

Genotoxic Evaluation of Linalool in Neuronal PC12 Cells

Arezoo Rajabian^{1,2},
Elham Pourheidari³,
Hamid Reza Sadeghnia⁴

¹ Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences Mashhad, Iran

² Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ Associate Professor, Department of Intensive Care Unit, Hazrat Rasoul Akram Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Associate Professor, Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received October 5, 2020 ; Accepted August 8, 2021)

Abstract

Background and purpose: Linalool is one of the main constituents of the essential oil of some aromatic plants, including *Lavandula angustifolia*. It is used in cosmetics and pharmaceutical industry. In this study, the cytotoxicity and genotoxicity of ($\pm$) linalool and its naturally occurring enantiomer, (*R*)-(-) linalool, were evaluated in neuronal PC12 cells.

Materials and methods: PC12 cells were incubated with different concentrations of racemate linalool and (*R*)-(-) linalool for 12 and 24 h. Cytotoxicity and genotoxicity were evaluated using MTT assay and single cell gel electrophoresis (comet) assay, respectively.

Results: Findings showed that ($\pm$) linalool and (*R*)-(-) linalool (3200 μ M) significantly reduced cell viability to 76.2% and 92%, compared to the control group (untreated cells) ($P < 0.001$). IC50 values after 12 h and 24 h exposure to ($\pm$) linalool and (*R*)-(-) linalool were 2700 μ M and 5440 μ M, and 2600 μ M and 3040 μ M, respectively. Following treatment by ($\pm$) linalool or (*R*)-(-) linalool for 12 or 24 h, the DNA contents in the comets tail, as an indicator of genotoxicity, significantly increased to $21.36 \pm 3.1\%$, $27.6 \pm 2.3\%$ and $15.2 \pm 1.6\%$ and $21.3 \pm 2\%$, respectively ($P < 0.001$).

Conclusion: In this study, racemate linalool and its enantiomer, (*R*)-(-) linalool, decreased the viability of PC12 cells via induction of genotoxicity. (*R*)-(-) linalool exhibited more cytotoxicity than ($\pm$) linalool.

Keywords: DNA damage, linalool, cytotoxicity, genotoxicity

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (201): 134-141 (Persian).

* Corresponding Author: Hamid Reza Sadeghnia - Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences Mashhad, Iran (E-mail: sadeghniahr@mums.ac.ir)

بررسی سمیت ژنومی لینالول در سلول های عصبی PC12

آرزو رجیبیان^۱الهام پور حیدر^۳حمید رضا صادق نیا^۴

چکیده

سابقه و هدف: لینالول از اجزای اصلی روغن های فرار برخی از گیاهان معطر شامل *Lavandula angustifolia* است. این جزء معطر در مواد آرایشی-بهداشتی و صنعت داروسازی به کار می رود. در این مطالعه، سمیت سلولی و ژنومی (±) لینالول و انانتیومری که به طور طبیعی یافت می شود، (R)-(-) لینالول، در سلول های عصبی PC12 (مشتق از فنوکروموسایتمای رت) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه، سلول های PC12 به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت با غلظت های مختلف لینالول راسمیک و انانتیومر آن (۱-۳۲۰ μM) تیمار شدند، سپس سمیت سلولی لینالول با آزمون MTT و سمیت ژنومی با استفاده از آزمون ژل الکتروفورز تک سلولی (کامت) ارزیابی شد.

یافته ها: براساس نتایج، (±) لینالول و انانتیومر آن موجب کاهش قابل ملاحظه بقای سلول ها تا ۷۶/۲ و ۹۲ درصد (غلظت ۳۲۰ μM) در مقایسه با گروه کنترل (سلول های تیمار نشده) شدند ($P < ۰/۰۰۱$). شاخص های IC50 پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت مواجهه با (±) لینالول به ترتیب ۲۷۰ μM و ۵۴۴۰ و با (R)-(-) لینالول ۲۶۰۰ μM و ۳۰۴۰ محاسبه شد. همچنین سمیت ژنومی که، به صورت درصد محتوی DNA در دنباله کامت مشخص می شود، پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت مواجهه با (±) لینالول تا ۲۱/۳۶±۳/۱ درصد و ۲۷/۶±۲/۳ درصد و (R)-(-) لینالول تا ۱۵/۲±۱/۶ درصد و ۲۱/۳±۲/۳ درصد به میزان قابل ملاحظه ای افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$).

واژه های کلیدی: آسیب DNA، لینالول، سمیت سلولی، سمیت ژنومی

مقدمه

انانتیومرهای آن، به عنوان ترکیب معطر و طعم دهنده، در محصولات آرایشی-بهداشتی، بسیاری از مواد غذایی فراوری شده و نوشابه ها و نیز فرمولاسیون های دارویی به کار می روند (۲). علاوه بر این لینالول به عنوان ترکیب واسط در سنتز ویتامین E در صنعت نیز مورد استفاده قرار می گیرد. سازمان خواربار و کشاورزی ملل

(R)-(-) لینالول یک منوترپن طبیعی، با نام شیمیایی ۳ و ۷-دی متیل اکتا-۱-۶-دی ان-۳-ال (تصویر شماره ۱) و انانتیومرهای آن، جزء اصلی در روغن های فرار در گیاهان معطر شامل *Lavandula angustifolia* Mill.، *Rosmarinus officinalis* L، *Melissa officinalis* L، *Cymbopogon citratus* DC است (۱). لینالول و

مؤلف مسئول: حمیدرضا صادق نیا-مشهد-میدان آزادی-پردیس دانشگاه-دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد E-mail: sadeghniahr@mums.ac.ir

۱. استادیار، گروه طب داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲. مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳. دانشیار، بخش مراقبت های ویژه، بیمارستان حضرت رسول اکرم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۴. دانشیار، مرکز تحقیقات فارماکولوژیک، گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۹/۷/۱۵ تاریخ تصویب: ۱۴۰۰/۵/۱۷

مواد و روش‌ها

جهت سنجش سمیت سلولی لینالول از آزمون MTT استفاده شد. به طور مختصر، سلول‌های PC12 (کد NCBI: C153، انیستیتو پاستور، تهران) با دانسیته ۱۰۰۰۰-۵۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شده و سپس با غلظت‌های افزایشی لینالول (شرکت سیگما، $1-3200 \mu\text{M}$) به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت مواجه شدند. سپس به روش استاندارد رنگ سنجی با معرف MTT (۳-۵ و ۴-۵ دی متیل تiazolیل-۲-یل)-۵ دی فنیل تترازولیم بروماید، مرک، آلمان) میزان بقای سلولی تعیین شد (۸). جهت بررسی سمیت ژنومی لینالول از آزمون کامت یا ژل الکتروفورز تک سلولی استفاده شد. به طور مختصر سلول‌ها با دانسیته 10^6 در پلیت ۱۲ خانه کشت داده شده و سپس در معرض غلظت‌های $1 \mu\text{M}$ و ۵۰ و ۱۶۰۰ از لینالول به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس سلول‌ها در ژل آگاروز با نقطه ذوب پایین لود شده و بر روی لام‌های کوت شده با آگاروز با نقطه ذوب نرمال قرار داده شدند. سپس لام‌ها در معرض بافر لیزکننده به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفته و به ۴۰ دقیقه الکتروفورز شدند. لام‌ها پس از شستشو با محلول ادیتیوم برومید ($20 \mu\text{g/ml}$) رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و بزرگمایی ۴۰۰ ارزیابی شدند. شدت آسیب DNA (دنباله کامت) به وسیله نرم افزار CASP اندازه گیری شد (۸).

یافته‌ها و بحث

بقای سلول‌های PC12 به میزان قابل توجهی تا ۸۵/۳ و ۷۶/۲ درصد پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت مواجهه با $3200 \mu\text{M}$ ($\pm$) لینالول کاهش یافت (تصویر شماره ۱، $P < 0.001$). همچنین، ۹۴/۵ و ۹۲ درصد کاهش در بقای سلول‌ها پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت مواجهه با $(-)-(R)$ لینالول مشاهده شد (تصویر ۲، $P < 0.001$). ۱۲ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با $2600 \mu\text{M}$ از $(-)-(R)$ لینالول

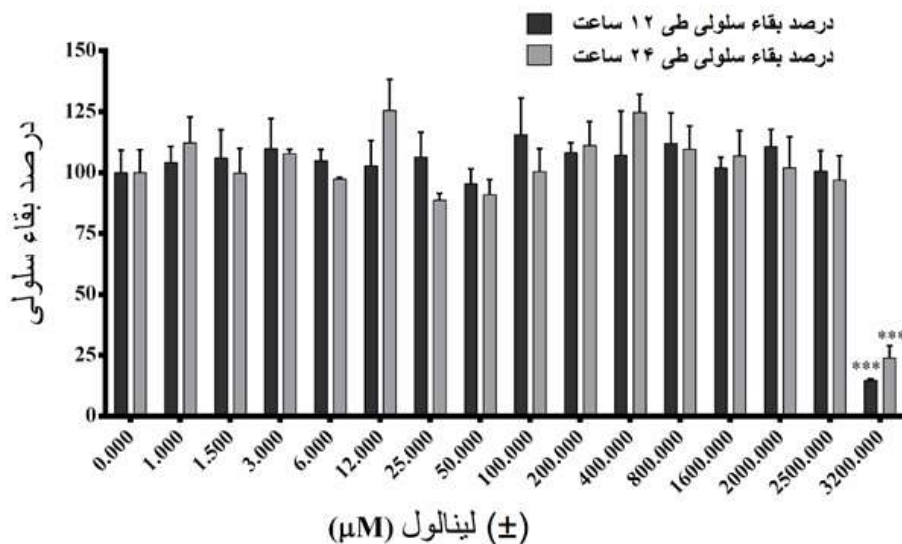
متحد (FAO) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) حداکثر میزان مجاز مصرف روزانه لینالول را 0.5 mg/kg ذکر کرده‌اند (۳).

تماس انسان با لینالول و انانتیوم‌های آن گسترده بوده و نه تنها محصولات آرایشی-بهداشتی، فرآورده‌های غذایی و نوشابه‌ها را در بر می‌گیرد، بلکه شامل تماس با آن به صورت طبیعی از طریق میوه جات و ادویه جات نیز می‌باشد. تخمین زده می‌شود که میزان تماس روزانه با لینالول و انانتیوم‌های آن حدود $140 \mu\text{g/kg}$ می‌باشد (تقریباً یک چهارم حداکثر میزان مجاز مصرف روزانه لینالول). اگرچه لینالول دارای سیکل کبدی و روده‌ای است، اما به دلیل دفع نسبتاً سریع از طریق ادرار (به دنبال کونژوگاسیون با گلوکورونیک اسید) و نیز به صورت استنشاقی، در بدن تجمع نمی‌یابد (۴). اثرات فارماکولوژی مختلفی شامل ضد تشنج، ضد درد، ضد افسردگی، ضد اضطراب، ضد التهاب و همچنین محافظت کننده عصبی و آنتی اکسیدانی در سیستم عصبی مرکزی برای لینالول در مطالعات آزمایشگاهی اخیر نشان داده شده است. در برخی مطالعات، اثرات بیولوژیکی لینالول راسمیک از جمله اثرات آرامبخشی به $(-)-(R)$ لینالول نسبت داده شده است (۱). به علاوه، لینالول (80 ، 40 و $20 \mu\text{M}$) موجب توقف سیکل سلولی در منطقه Sub-G1 و نتیجتاً آسیب DNA در سلول‌های سرطانی پروستات شده است. اثرات پیش-آپتوزی لینالول در رده سلول‌های لوسمی نیز گزارش شده است (۵).

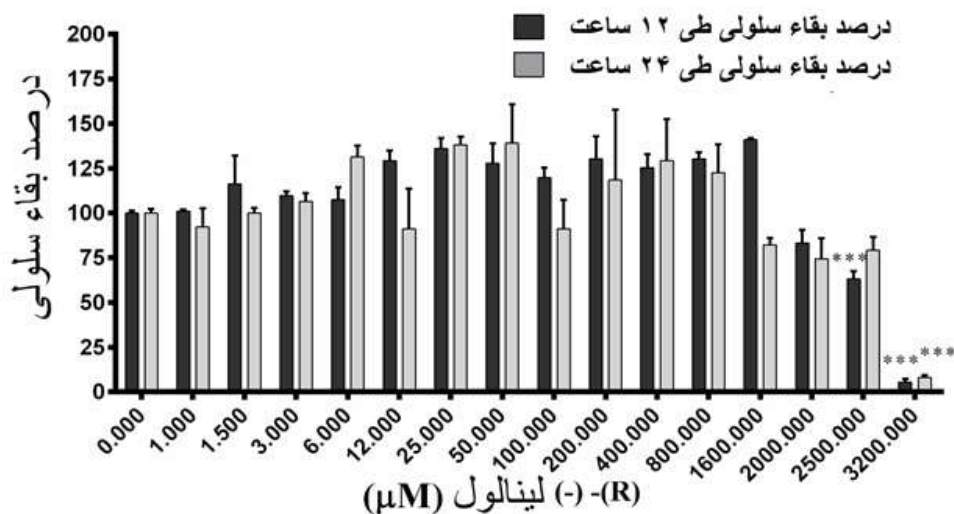
مطالعات سم شناسی یک بخش ضروری در روند تبدیل داروهای گیاهی به محصول دارویی می‌باشد (۶). با توجه به داده‌های ناکافی در خصوص سمیت لینالول و انانتیومر چپ گرد آن (۷)، در این مطالعه بر آن شدیم تا سمیت سلولی و ژنومی لینالول را در سلول‌های عصبی PC12 (مشتق از فنوکروموسایتومای رت) با استفاده از آزمون‌های MTT و comet (کامت) بررسی نماییم. همچنین مقایسه‌ای میان لینالول راسمیک و انانتیومر آن در القای این اثرات در این سلول‌ها انجام گرفت.

ترتیب $5440 \mu\text{M}$ و $2700 \mu\text{M}$ با $(R)-(-)$ لینالول $0.40 \mu\text{M}$ و 2600 تخمین زده شد (تصویر شماره ۲).

موجب $36/8$ درصد کاهش در بقای سلول‌ها شد. شاخص IC_{50} متعاقب 12 و 24 ساعت انکوباسیون با $(\pm)$ لینالول به



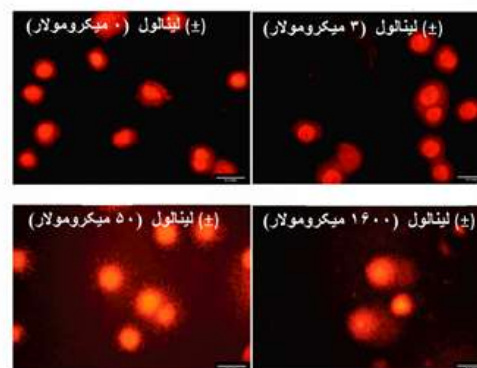
تصویر شماره ۱: بررسی اثر $(\pm)$ لینالول بر بقای سلول‌های PC12. سلول‌های PC12 با غلظت‌های افزایشی $(\pm)$ لینالول به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شده و سپس میزان بقای سلولی با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده‌اند ($n=9$). جهت آنالیز آماری از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و جهت مقایسه بین گروهی از تست تعقیبی Tukey-Karmer استفاده شد. ***: $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل (غلظت صفر لینالول).



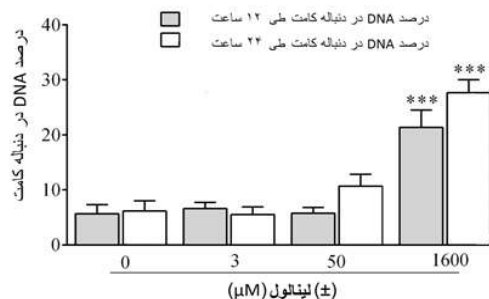
تصویر شماره ۲: بررسی $(R)-(-)$ لینالول بر بقای سلول‌های PC12. سلول‌های PC12 با غلظت‌های افزایشی $(R)-(-)$ لینالول به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شده و سپس میزان بقای سلولی با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده‌اند ($n=9$). جهت آنالیز آماری از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و جهت مقایسه بین گروهی از تست تعقیبی Tukey-Karmer استفاده شد. ***: $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل (غلظت صفر لینالول).

همان‌طور که در تصاویر شماره ۳ و ۴ نشان داده شده است، آسیب DNA به صورت درصد محتوی DNA در دنباله کامت (درصد DNA tail) پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت مواجهه با لینالول ($\pm$) لینالول تا $21/36 \pm 3/1$ و $27/27 \pm 6/2$ و $21/3 \pm 2$ افزایش یافت ($P < 0/001$).

A



B

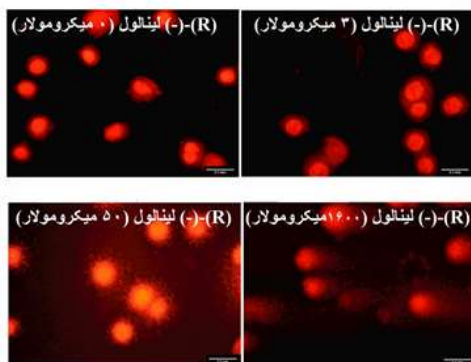


تصویر شماره ۳: بررسی اثر ($\pm$) لینالول بر میزان آسیب DNA در سلول های PC12. سلول های PC12 با غلظت های افزایشی ($\pm$) لینالول به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شده و سپس میزان آسیب DNA به صورت درصد محتوی DNA در دنباله کامت (DNA tail %) با استفاده از آزمون کامت بررسی شد. داده ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده اند ($n=9$). جهت آنالیز آماری از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و جهت مقایسه بین گروهی از تست تعقیبی Tukey-Karmer استفاده شد. ***: $P < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل (غلظت صفر لینالول).

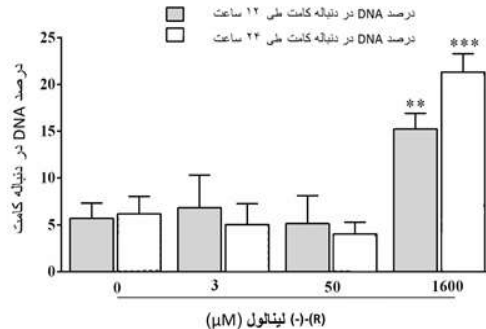
در این مطالعه، سمیت احتمالی لینالول در سلول های PC12 به صورت برون تنی ارزیابی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که لینالول و بخصوص با انانتیومر چپ گرد آن

در غلظت های بالا (بیش تر از $2600 \mu\text{M}$) به صورت معنی داری میزان بقای سلولی را کاهش داده و موجب آسیب بارز ژنومی می شوند. همچنین، بر اساس IC_{50} محاسبه شده، سمیت بیش تر لینالول چپ گرد نسبت به فرم راسمیک پیشنهاد می شود. خصوصیات سم شناسی عمومی لینالول پیش تر شرح داده شده است. LD_{50} لینالول در جوندگان براساس یافته های مطالعات سم شناسی حاد، متعاقب تجویز خوراکی، تزریق داخل صفاقی و زیرپوستی به ترتیب حدود ۲۲۰۰، ۱۴۷۰ و 2000 mg/kg گزارش شده است (۲).

A



B



تصویر شماره ۴: بررسی اثر ($\pm$) لینالول بر میزان آسیب DNA در سلول های PC12. سلول های PC12 با غلظت های افزایشی ($\pm$) لینالول به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شده و سپس میزان آسیب DNA به صورت درصد محتوی DNA در دنباله کامت (DNA tail %) با استفاده از آزمون کامت بررسی شد. داده ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده اند ($n=9$). جهت آنالیز آماری از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و جهت مقایسه بین گروهی از تست تعقیبی Tukey-Karmer استفاده شد. ***: $P < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل (غلظت صفر لینالول).

Politano و همکاران نیز اثرات سمی لینالول بر تولیدمثل و تکامل جنین را در رت بررسی کردند. حداکثر دوز لینالول که فاقد اثرات سمی (NOEL) بر مادر و جنین می باشد به ترتیب حدود ۵۰۰ و ۱۰۰۰ mg/kg تعیین شد (۹).

مطالعه فارماکوکینتیک لینالول در رت نشان داد که تجویز لینالول با دوز ۲۹ mg/kg، غلظتی معادل ۲۱۰ nM در پلاسما ایجاد می کند (۱۰). لذا به نظر می رسد غلظت های به کار رفته در این مطالعه قابل مقایسه با تجویز دوزهای سمی لینالول باشد. Sun و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که لینالول (۲۰، ۴۰، ۸۰ μ M) موجب مهار رشد سلول های سرطانی پروستات و القای مرگ سلولی آپتوزی در این سلول ها شده است (۵). Rodenak-Kladniew و همکاران نشان دادند که لینالول (۵/۲-۲۰ mM) به صورت وابسته به دوز موجب مهار تکثیر سلولی از طریق القای آپتوز و قطعه قطعه شدن DNA در سلول های کبدی Hep-G2 شده است (۱۱). در مطالعه ای دیگر، بقای سلول های اندوتلیال و فیبروبلاست پس از مواجهه با لینالول در محدوده غلظتی ۵/۷-۱۶ mM به میزان قابل توجهی کاهش یافت (۱۲).

القای سمیت سلولی توسط لینالول و نانوذره های آن (۲۰۰-۱۶۰۰ μ M)، در سلول های فیبروبلاست موشی Balb-C 3T3 و سلول های فیبروبلاست ریوی همسترچینی V79 تا ۹۰ و ۷۰ درصد نیز گزارش شده است (۱۳). به علاوه، لینالول راسمیک (شاخص تقسیم هسته ای = ۱۸۱۰ μ M) آسیب کروموزومی را در سلول های فیبروبلاست ریوی همسترچینی V79 القا کرده است (۱۴). این یافته ها، در تایید نتایج مطالعه حاضر، سمیت سلولی و ژنومی لینالول را در سلول های عصبی PC12 تایید می کند.

Di Sotto و همکاران با استفاده از آزمون micronucleus در لنفوسیت های خون محیطی انسان نشان دادند که سمیت ژنومی اسانس لاواندر بطور عمده ناشی از لینالیل استات می باشد. در این مطالعه لینالول با

حداکثر غلظت ۱۰۰ μ g/ml (۶۴۸/۳ μ M) فاقد سمیت ژنومی بارزی بود که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد (۱۵). همچنین در مطالعه ای اخیر، در رت های تیمار شده با (R)-(-) لینالول به صورت خوراکی با دوز ۱۰-۲۰۰ mg/kg آسیب ژنومی بارزی در لنفوسیت های خون محیطی و بافت مغز با استفاده از آزمون کامت قلیایی مشاهده نشد (۱۶). همچنین به دنبال تجویز خوراکی لینالول با دوز های ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg به موش سوری، سمیت ژنومی قابل توجهی در لنفوسیت های خون محیطی با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس مشاهده نشد (۱۷). برخی نتایج متناقض ممکن است ناشی از غلظت های متفاوت، سیستم های سلولی متفاوت و روش های مختلف ارزیابی کننده آسیب ژنومی باشد (۱۸). در حقیقت در این چند مطالعه غلظت های پایینی از لینالول به صورت خوراکی تجویز شده است، که با توجه به فراهمی زیستی پایین و دفع سریع لینالول می تواند مطرح کننده سمیت پایین این ترکیب باشد. در حالی که در مطالعه ما دوز سلول های PC12 با غلظت های بالای لینالول به مدت نسبتاً طولانی (۲۴ ساعت) مواجه شده اند که می تواند در موارد مسمومیت های شدید و حاد با لینالول اتفاق بیفتد.

در نتیجه سمیت ژنومی القا شده توسط لینالول راسمیک و انانتیومر آن در کاهش بقای سلول های PC12 دخالت دارند. انانتیومر چپ گرد لینالول نسبت به نوع راسمیک آن سمیت سلولی بیش تری نشان داد. لازم است مطالعات بیش تری برای شناسایی مکانیسم های دخیل در سمیت ژنومی و سمیت سلولی توسط لینالول، بخصوص انانتیومر چپ گرد آن انجام شود.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (تایید اخلاق پژوهشی به شماره ۹۹/۳۲۷۴۹۰) که حامی مالی این طرح پژوهشی بوده است، تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Sugawara Y, Chihiro Hara C, Tamura K, Fujii T, Nakamura A, Masujima T, Aokic T. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. *Anal Chim Acta* 1998; 365(1-3): 293-299.
2. Letizia CS, Cocchiara J, Lalko J, Api AM. Fragrance material review on linalool. *Food Chem Toxicol* 2003; 41(7): 943-964.
3. Politano VT, Lewis EM, Hoberman AM, Christian MS, Diener RM, Api AM. Evaluation of the developmental toxicity of linalool in rats. *Int J Toxicol* 2008; 27(2): 183-188.
4. Mitić-Ćulafić D, Zegura B, Nikolić B, Vuković-Gaćić B, Knezević-Vukcević J, Filipic M. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. *Food Chemical Toxicol* 2009; 47(1): 260-266.
5. Sun XB, Wang SM, Li T, Yang YQ. Anticancer activity of linalool terpenoid: apoptosis induction and cell cycle arrest in prostate cancer cells. *Trop J Pharm Res* 2015; 14(4): 619-625.
6. Pereira I, Severino P, Santos AC, Silva AM, Souto EB. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2018; 171: 566-578.
7. Wu KM, Ghantous H, Birnkrant DB. Current regulatory toxicology perspectives on the development of herbal medicines to prescription drug products in the United States. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(8): 2606-2610.
8. Api A, Belsito D, Bhatia S, Bruze M, Calow P, Dagli M, Dekant W, Fryer A, Kromidas L, La Cava S. RIFM fragrance ingredient safety assessment, Linalool, CAS registry number 78-70-6. *Food Chem Toxicol* 2015; 82: S29-S38.
9. Rajabian A, Sadeghnia HR, Hosseini A, Mousavi SH, Boroushaki MT. 3Acetyl11ketoβboswellic acid attenuated oxidative glutamate toxicity in neuronlike cell lines by apoptosis inhibition. *J Cell Biochem* 2020; 121(2): 1778-1789.
10. Politano VT, Lewis EM, Hoberman AM, Christian MS, Diener RM, Api AM. Evaluation of the developmental toxicity of linalool in rats. *Int J Toxicol* 2008; 27(2): 183-188.
11. Nöldner M, Germer S, Koch E. Pharmacokinetics of linalool and linalyl acetate, the two main constituents of silexan, an essential oil from *Lavandula angustifolia* flowers, in rats. *Planta Med* 2011; 77(12): PM44.
12. Rodenak-Kladniew B, Castro A, Stärkel P, De Saeger C, de Bravo MG, Crespo R. Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells through oxidative stress generation and modulation of Ras/MAPK and Akt/mTOR pathways. *Life Sci* 2018; 199: 48-59.
13. Prashar A, Locke IC, Evans CS. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif* 2004; 37(3): 221-229.
14. Campos EV, Proença PLF, Oliveira JL, Pereira AES, de Moraes Ribeiro LN, O Fernandes FO, et al. Carvacrol and linalool co-loaded in β-cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles as sustainable biopesticide aiming pest control. *Sci Rep* 2018; 8(1):1-14.

15. Singulani JL, Pedroso RS, Ribeiro AB, Nicolella HD, Freitas KS, Damasceno JL, et al. Mendes-Giannini MJ, Pires RH. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. *Future Microbiol* 2018; 13: 1637-1646.
16. Di Sotto A, Mazzanti G, Carbone F, Hrelia P, Maffei F. Genotoxicity of lavender oil, linalyl acetate, and linalool on human lymphocytes in vitro. *Environ Mol Mutagen* 2011; 52(1), 69-71.
17. Coelho V, Mazzardo-Martins L, Martins DF, Santos ARS, da Silva Brum LF, Picada JN. Pereira P. Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (-)-linalool in mice. *J Nat Med* 2013; 67(4): 876-880.
18. da Silva VA, de Sousa JP, de Paula AFR, Pessoa HdLF, Tavares NdAC, da Cunha SMD, de Oliveira Lima E. Assessment of genotoxic effect of *Ocimum basilicum* L. and Linalool. *Res Soc Dev* 2020; 9(9): e07996127.