی که به روغن اسانسی آویشن حساس بودند به‌ترتیب ۱۵-۳٦ میلی‌متر و ۰/۵-۱۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر است. روغن‌های اسانسی به‌دست آمده فعالیت ضد باکتریایی خوبی علیه تمام باکتری‌های ذکر شده داشتند و باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا به‌ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌ها بودند [۲۲]. در این مطالعه نیز سودوموناس آئروژینوزا مقاوم‌ترین میکروارگانیسم بوده و ارزش D آن در برابر اسانس آویشن دنایی، آویشن تجاری و تیمول به‌ترتیب ٦/٤۳، ۱۷/۱٤ و ۱۷/۷ دقیقه بود.

فعالیت‌های ضد میکروبی اسانس‌های به‌دست آمده از سه گونه تیموس پالسنس (*Thymus pallescens*)، تیموس درآتنسیس (*Thymus dréatensis*) و تیموس آلجرینسیس (*Thymus algeriensis*) نشانگر اثر مثبت اسانس‌ها علیه میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش، به‌ویژه کاندیدا آلبیکنس بوده است [۲۳]. نتایج مطالعه حاضر تأیید کننده این گزارش بوده و نشان می‌دهد که کاندیدا آلبیکنس حساس‌ترین میکروارگانیسم به تأثیر اسانس‌های آویشن دنایی و تجاری به‌ترتیب با MBC ۰/۰٤ و ۵ میلی‌گرم و ارزش D برابر ۳/۵۷ و ٦/٤۳ دقیقه است. با توجه به خاصیت ضد میکروبی روغن‌های اسانسی، به دلیل فنل‌های موجود در اسانس [۲٤]، تیمول به‌عنوان مهم‌ترین فنل موجود در اسانس‌های گیاهی، روغن‌های اسانسی منابع ارزان ضد باکتریایی بوده و قابلیت استفاده در سیستم‌های بیماری‌زا را دارد [۲۲].

رادیکال‌زدایی نیتریک اکساید اسانس‌ها نشان داد که اسانس آویشن دنایی با ۳۸ برابر فنل بیشتر نسبت به اسانس آویشن تجاری دارای IC_{50} ۵ و ۷۵ میکروگرم اسانس به‌ترتیب در آویشن دنایی و آویشن تجاری است. تحقیقات اخیر اکنون به دنبال یافتن آنتی‌اکسیدان‌هایی با منشأ گیاهی است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی فنل‌ها بیشتر به دلیل خواص اکسیداسیون و احیا آن‌هاست که به آن‌ها امکان عملکرد به‌عنوان مواد احیا کننده و اهدا کننده هیدروژن را داده و نیز آن‌ها پتانسیل همبند (کلاته) کردن فلزات را دارند [۲۵]. فنل‌ها و فلاونوئیدهای گیاهی ممانعت پراکسیداسیون لیپید را با فرونشانی رادیکال‌های پروکسی و احیا یا همبند (کلاته) کردن آهن در آنزیم لیپواکسیژناز و در نهایت ممانعت از شروع واکنش پراکسیداسیون لیپید، انجام می‌دهند [۲٦]. تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند مربوط به توانایی زدودن رادیکال‌های پروکسی، رادیکال‌های آزاد و رادیکال‌های هیدروکسی باشد [۲۷].

یک بررسی نشان داده است فعالیت آنتی‌اکسیدانی اوگنول (Eugenol)، تیمول، کارواکرول و٤-آلیل فنل (4-allylphenol) موجود در روغن‌های اسانسی برگ‌های تیموس ولگاریس نسبت به سایر ترکیب‌های آزمایش شده قوی‌تر است؛ به‌طوری که همهٔ آن‌ها در مقدار ۵ میکروگرم به‌مدت ۳۰ روز تقریبا ۱۰۰ درصد از اکسیداسیون هگزانال (Hexanol Oxidation) جلوگیری کردند. به این ترتیب فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها قابل

مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های مشهور مانند آلفا- توکوفرول (α-Tocopherol) و بوتی‌لیتد هیدروکسی تولوئن (Butylated hydroxytoluene: BHT) است [۲۸]. بررسی فعالیت احتمالی آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های به‌دست آمده از گونه‌های تیموس پالسنس، تیموس درآتنسیس و تیموس آلجرینسیس نشانگر فعالیت قوی زدودن رادیکال هیدروکسیل توسط دو شیموتیپ جدید از تیموس آلجرینسیس (IC_{50}= ۲/۲-۳/۳ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) بوده است؛ اما در مورد رادیکال‌های دیگر، فعالیت رادیکال‌زدایی ضعیف یا صفر و قدرت احیا کنندگی نیز ضعیف بوده است. با وجود تشابه شیمیایی اسانس‌های گونه‌های آویشن، گاهی تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای در فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده می‌شود [۲۳]. در این مطالعه اسانس‌های آویشن از تیمول قوی‌تر عمل کرد که می‌تواند بیانگر قدرت هم‌افزایی ترکیب‌های شیمیایی اسانس‌ها باشد. در حالت کلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و رادیکال‌زدایی روغن‌های اسانسی مربوط به حضور ترکیب‌های فنلی بوده که قادر به دادن هیدروژن به رادیکال است. گزارش‌های متعددی همبستگی خوب بین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی را نشان می‌دهد. تعداد زیادی از ترکیب‌های فنلی ساده همانند می‌تواند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کند، با این وجود قدرت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها وابسته به برخی ساختارهای پیش‌نیاز، به‌ویژه تعداد و آرایش گروه‌های هیدروکسیل، میزان کونژوگاسیون ساختاری و حضور واحدهای دهنده و گیرندهٔ الکترون در ساختار حلقه است [۲۹]. در این مطالعه آویشن دنایی دارای محتوای فنل تام بیشتری نسبت به اسانس آویشن تجاری بود. نتایج نشان دهنده ارزش غذایی این گونه گیاهان به‌ویژه قابلیت تیمول در پیشگیری از تشکیل محصولات سمّی اکسیژن واکنش‌گر (ROS) بوده‌اند [۳۰، ۳۱]. افزایش سطح نیتریک اکساید در شرایط خاص اسپاسمی مانند التهاب آلرژیک بینی، سندرم دیسترس تنفسی (Respiratory Distress Syndrome) و آسم دیده می‌شود [۳۲]. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که آویشن می‌تواند مستقیماً NO و O_2^- را بزداید که این امر تأیید کننده آنتی‌اکسیدان بودن آن در حد بسیار خوب است. بنابراین روغن‌های اسانسی آویشن به‌عنوان ترکیب طبیعی نگهدارندهٔ در صنعت غذایی استفاده می‌شود [۳۳]. بنابراین بهره‌گیری از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با پتانسیل حفاظت انسان از آسیب‌های ایجاد شده به‌وسیلهٔ استرس‌های اکسید کنندگی تشدید شده است [۳٤] و روغن‌های اسانسی سرشار از تیمول و کارواکرول با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی [۳۵] می‌تواند به این منظور مورد استفاده قرار شود.

سمّیت سلولی رقت‌های مختلف اسانس آویشن دنایی، آویشن تجاری و تیمول بر سلول‌های طبیعی انسان به‌صورت ۵۰ درصد غلظت ممانعت (IC_{50}) به‌ترتیب ۱٤۵۵، ۱۲/۱۰ و ۲۸٦۷ میکروگرم و این سمّیت در خصوص سلول‌های سرطانی به‌ترتیب ٤/۹۵، ۳/٦۱ و ۱۷۳۰ میکروگرم بود. اسانس‌ها غنی از فنل‌های مونوترپنوئیدی (Monoterpenoid Phenols) به‌ویژه تیمول و کارواکرول است [۳٦، ۳۷]. هر دو ترکیب توانایی تجزیه غشای بیرونی را داشته و به‌صورت وابسته به دوز خاصیت مهاری بر زنده ماندن و تکثیر سلول‌های Hep-2 (لایه سلول سرطانی انسانی پوششی) را دارند [۳۸]. نتایج این مطالعه از نظر خاصیت آنتی‌اکسیدانی و شیمی‌درمانی ضد نئوپلاستی (Anti-neoplastic Chemotherapy) دارای اهمیت است و می‌تواند پایه یک تحقیق ارزشمند دیگر قرار گیرد. نتایج نشان می‌دهد که اسانس آویشن باید پس از تعیین دوز مورد مصرف قرار گیرد. با توجه به تأثیر منفی مقدار کم اسانس آویشن بر سلول‌های سالم خون محیطی می‌توان تأثیر خوراکی این اسانس را مورد توجه قرار داد و با مد نظر قرار دادن خاصیت کشندگی سلول‌های سرطانی اسانس در مقادیر کم اسانس می‌توان نتیجه گرفت که در مبارزه با سلول‌های سرطانی، اسانس‌های آویشن آسیبی بر سلول‌های طبیعی نمی‌رساند. در مجموع مطالعه خواص زیست‌شناختی اسانس آویشن نشان می‌دهد که این فرآورده قابلیت خوبی برای بررسی کاربرد آن در صنعت غذا و دارو دارد.

۵- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مرکز

تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد که با تأمین هزینـه‌هـای این طرح امکان عملی‌شدن آن را فراهم آوردند اعلام می‌داریم.

٦- منابع

[1] Loziene K, Venskutonis PR, Sipailiene A, Labokas J. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. Food Chem 2007; 103(2): 546-59.

[2] Soliman KM, Badeaa RI. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food Chem Toxicol 2002; 40(11): 1669-75.

[3] Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol 2001; 91(3): 453-62.

[4] Lahlou M. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. Flavour Fragr J 2004; 19: 159-65.

[5] Apak R, Güçlü K, Demirata B, Ozyürek M, Celik SE, Bektaşoğlu B, Berker KI, Ozyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules 2007; 12(7): 1496-547.

[6] Oke F, Aslim B, Ozturk S, Altundag S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. Food Chem 2009; 112(4): 874-9.

[7] Madsen HL, Bertelsen G. Spices as antioxidants. Trends Food Sci Technol 1995; 6(8): 271-7.

[8] Yang Y, Huang CY, Peng SS, Li J. Carotenoid analysis of several dark-green leafy vegetables associated with a lower risk of cancers. Biomed Environ Sci 1996; 9(4): 386-92.

[9] Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. sipyleus var. sipyleus and *Thymus sipyleus* subsp. sipyleus var. rosulans. J Food Eng 2005; 66(4): 447-54.

[10] Safaei-Ghomi J, Ebrahimabadi AH, Djafari-Bidgoli Z, Batooli H. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. Food Chem 2009; 115(4): 1524-8.

[11] Venskutonis PR. Food additives: The dilemma of synthetic or natural. Acta Aliment 2004; 33(1): 1-5.

[12] Rustaiyan A, Masoudi S, Monfared A, Kamalinejad M, Lajevardi T, Sedaghat S, Yari M. Volatile constituents of three *Thymus* species grown wild in Iran. Planta Med 2000; 66(2): 197-8.

[13] Sefidkon F, Dabiri M, Rahimi-Bidgoly A. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Thymus kotschyanus* Boiss. and Hohen. Flavour Fragr J 1999; 14: 405-8.

[14] Sefidkon F, Jamzad Z, Yavari-Behrouz R, Shargh DN. Essential oil composition of *Thymus kotschyanus* boiss. and Hohen from Iran. J. Essent. Oil Res. 1999; 11: 459-60.

[15] Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I.

composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. Food Chem 2008; 110: 927-31.

[23] Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo AR, Faleiro ML, Miguel MG. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. Food Chem 2009; 116(3): 714-21.

[24] Sefidkon F, Jamzad Z, Mirza M. Chemical variation in the essential oil of *Satureja sahendica* from Iran. Food Chem 2004; 88(3): 325-8.

[25] Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radic Res 1995; 22(4): 375-83.

[26] Torel J, Cillard J, Cillard P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. Phytochemistry. 1986; 25(2): 383-5.

[27] Singh G, Marimuthu P, Murali HS, Bawa AS. Antioxidative and antibacterial potentials of essential oils and extracts isolated from various spice materials. J Food Safety 2005; 25(2): 130-45.

[28] Lee SJ, Umano K, Shibamoto T, Lee KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. Food Chem 2005; 91(1): 131-7.

[29] Miliauskas G, van Beek TA, de Waard P, Venskutonis RP, Sudhölter EJ. Identification of radical scavenging compounds in Rhaponticum carthamoides by means of LC-DAD-SPE-NMR. J Nat Prod 2005; 68(2): 168-72.

Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. Phytochemistry 2006; 67(12): 1249-55.

[16] Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J Agric Food Chem 1999; 47(10): 3954-62.

[17] Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT, Packer L. The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. Biochem Biophys Res Commun 1994; 201(2): 748-55.

[18] Plumb JA, Milroy R, Kaye SB. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. Cancer Res 1989; 49(16): 4435-40.

[19] Lau CB, Ho CY, Kim CF, Leung KN, Fung KP, Tse TF, Chan HH, Chow MS. Cytotoxic activities of Coriolus versicolor (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. Life Sci 2004; 75(7): 797-808.

[20] Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T, Chelghoum C. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii*. Pharm Biol 2006; 44(8): 607-12.

[21] Al-Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. J Ethnopharmacol 2008; 116(3): 403-6.

[22] Nejad Ebrahimi S, Hadian J, Mirjalili MH, Sonboli A, Yousefzadi M. Essential oil

[30] Cavar S, Maksimovic M, Solic ME, Jerkovic-Mujkic A, Besta R. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. Food Chem 2008; 111(3): 648-53.

[31] Prieto JM, Iacopini P, Cioni P, Chericoni S. In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. Food Chem 2007; 104(3): 889-95.

[32] Ashutosh K. Nitric oxide and asthma: a review. Curr Opin Pulm Med 2000; 6(1): 21-5.

[33] Curtis OF, Shetty K, Cassagnol G, Peleg M. Comparison of the inhibitory and lethal effects of synthetic versions of plant metabolites (anethole, carvacrol, eugenol, and thymol) on a food spoilage yeast (*Debaromyces hansenii*). Food Biotechnol 1996; 10(1): 55-73.

[34] Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit Rev Food Sci Nutr 2005; 45(4): 287-306.

[35] Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek TA, Linssen PH. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. J Sci Food Agri 1998; 77: 140-6.

[36] Nickavar B, Mojab F, Dolat-Abadi R. Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. Food Chem 2005; 90(4): 609-11.

[37] Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG, Faleiro L, Rejeb MN, Neffati M, Costa MM, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus* capitatus Hoff. et Link. Food Chem 2007; 105: 146-55.

[38] Stammati A, Bonsi P, Zucco F, Moezelaar R, Alakomi HL, von Wright A. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. Food Chem Toxicol 1999; 37(8): 813-23.