



Antibacterial Properties of Ozonated Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) and Sesame (*Sesamum Indicum* L.) Oils on *Staphylococcus Aureus*

Sepideh Yousefi¹, Mahmoud Pooryousef Miandoab^{2*}, Shahram Armeideh³

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
2. Department of Agronomy and Agro-Ecology, Faculty of Basic Sciences, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Article Information

Article Subject:

Antibiotic Resistance

DOI:

Corresponding author:

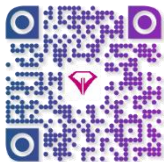
**Mahmoud Pooryousef
Miandoab,**

Department of Agronomy and
Agro-Ecology, Faculty of Basic
Sciences, Urmia Branch, Islamic
Azad University, Urmia, Iran

Email:

Pooryousefm@yahoo.com

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

Background and Aims: *Staphylococcus aureus* infection needs long-term treatment with antibiotics which may cause adverse effects on many body organs and antibiotics resistance. Therefore, the use of natural and herbal compounds has been under consideration.

Materials and Methods: In the present study, the effects of sunflower (*Helianthus annuus*) and sesame (*Sesamum indicum*) oils were assessed on *S. aureus* growth regarding zone of inhibited growth (Antibiogram test), Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC).

Results & Discussion: considering antibiogram test, there was a statistically significant difference between sesame and sunflower oil (72 hours ozonate) and pure sesame and sunflower oils and ciprofloxacin antibiotic, as well as negative control distilled water after 24 and 48 hours ($P \leq 0.05$). The results showed that antibiotic, ozonated water, ozonated sesame and sunflower oils had 12, 8, 4, and 3 mm inhibition zones after 24 hours on *S. aureus* bacteria, respectively. The MBC and MIC values of ozonated sunflower and sesame oil on *S. aureus* were 0.064, 0.032, 0.322 and 0.008 mg/mL, respectively.

Sesame and sunflower oils can be used as inhibitors of the growth of *S. aureus* in pharmaceutical formulations such as wound and burn healing ointments.

Keywords: Ozonated sunflower oil, Ozonated sesame oil, *Staphylococcus aureus*, Antibiogram test

Received: 2018/11/03 Accepted: 2019/07/08 Available online: 2019/08/23

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

How to cite this article:

Yousefi S, Pooryousef Miandoab M, Aramideh S. Antibacterial Properties of Ozonated Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) and Sesame (*Sesamum Indicum* L.) Oils on *Staphylococcus Aureus*. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (2) :132-136



خواص ضدباکتریایی روغن‌های آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) و کنجد (*Sesamum indicum* L.) از زونه‌شده روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط آزمایشگاهی

سپیده یوسفی^۱، محمود پوریوسف میانداوآب^{۲*}، شهرام آرمیده^۳

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
۲. گروه زراعت و اگرواکولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
۳. گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: با توجه به بیماری‌زایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) و درمان طولانی مدت آن با آنتی‌بیوتیک‌ها که موجب اثرات سوء روی ارگان‌های بدن و مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود، استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهی مورد توجه است.

مواد و روش کار: در مطالعه حاضر اثرات روغن‌های آفتابگردان (*Helianthus annuus*) و کنجد (*Sesamum indicum*) از زونه‌شده ۷۲ ساعته در رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از نظر قطر هاله عدم رشد (آنتی‌بیوگرام) و آزمون حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی شد.

یافته‌ها و بحث: در بررسی قطر هاله مهاری رشد بین روغن‌های کنجد و آفتابگردان (از زونه ۷۲ ساعته) با روغن کنجد و آفتابگردان خالص و دیسک آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و همچنین دیسک کنترل منفی آب مقطر بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P \leq 0.05$). نتایج نشان داد آنتی‌بیوتیک، آب از زونه، روغن کنجد و آفتابگردان از زونه به ترتیب ۱۲، ۸، ۴ و ۳ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت روی کشت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند. مقادیر MBC و MIC حاصل از روغن‌های آفتابگردان و کنجد از زونه روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۰/۰۶۴، ۰/۰۳۲، ۰/۰۳۲ و ۰/۰۰۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل شد. روغن‌های کنجد و آفتابگردان از زونه می‌توانند به عنوان عامل بازدارنده از رشد این باکتری در فرمولاسیون‌های دارویی نظیر پماد ترمیم زخم و سوختگی مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: روغن آفتابگردان از زونه، روغن کنجد از زونه، *استافیلوکوکوس اورئوس*، تست آنتی بیوگرام

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۲

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۷

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۶/۰۱

موضوع:

مقاومت پادزیستی (آنتی بیوتیکی)

IJMM1398;13(2): 132-136

نویسنده مسئول:

محمود پوریوسف میانداوآب

گروه زراعت و اگرواکولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

پست الکترونیک:

Poorvousfm@yahoo.com

کپی‌رایت © مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند از طریق توانایی تکثیر و انتشار گسترده در بافت‌های بدن و همین‌طور از طریق تولید تعداد زیادی مواد خارج سلولی باشد. بعضی از این مواد آنزیم و تعدادی دیگر توکسین هستند (۳). در درمان زخم‌های عفونی بیشتر از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود، به دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها و با توجه عوارض جانبی و آسیب‌های زیادی که بر ارگان‌های بدن دارند (۴-۶)، می‌توان از جایگزین‌های گیاهی مانند روغن‌ها، عصاره‌ها، پودرها، پمادها و عوامل فیزیکی مانند اشعه‌ها نظیر گاما، بتا و گاز ازون استفاده کرد. روغن آفتابگردان شامل چربی‌های غیراشباع یگانه و چندگانه با اولئیک بالا و حاوی سلنیوم

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از گونه‌های بیماری‌زای گرم مثبت است که روی محیط آگار خون‌دار رشد می‌کند، همولیز ایجاد می‌کند. این باکتری ممکن است به شکل فلور عادی پوست یا بینی وجود داشته باشد و در ایجاد عفونت، از عفونت‌های ساده پوستی مانند جوش‌دانه، کورک، کفگیرک، گل‌مژه و آبسه گرفته تا بیماری‌های تهدیدکننده زندگی مانند پنومونی، مننژیت، استئومیلیت، اندوکاردیت، سندرم شوک سمی و سپتی‌سمی نقش دارد. *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یکی از پنج عامل شایع ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های زخم پس از جراحی است (۱،۲).

نحوه آزمایش انتشار دیسک

برای انجام آزمایش انتشار روی دیسک ابتدا کشت ۲۴ ساعته از باکتری که حاوی 10^6 باکتری در هر میلی‌لیتر بود که با استفاده از سوپ استرون روی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح شد. سپس دیسک‌های بلانک استرون به قطر ۶ میلی‌متر که با ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از روغن‌های کنجد و آفتابگردان خالص به صورت جداگانه روی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح شده گذاشته شد. برای کنترل مثبت از دیسک آنتی‌بیوتیک سپیروفلوکساسین ۵ میکروگرم و برای کنترل منفی از دیسک‌های بلانک استرون استفاده شد. در تمام تیمارها از ۰/۳ درصد دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide) (DMSO) بعنوان حلال استفاده گردید. سپس پلیت‌ها در 37 ± 1 درجه سلسیوس به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. بعد از اتمام زمان گرم‌خانه‌گذاری، قطر هاله عدم رشد تشکیل شده در اطراف دیسک‌های مورد آزمایش در زیر نور مطالعه و با استفاده از کولیس اندازه‌گیری و گزارش شد (۱۰).

آزمایش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل

غلظت کشندگی (MBC)

ابتدا محیط کشت مولر هینتون براث و سوسپانسیونی از باکتری-ها به طور جداگانه تهیه شد و سپس به میزان ۱۶۰ میلی‌لیتر محیط مولر هینتون براث، ۲۰ میلی‌لیتر باکتری، ۱۰ میلی‌لیتر از هر کدام از روغن‌های آفتابگردان و کنجد (که به صورت خالص و ازون‌نشده، به صورت جداگانه در چهار مرحله آزمایش) تهیه شد. سپس از مخلوط حاصل با سمپلر یک میکرولیتر به داخل چاهک‌های پلیت در هشت غلظت و در هشت خانه تزریق شد. پلیت‌ها بعد از مخلوط‌شدن در 37 ± 1 درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از ۲۴ ساعت پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای از انکوباتور خارج و مشاهده شدند. رشد یا عدم رشد باکتری و میزان کدورت ایجاد شده در داخل چاهک‌ها بررسی شد. طبق تعریف MIC که عبارت است از کمترین غلظتی که باعث ممانعت از رشد یک باکتری می‌شود، نحوه ارزیابی به این صورت بود که آخرین چاهکی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. به منظور تعیین MBC مواد داخل هر یک از چاهک‌های شفاف روی پلیت حاوی محیط نوترینت آگار کشت سطحی شد. بعد از گرم‌خانه‌گذاری پلیت‌ها، طبق تعریف کمترین غلظتی که باعث از بین رفتن باکتری می‌شود، یعنی پلیتی که در آن هیچ‌گونه باکتری رشد نکرده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۰).

تجزیه و تحلیل و آزمون آماری

است که به خاطر کاهش خطر مشکلات قلبی و خواص ضدالتهابی کاربرد دارد (۷).

خواص آنتی‌اکسیدانی فوق‌العاده در روغن کنجد به دلیل وجود دو ماده شیمیایی سیزامول و سیزامین است که با رادیکال‌های آزادی که به سلول‌ها آسیب می‌رسانند مقابله می‌کند (۸). نتایج پژوهش‌های مختلف خواص ضدالتهابی و ضدباکتریایی روغن‌های کنجد و آفتابگردان را نشان می‌دهد (۸، ۹). از آزون تراپی به عنوان یک روش و راهکار جدید به منظور جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان استفاده کرد (۹). در همین راستا، در این تحقیق اثر بازدارندگی از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* با روغن‌های آفتابگردان و کنجد ازون‌نشده در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در آزمایشگاه کنترل کیفی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد ارومیه در بهار ۱۳۹۷ انجام شد. روغن‌های کنجد و آفتابگردان خالص از واحد زیست فناوری پویا تهیه و با دستگاه آزون‌ساز با میزان ورودی اکسیژن ۱ لیتر و خروجی آزون ۱ گرم بر ساعت، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۱۵ درجه سلسیوس ازون‌شد. این باکتری با ATCC 29213 به صورت شناسایی شده و آماده از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه در پلیت‌های حاوی محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار برای آماده‌سازی و کشت مجدد تحویل گرفته شد. برای رقیق‌سازی روغن‌های خالص و ازون‌نشده از محلول دی‌متیل سولفو اکسید ۱۰ درصد استفاده شد. رقت‌سازی سریالی برای هر دو روغن خالص و ازون‌ده در هشت غلظت از $0/128$ تا $0/001$ میلی‌گرم انجام شد. باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط کشت نوترینت آگار مورد کشت مجدد و تازه قرار گرفت تا پرگنه‌های ایزوله یا تک به دست آید. پلیت‌ها یک شب در 37 ± 1 درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس ۴ یا ۵ پرگنه ایزوله‌شده با آنس حلقوی استریل به یک لوله آزمایش استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر از سالین فیزیولوژیکی استریل منتقل شد و به‌خوبی با ورتکس تکان داده شد. در یک لوله آزمایش دیگر ۵ میلی‌لیتر از محلول نیم مک فارلند ریخته شد. سپس کدورت سالین محتوی پرگنه با کدورت لوله نیم مک فارلند به صورت چشمی مقایسه شد. کدورت سالین با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر کنترل شد. جذب نوری باید بین $0/08$ تا $0/1$ باشد. این کدورت معادل $10^8 \times 1/5$ cfu/ml باکتری است (۱۰).

تجزیه آماری حاصل از تأثیر روغن آفتابگردان، روغن کنجد، روغن آفتابگردان از زونه شده، روغن کنجد از زونه شده، آب از زونه و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین (CP) به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر به عنوان کنترل منفی در ایجاد هاله عدم رشد روی این باکتری اختلاف معنی داری بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان دادند ($P=0.001$)، $F(6,14)=344.73$ و $F(6,14)=257.09$ (جدول ۱). در این آزمایش فرض همگنی واریانسها محقق شد ($Sig=0.514$) و ($Sig=0.149$)، بنابراین داده‌های آزمایش نرمال بودند و آزمایش دقت داشت.

تجزیه و تحلیل قطر هاله عدم رشد با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تکمیلی توکی، همگنی واریانس داده‌ها با آزمون لون با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲، انجام شد و نمودارها در نرم افزار اکسل ۲۰۱۶ رسم شدند.

یافته‌ها و بحث

هاله عدم رشد تیمارها روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت

جدول ۱. مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از تأثیر تیمارها روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت با آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵ (ستون‌هایی که حروف مشابه دارند، اختلاف معنی داری ندارند)

ردیف	ترکیبات	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی متر)	
		۲۴	۴۸
۱	روغن آفتابگردان	۱/۷۱±۰/۰۱ ^E	۱/۱۷±۰/۰۲ ^E
۲	روغن کنجد	۱/۷۱±۰/۱۲ ^E	۱/۱۷±۰/۱۱ ^E
۳	روغن آفتابگردان از زونه شده	۳/۰۰±۰/۲۱ ^D	۴/۰۰±۰/۳۳ ^D
۴	روغن کنجد از زونه شده	۴/۰۰±۰/۲۸ ^C	۴/۸۳±۰/۴۴ ^C
۵	آب از زونه	۸/۰۰±۰/۲۸ ^B	۹/۰۰±۰/۲۸ ^B
۶	آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین	۱۲/۰۰±۰/۲۸ ^A	۱۲/۸۳±۰/۲۸ ^A
۷	آب	±۰ ^E	±۰ ^E

راه‌های مختلف از زون درمانی با موفقیت در برابر عفونت‌های مختلف مانند عفونت‌های داخل چشم و واژینیت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اولیوزون (Oleozone) در درمان انواع مختلف بیماری‌های پوستی ناشی از هرپس، میکوباکتریوم، استافیلوکوک، استرپتوکوک و غیره مؤثر است. Morris و Menendez (۱۹۹۷) ۱۸۰ بیمار مبتلا به عفونت هرپس سیمپلکس در لب‌ها را با استفاده از دوزهای مختلف اولیوزون درمان کردند (۱۱). در مطالعه دیگری که خواص ضد باکتریایی دانه‌های کنجد روی *Bacillus cereus*, *S. aureus* بررسی شد، نتایج نشان داد سیزامول در غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر قادر به توقف رشد *S. aureus* به طور کامل است (۱۲). روغن آفتابگردان از زونه حساس در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و مقاوم به متی‌سیلین آزمایش شد و اثرات ضد میکروبی آن علیه چندین گونه باکتریایی نشان داده شد. بررسی آزمایشگاهی روغن آفتابگردان از زونه روی گونه‌های مقاوم پس از تعیین MIC و MBC نشان داد الیوزون روی تمام سوبه‌ها مؤثر است (۱۳). روغن آفتابگردان از زونه خواص ضد باکتریایی قابل توجهی دارد و بررسی‌ها نشان داده است به طور مستقیم بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بدون آسیب به اپیتلیوم روده انسانی

میانگین داده‌ها به روش مقایسه میانگین (اچ اس دی- توکی - HSD-tuky) انجام شد. ستون‌هایی که حروف مشابه دارند، اختلاف معنی داری ندارند و بیشترین اثر با حرف A نمایش داده شده است و به ترتیب کاهش مقادیر از حروف دیگر با توجه به اچ اس دی- توکی حروف گذاری شد) در مقایسه تأثیر تیمارهای مختلف روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت بیشترین هاله عدم رشد بعد از آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین (۱۲/۰۰±۰/۲۸ میلی متر) و (۴/۴۴±۰/۸۳ میلی متر) مربوط به آب از زونه (۸/۰۰±۰/۲۸ میلی متر) و (۹/۰۰±۰/۲۸ میلی متر) و بعد از آب از زونه، روغن کنجد از زونه (۴/۰۰±۰/۲۸ میلی متر)، (۴/۴۴±۰/۸۳ میلی متر) است (جدول ۱). خاصیت مهارکنندگی و کشندگی میکروارگانیسم مربوط به خواص ضد التهابی از زون است که در روغن قابلیت انباشت و ذخیره شدن دارد و موجب خواص ضد باکتریایی روغن از زونه می‌شود. نتایج حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت مهاری تیمارهای مختلف روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۰/۰۶۴، ۰/۰۳۲، ۰/۰۳۲ و ۰/۰۰۸ میلی گرم بر میلی لیتر حاصل شد.

برای ترکیبات شیمیایی باشند و در فرمولاسیون‌هایی نظیر پماد، لوسیون‌های پوستی و غیره به کار روند.

سپاسگزاری

این تحقیق حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد با کد ۱۰۳۳۰۵۴۸۹۶۲۰۲۰ است.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

عمل می‌کند (۱۴). در عفونت‌های ناشی از انگل‌ها و آکنه کاربرد پمادها و روغن ازونه نظیر روغن آفتابگردان ازونه با به حداقل رساندن انتشار و چرخه تولید مثلی پاتوژن، آن را از بین می‌برد، تورم را کاهش می‌دهد و باعث بهبودی سریع می‌شود (۱۴). نتایج تحقیق Bocci (۱۹۹۲) نشان داد ازون نوعی اکسیدکننده قوی است و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سلولی را تحریک می‌کند و در نهایت منجر به مهار استرس اکسیداتیو می‌شود و این ممکن است در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله HIV مؤثر واقع شود (۱۵). ازون و ترکیب آن با روغن‌ها موجب از بین رفتن میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه باکتری‌ها می‌شود و روغن‌های ازونه می‌توانند جایگزین خوبی

References

- Harris L, Foster S, Richards R. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesions in relation to adhesion to biomaterials: Review. *Eur Cell Mater.* 2002; 4(3):100-20. [DOI:10.22203/eCM.v004a04] [PMID]
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Medizinische Mikrobiologie*. Berlin: Springer-Verlag; 2013.
- Bowersox J. Experimental staph vaccine broadly protective in animal studies [Internet]. 1999.
- Wright GD. Something new: Revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Can J Microbiol.* 2014; 60(3):147-54. [DOI:10.1139/cjm-2014-0063] [PMID]
- Asr-e Emrooz Newspaper. Antibiotic drug control [Internet]. 2016.
- Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol.* 2013; 4:47-52. [DOI:10.3389/fmicb.2013.00047] [PMID] [PMCID]
- Badouin H, Gouzy J, Grassa CJ, Murat F, Staton SE, Cottret L, et al. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and asterid evolution. *Nature.* 2017; 546(7656):148-52. [DOI:10.1038/nature22380] [PMID]
- Sediqi MN. Adaptability of oilseed species at high altitudes of Colorado and technology transfer to Afghanistan [PhD dissertation]. Fort Collins, Colorado: Colorado State University; 2012.
- Bashi S, Alsuwaidan S, Awada A, Jumah M, Alem A. Diabetic neuropathy: Correlation with other microvascular complications. *Neurosciences.* 2002; 7: 86-91.
- Wikler M, Matthew A. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard. CLSI (NCCLS). 2006; 26(2):9-16.
- Morris G, Menendez S. Oleozon in gynecology. Paper presented at: Second International Symposium on Ozone Applications. 24-26 March 1997; Havana, Cuba.
- Kumar CM, Singh SA. Bioactive lignans from sesame (*Sesamum indicum* L.): Evaluation of their antioxidant and antibacterial effects for food applications. *Int J Food Sci Tech.* 2015; 52 (5):2934-41. [DOI:10.1007/s13197-014-1334-6] [PMID] [PMCID]
- Lezcano I, Nuñez N, Espino M, Gómez M. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil, oleozón, against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *OS & E.* 2000; 22(2):207-14. [DOI:10.1080/01919510008547221]
- Menéndez S, Re L, Falcón L, Argote MB, Mendez I, Fernandez D, et al. Safety of topical Oleozon® in the treatment of tinea pedis: Phase IV clinical trial. *Int J Ozone Therapy.* 2008; 7 (1):55-9.
- Bocci V. Ozonization of blood for the therapy of viral diseases and immunodeficiency: A hypothesis. *Med Hypotheses.* 1992; 39(1):30-4. [DOI:10.1016/0306-9877(92)90136-Z]