Cytotoxic effects of different solvents and essential oil of eucalyptus on human fibroblast cells

S. Samavati[*] M. Hadizadeh[**] M. Abedi[***] M. Kiani Rad[****]

[*]M.Sc. Student of Nanobiotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
[**]Assistant Professor of Biochemistry, Institute of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
[***]Assistant Professor of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
[****]Assistant Professor of Soil Engineering, Institute of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

Abstract

Background: There are reports that essential oils of different species of eucalyptus have special properties including anti-bacterial, antiviral, anticancer and insecticidal activities. Most of plant essential oils are dissolved in polar or non-polar solvents before examination.

Objective: The aim of this study was to determine the cytotoxic effects of different solvents and essential oil of eucalyptus on human fibroblast cells.

Methods: This experimental study was performed in the Institute of Biotechnology affiliated to Iranian Research Organization for Science and Technology during 2013-2014. The studied solvents were including ethanol, propylene glycol, dichloromethane, and dimethyl sulfoxide. Fibroblast cells were seeded in 96-well plates. After 24 h incubation at 37ºC, the cells were treated with different concentrations of the solvents or essential oil of eucalyptus (0.05-1 mg/ml). The viability of the cells was determined by the colorimetric MTT assay. Data were analyzed using T-test and One-way ANOVA.

Findings: The lowest cytotoxic effect against fibroblast cells was related to 1% ethanol and propylene glycol, while the highest cytotoxic effect was related to 10% dimethyl sulfoxide that decreased cell survival by 47%. Essential oil of eucalyptus also induced fibroblast cell death at concentrations higher than 0.05 mg/ml.

Conclusion: For clinical application of essential oil of eucalyptus, using solvent with appropriate concentration is necessary to prevent its cytotoxic effects.

Keywords: Eucalyptus, Solvents, Fibroblasts

Citation: Samavati S, Hadizadeh M, Abedi M, Kiani Rad M. Cytotoxic effects of different solvents and essential oil of eucalyptus on human fibroblast cells. J Qazvin Univ Med Sci. 2015; 19 (5): 4-9.

Corresponding Address: Mahnaz Hadizadeh, Institute of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
Email:hadizadehmahnaz@gmail.com
Tel: +98-912-5236745
Received: 8 Mar 2015
Accepted: 7 Jun 2015

اثر سمیت سلولی حلال‌های مختلف و اسانس اکالیپتوس بر روی سلول‌های فیبروبلاست انسانی

سیده صابره سماواتی* دکتر مهناز هادی‌زاده** دکتر محمد عابدی*** دکتر مهران کیانی‌راد****

* دانشجوی کارشناسی ارشد نانو بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
** استادیار بیوشیمی پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
*** استادیار شیمی تجزیه پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
**** استادیار مهندسی خاک پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی، تلفن ۰۹۱۲۵۲۳۶۷۴۵
Email: hadizadehmahnaz@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۱۷

چکیده

زمینه: گزارش‌هایی مبنی بر خواص ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد سرطانی و فعالیت حشره‌کشی اسانس گونه‌های مختلف اکالیپتوس وجود دارد. بیش‌تر اسانس‌های گیاهی قبل از آزمایش، در حلال‌های قطبی یا غیرقطبی حل می شوند.

هدف: مطالعه به منظور تعیین اثر سمیت حلال‌های مختلف و اسانس اکالیپتوس بر روی سلول‌های طبیعی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ در پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انجام شد. حلال‌های مورد بررسی اتانل، پروپیلن‌گلیکول، دی‌کلرومتان و دی‌متیل‌سولفوکسید بودند. سلول‌های فیبروبلاست در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند و ۲۴ ساعت پس از گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با غلظت‌های مختلف حلال‌ها یا اسانس اکالیپتوس (۰/۰۵ تا ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند. میزان بقای سلولی توسط رنگ سنجی تترازولیوم تعیین شد. داده‌ها با آزمون آماری تی و واریانس یک طرفه تحلیل شدند.

یافته‌ها: اتانل و پروپیلن‌گلیکول ۱٪ کم‌ترین اثر سمی را بر علیه سلول‌های فیبروبلاست داشتند. در حالی که دی‌متیل‌سولفوکسید ۱۰٪ با کاهش بقای سلولی به ۴۷٪، بیش‌ترین سمیت را نشان داد. غلظت‌های بالاتر از ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس اکالیپتوس نیز باعث القای مرگ سلول‌های فیبروبلاست شدند.

نتیجه‌گیری: برای کاربرد بالینی اسانس اکالیپتوس، استفاده از حلال و غلظت مناسب آن جهت جلوگیری از اثرات سمی ضروری است.

کلیدواژه‌ها: اکالیپتوس، حلال‌ها، فیبروبلاست‌ها

مقدمه:

امروزه به علت کم‌تر بودن عوارض جانبی داروهای گیاهی نسبت به داروهای شیمیایی، پژوهش بر روی آن‌ها بیش‌تر شده است.[۱] بالغ بر ۳۵۰۰ سال است که از گیاهان در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می شود.[۲] از جمله مواردی که امروزه در درمان سرطان مورد توجه پژوهش‌گران قرار گرفته، اثر ممانعت‌کنندگی ترکیب‌های برخی از گیاهان دارویی بر روی رشد سلول‌های سرطانی است.[۳]

یکی از گیاهان مورد استفاده در درمان سرطان، اکالیپتوس است.[۴-۸] این گیاه علاوه بر خاصیت ضد توموری، خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی نیز دارد.[۹-۱۱]

اکالیپتوس متعلق به خانواده میرتاسه (Myrtaceae) و از جمله درختان همیشه سبز بومی استرالیا است که در نواحی مختلف جهان گسترش یافته است. این گیاه به دلیل روغن، صمغ، چوب و همچنین خواص دارویی و آرام‌بخش خود کشت می‌شود و در صنایع آرایشی، غذایی، دارویی و عطر و بو کاربردهای فراوانی دارد.[۱۲] در طب سنتی برگ‌های اکالیپتوس، برای درمان عفونت‌های قارچی، زخم‌ها و بیماری‌های تنفسی (آسم، آنفولانزا، احتقان سینوس‌ها، برونشیت و سرماخوردگی) استفاده می‌شده است. علاوه بر این برخی از انواع آن هنوز هم برای درمان اسهال خونی، دردهای مفصلی، التهاب لوزه‌ها

کاربرد دارد. از برگ‌های پودر شده اکالیپتوس به عنوان حشره‌کش نیز استفاده می‌شود.[۱۳]

مطالعه‌های فیتوشیمیایی اسانس گونه‌های مختلف اکالیپتوس نشان می‌دهد که این اسانس مخلوط پیچیده‌ای از مواد آلی فرار، انواع ترکیب‌های مونوترپنی، سزکوئی ترپنی، فنول‌های آروماتیک و ترکیب‌های اتری، استری، آلدئیدی و کتونی است که غلظت آن‌ها در اسانس‌های روغنی به آب و هوا، ترکیب خاک و سن گیاه وابسته است.[۱۴]

از مهم‌ترین و عمده‌ترین اجزای تشکیل‌دهنده جنس اکالیپتوس، ۱، ۸ – سینئول (1,8-cineole) یا اکالیپتول است که تا حد زیادی مسؤول انواع خواص آن می‌باشد.[۱۵]

با توجه به نقش مهم حلال در آزمایش‌های درمانی و کشت سلولی، استفاده از حلال مناسب برای دارو یا ماده مؤثره اهمیت بسزایی دارد. حلال مناسب، حلالی است که کم‌ترین اثر سمی (Cytotoxicity) را روی سلول‌ها داشته، در دسترس و از نظر قیمتی مقرون به صرفه باشد. با وجود این که آزمایش‌های زیادی درباره اثرات ضد سرطانی اسانس‌های روغنی انجام شده است، وجود حلالی مناسب و بی خطر که بر روی سلول‌های سالم اثر منفی نداشته باشد، موضوعی چالش برانگیز است.

این مطالعه با هدف تعیین اثر سمیت حلال‌های مختلف و اسانس اکالیپتوس بر روی سلول‌های طبیعی انجام شد.

❋مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی در سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ در شرایط برون تنی (in vitro) در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انجام شد. برگ‌های گونه اکالیپتوس میکروتکا (Eucalyptus microtecha) در فصل پاییز سال ۱۳۹۲ از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران جمع‌آوری شد. به منظور حفظ ترکیب‌های اسانسی موجود در آن، برگ‌ها در سایه خشک و سپس با آسیاب پودر و با الک‌های مناسب دانه‌بندی شدند. از پودر گیاه به روش تقطیر با بخار آب و با دستگاه کلونجر، اسانس به دست آمد.[۱۶] از آنجا که اسانس حاصله ترکیب‌های فرار داشت در ظروف تیره و در بسته در یخچال نگه‌داری شد.

حلال‌های مورد استفاده در این مطالعه تجربی عبارت بودند از: اتانل، دی‌کلرومتان، دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) و پروپیلن گلیکول (همگی با خلوص بالای ۹۰ درصد). ماده فعال سطحی مورد استفاده، توئین ۸۰ (Tween80) بود.

برای انجام مطالعه‌های سلولی، رده سلولی فیبروبلاست انسانی (SW 872) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند. سپس در انکوباتور در شرایط ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری انجام شد. محیط کشت سلول‌ها هر ۴ روز یک بار تعویض شد.

اثر سمیت سلولی حلال‌ها، سورفکتانت توئین ۸۰ و اسانس اکالیپتوس توسط روش رنگ سنجی با استفاده از تترازولیوم (MTT) انجام شد. این روش براساس فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی در سلول‌های زنده استوار است. این آنزیم در چرخه تنفسی میتوکندریایی، محلول زرد رنگ تترازولیوم را احیا و کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تولید می‌کند. از آنجا که این کریستال‌ها در آب نامحلول هستند باید توسط ماده حلالی مثل دی‌متیل‌سولفوکسید به حالت محلول درآیند. بنابراین قبل از خواندن جذب نمونه‌ها، دی‌متیل-سولفوکسید به هر چاهک اضافه می‌شود و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد سنجش قرار می‌گیرد.[۱۷و۱۸]

جهت کشت سلول‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی در هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ چاهکی ریخته شد؛ به گونه‌ای که هر چاهک ۸ هزار سلول داشت. سپس اثر حلال‌های مختلف و همچنین

اسانس اکالیپتوس با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از آن‌ها به هر چاهک بررسی شد. سلول‌های حاوی محیط کشت بدون اضافه کردن هیچ اسانس و حلالی به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد دی‌اکسیدکربن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردیدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول تترازولیوم با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک پلیت اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکسید برای حل کردن کریستال‌های فورمازان جای‌گزین محلول قبلی شد و جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر (OD_{570}) توسط دستگاه الایزاریدر خوانده شد. سه تکرار برای هر غلظت حلال و حلال حاوی اسانس انجام شد. درصد بقای سلولی در گروه شاهد ۱۰۰ در نظر گرفته شد و درصد بقای سلولی در سایر گروه‌ها با فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد بقای سلولی = (OD_{570} حلال/OD_{570} شاهد) ×۱۰۰

نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شدند. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS۱۶ و آزمون‌های آماری واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و تی تحلیل شدند.

❋یافته‌ها:

در بین حلال‌های مورد آزمایش، اتانل ۱ درصد و پروپیلن گلیکول ۱ درصد در مقایسه با گروه شاهد (فاقد حلال) سمیت معنی‌داری را نشان ندادند. کم‌ترین سمیت سلولی مربوط به اتانل ۱۰ درصد و بیش‌ترین اثر آن مربوط به دی‌متیل‌سولفوکسید ۱۰ درصد بود (جدول شماره ۱).

جدول ۱- میانگین درصد بقای سلول‌های فیبروبلاست تیمار شده به مدت ۲۴ ساعت با حلال‌های آلی مختلف

حلال	درصد بقای سلولی ± خطای استاندارد
اتانل ۱ درصد	۹۵ ± ۵
اتانل ۱۰ درصد	۷۵ ± ۴
پروپیلن گلیکول ۱ درصد	۹۹ ± ۲
دی‌متیل‌سولفوکسید ۱ درصد	۷۴ ± ۶
دی‌متیل‌سولفوکسید ۱۰ درصد	۴۷ ± ۵
دی‌کلرومتان ۱ درصد	۸۴ ± ۷

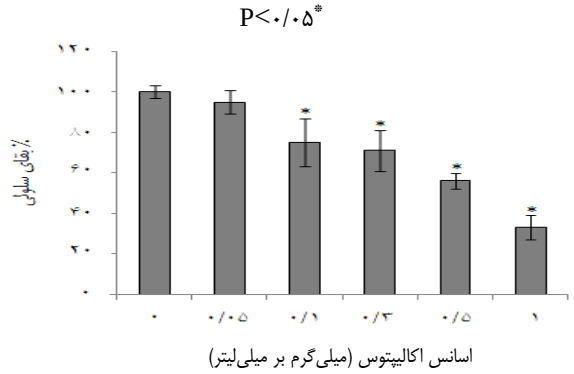
سورفکتانت توئین ۸۰ درصد باعث ۷۵ درصد کاهش بقای سلول‌ها شد. حتی غلظت‌های کم (یک درصد) توئین ۸۰ نیز باعث افزایش سمیت حلال‌های آلی مختلف شد (جدول شماره ۲).

جدول ۲- میانگین درصد بقای سلول‌های فیبروبلاست تیمار شده برای ۲۴ ساعت با حلال‌های آلی مختلف به همراه درصدهای متفاوت توئین ۸۰

حلال	درصد بقای سلولی±خطای استاندارد
اتانل ۱۰ درصد+ ۵ درصد توئین ۸۰	۶۲ ± ۵
دی‌متیل‌سولفوکسید ۵ درصد+ ۵ درصد توئین ۸۰	۴۲ ± ۷
دی‌متیل‌سولفوکسید ۱ درصد+ ۱ درصد توئین ۸۰	۵۸ ± ۳
پروپیلن گلیکول ۱ درصد+ ۱ درصد توئین ۸۰	۷۰ ± ۳
دی‌کلرومتان ۱ درصد+ ۱ درصد توئین ۸۰	۵۶ ± ۵

غلظت‌های کم‌تر از ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس اکالیپتوس حل شده در اتانل ۱۰ درصد، فاقد اثر سمی بر روی سلول‌های فیبروبلاست بود. در حالی‌که غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۳ آن باعث کاهش ۲۵ تا ۳۰ درصدی در بقای سلول‌ها شد. با افزایش غلظت اسانس، درصد بقای سلولی کم‌تر می‌شد. در غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس اکالیپتوس، به ترتیب ۳۶ و ۶۷ درصد کاهش در میزان بقای سلول‌های فیبروبلاست مشاهده شد. بنابراین IC_{50} اسانس اکالیپتوس در حلال اتانل ۱۰ درصد برای سلول‌های فیبروبلاست، ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (نمودار شماره ۱).

نمودار ۱- اثر غلظت‌های مختلف اسانس اکالیپتوس در اتانل ۱۰ درصد بر بقای سلول‌های فیبروبلاست انسانی



❋بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد حلال‌های پروپیلن گلیکول و اتانل ۱ درصد، کم‌ترین و دی‌متیل‌سولفوکسید ۱۰ درصد بیش‌ترین سمیت را بر روی سلول‌های فیبروبلاست داشتند. اسانس اکالیپتوس در حلال اتانل ۱۰ درصد در غلظت‌های بیش‌تر از ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای سلول‌های طبیعی فیبروبلاست سمی بود.

تاکنون گزارشی در مورد اثر سمیت حلال‌ها بر روی سلول‌های طبیعی فیبروبلاست وجود نداشته، اما اثر اسانس گونه‌های مختلف این گیاه بر روی چند رده سلول سرطانی بررسی شده است. آشور و همکاران گزارش کرده‌اند که اسانس‌های حاصل از ساقه و برگ‌های اکالیپتوس تورکوتا (E. torquata) حل شده در حلال نمکی و توئین ۸۰ به عنوان کمک حلال، اثر سمیت سلولی قابل توجهی بر روی سلول‌های سرطانی پستان رده MCF7 دارند. IC_{50} برای اسانس مستخرج از ساقه برابر ۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای برگ‌های این گیاه، معادل ۰/۰۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده، ولی اثر حلال به تنهایی بررسی نشده است.[۱۹] در مطالعه دیگری از حلال‌های پروپیلن گلیکول و اتیل الکل با نسبت یک به چهار استفاده شده و IC_{50} اسانس برگ‌های اکالیپتوس بنتامی (E. benthamii) بر روی سلول‌های جورکت، کم‌تر از ۰/۰۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بر روی سلول‌های سرطانی هلا در حدود ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید.[۲۰] در واقع طبق این گزارش‌ها، غلظت مؤثره اسانس اکالیپتوس برای کشتن ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی خیلی کم‌تر از غلظت‌های سمی به دست آمده توسط مطالعه حاضر برای سلول‌های طبیعی بوده است. بنابراین غلظت مؤثره اسانس اکالیپتوس در حلال اتانل ۱۰ درصد بر روی سلول‌های سرطانی حدود ۱۰ تا ۸۰۰ برابر کم‌تر از غلظت سمی آن برای سلول‌های طبیعی فیبروبلاست بوده است.

برای کاربرد بالینی اسانس اکالیپتوس جهت درمان سرطان، ضروری است از حلال و غلظت مناسب آن استفاده شود که فاقد اثر سمی بر روی سلول‌های طبیعی باشد. سمیت اسانس می‌تواند با توجه به نوع گونه گیاه و نیز نوع سلول هدف متفاوت باشد. بنابراین کاربرد اسانس اکالیپتوس در درمان سرطان فقط می‌تواند در غلظت‌های کم و حلال‌های مناسب مورد تأیید باشد و در به کارگیری آن در راستای مصارف دارویی باید دقت و توجه بیش‌تری کرد که تا حد ممکن از خواص سمی این گیاه اجتناب شود.

❋سپاس‌گزاری:

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران است. از سازمان مذکور و مرکز لیزر پزشکی جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت فراهم کردن امکانات این پژوهش سپاس‌گزاری می‌شود.

❋مراجع:

1. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod 2012 Mar 23; 75 (3): 311-35.

2. Haniadka R, Popouri S, Palatty PL, Arora R, Baliga MS. Medicinal plants as antiemetics in the treatment of cancer: a review. Integr Cancer Ther 2012 Mar; 11 (1): 18-28.

3. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 2010 Oct 21; 15 (10): 7313-52.

4. Islam F, Khatun H, Ghosh S, Ali MM, Khanam JA. Bioassay of Eucalyptus extracts for anticancer activity against Ehrlich ascites

Based Complement Alternat Med 2012; 2012: 342652.
5. Maurya A, Srivastava SK. Preparative-scale separation of anticancer triterpenes from Eucalyptus hybrid by centrifugal partition chromatography. Sep Sci Technol 2011 May 2; 46 (7): 1189-94.
6. Bhagat M, Sharma V, Saxena AK. Anti-proliferative effect of leaf extracts of Eucalyptus citriodora against human cancer cells in vitro and in vivo. Indian J Biochem Biophys 2012 Dec; 49 (6): 451-7.
7. Islam F, Khatun H, Khatun M, Ali SM, Khanam JA. Growth inhibition and apoptosis of Ehrlich ascites carcinoma cells by the methanol extract of Eucalyptus camaldulensis. Pharm Biol 2014 Mar; 52 (3): 281-90.
8. Kumari SP, Jesudas L. Anticancer activity of eucalyptus crude extract of globulus and nosopra Cordifolia on MCF-7 cell line. Int J Bioassays 2014; 3 (1): 1699-707.
9. Elaissi A, Rouis Z, Salem NA, Mabrouk S, ben Salem Y, Salah KB, et al. Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. BMC Complement Altern Med 2012 Jun 28; 12: 81.
10. Tyagi AK, Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptus globules oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. Food Chem 2011 May 1; 126 (1): 228-35.
11. Elaissi A, Salah KH, Mabrouk S, Laribi KM, Chemli R, Harzallah-Skhiri F. Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species' essential oils. Food Chem 2011 Dec 15; 129 (4): 1427-34.
12. Domingues RMA, Sousa GDA, Freire CSR, Silvestre AJD, Pascoal Neto C. Eucalyptus globulus biomass residues from carcinoma (EAC) cells in Swiss albino mice. Asian Pac J Trop Biomed 2012 May; 2 (5): 394-8.
13. Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S. Compositional analysis and insecticidal activity of Eucalyptus globules (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (Musca domestica). Acta Trop 2012 May; 122 (2): 212-8.
14. Maciel MV, Morais SM, Bevilaqua CM, Silva RA, Barros RS, Sousa RN, et al. Chemical composition of Eucalyptus spp. essential oils and their insecticidal effects on Lutzomyia longipalpis. Vet Parasitol 2010 Jan 20; 167 (1): 1-7.
15. Gilles M, Zhao J, An M, Agboola S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. Food Chem 2010 Mar 15; 119 (2): 731-7.
16. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Biol 2011; 731: 237-45.
17. Mann TS, Kiran Babu GD, Guleria S, Singh B. Comparison of Eucalyptus cinerea essential oils produced by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide extraction. Nat Prod Commun 2011 Jan; 6 (1): 107-10.
18. Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. Proc West Pharmacol Soc 2011; 54: 10-4.
19. Ashour HM. Antibacterial, antifungal, and anticancer activities of volatile oils and extracts from stems, leaves, and flowers of Eucalyptus sideroxylon and Eucalyptus torquata. Cancer Biol Ther 2008 Mar; 7 (3): 399-403.
20. Döll-Boscardin PM, Sartoratto A, Sales Maia BH, Padilha de Paula J, Nakashima T, Farago PV, et al. In vitro cytotoxic potential of essential oils of Eucalyptus benthamii and its related terpenes on tumor cell lines. Evid

pulping industry as a source of high value triterpenic compounds. Ind Crops Prod 2010 Jan; 31 (1): 65-70.