بررسی خصوصیات ضداکسیدانی و ضدمیکروبی نانوامولسیون سنتز شده توسط اسانس گیاه درمنه در شرایط آزمایشگاهی(In- Vitro)

محجوبه ایرانی[1]، مسعود همایونی تبریزی[2*]، توران اردلان[3]

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰۸/۱۷ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۱۲/۲۰

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: با توجه به تهدید سلامت انسان با بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو و بیماری‌های عفونی، امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی و ایجاد تغییراتی در آن‌ها به‌منظور بهبود اثربخشی آن‌ها موردتوجه بسیاری گرفته است. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی نانوامولسیون تهیه شده از اسانس درمنه بود.

مواد و روش‌ها: نانوامولسیون با روش اولتراسوند و با فرمولاسیون ۹ میلی‌لیتر توئین ۸۰، ۱ میلی‌لیتر پلی‌اتیلن گلیکول، ۳ میلی‌لیتر اسانس درمنه و ۸۷ میلی‌لیتر آب مقطر سنتز شد. فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون با استفاده از روش‌های مختلف بیوشیمیایی مانند DPPH (۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل) و ABTS (۲،۲-آزینوبیس (۳-اتیل بنزوتیازولین ۶-سولفونیک اسید) موردبررسی قرار گرفت و در ادامه فعالیت ضد باکتریایی نانوامولسیون نیز با روش انتشار دیسک ارزیابی شد.

یافته‌ها: داده‌های حاصل از این بررسی نشان داد نانوامولسیون سنتز شده توسط اسانس گیاه درمنه دارای پتانسیل بالایی برای مهار رادیکال‌های DPPH (IC50=80µg/ml) و ABTS((IC_{50}= 79µg/ml) می‌باشد. ارزیابی اثر ضد میکروبی این فرمولاسیون، توانایی آن در مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم رشد حدود ۱۰ میلی‌متر را تأیید نمود.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، نانوامولسیون درمنه می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک ایمن، طبیعی و مؤثر برای عفونت‌های باکتریایی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شود و علاوه بر آن می‌توان از این فرمولاسیون به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدان بالای آن در درمان بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: نانوامولسیون، اسانس گیاه درمنه، آنتی‌اکسیدان، ضد میکروبی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره دوم، ص ۱۴۳-۱۳۴، اردیبهشت ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست‌شناسی، تلفن:۰۵۱۳۸۴۳۵۰۵۰

Email: mhomayouni6@gmail.com

مقدمه

طی چند صدسال گذشته، بیماری‌های عفونی یک مشکل بهداشتی جهانی بوده است، که به‌عنوان تهدیدی برای سلامتی انسان توجه جهانی را به خود جلب کرده است. با توجه به میزان بالای مرگ‌ومیر بیماری‌های عفونی، تحقیقات زیادی در مورد جنبه‌های شناسایی، کنترل، و پیشگیری از آن‌ها انجام شده است (۱). تاکنون، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها نقش مؤثری در درمان بیماری‌های عفونی انسان داشته است (۲). بااین‌حال، استفاده گسترده و بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ظهور مقاومت دارویی، همراه با اثربخشی درمانی محدود شده است (۳). بنابراین، شناسایی عوامل ضد میکروبی جدید برای مقابله با چالش‌های فعلی در درمان بیماری‌های عفونی، که قادر به مهار باکتری‌ها به‌طور مؤثر و با ایمنی زیستی بالا باشد، ضروری است.

[1] گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

[2] گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران (نویسنده مسئول)

[3] گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

به‌طور طبیعی، بسیاری از گیاهان دارای ترکیبات فعال هستند که می‌تواند به‌عنوان سد دفاعی در برابر حمله عوامل بیماری‌زا عمل کند (۴). ترکیبات شیمیایی مشتق شده از گیاهان به‌صورت متابولیت‌های ثانویه، مانند اسانس‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و ترکیبات فنلی به‌طور گسترده به‌عنوان نگه‌دارنده در غذاهای فرآوری شده، داروها، درمان‌های بیولوژیکی و طبیعی موردبررسی قرار گرفته‌اند و توانایی آن‌ها در مهار رشد میکروبی، اکسیداسیون و واکنش‌های آنزیمی در برخی مطالعات گزارش شده است (۵). روغن‌های اساسی ازجمله مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه به شمار می‌رود که از گذشته‌های دور به‌عنوان داروهای ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، تسکین‌دهنده، هضم‌کننده، ادرارآور و همچنین مواد نگه‌دارنده و حشره‌کش‌ها مورداستفاده قرار گرفته است (۶). گزارش‌های زیادی در مورد فعالیت‌های زیستی، ازجمله فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان روغن‌های اساسی گونه‌های مختلف مانند *Arctotis auriculata Jacq*، *Eriocephalus africanus L*، *Artemisia Douglassiana* و *Artemisia annua* و .... وجود دارد (۷).

گیاه درمنه (Artemisia) از خانواده کمپوزیته بوده و گونه‌های مختلف آن دارای فعالیت‌های دارویی، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشند. مطالعات مختلف اثرات آنتی باکتریال بسیار قوی اسانس گیاه درمنه را تأیید و مشخص شده است که در برخی موارد فعالیت ضد میکروبی آن از آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده مانند نالیدیکسیک اسید و جنتامایسین بیشتر می‌باشد (۸، ۹).

باوجود تمام این مزایا، کاربرد درمانی اسانس‌ها به دلیل برخی از ویژگی‌های آن‌ها با محدودیت‌هایی مواجه می‌باشد. این ترکیبات فرار، دارای نیمه‌عمر کوتاه با حلالیت پایین در آب می‌باشند (۱۰)، و از طرفی بسته به پارامترهای محیطی مانند دما، نور و اکسیژن مستعد انجام واکنش‌های شیمیایی ازجمله اکسیداسیون می‌باشند که همین امر منجر به کاهش یا از بین رفتن اثربخشی آن‌ها می‌شود (۱۱). در این راستا، نانوکپسوله کردن اسانس‌ها یکی از بزرگ‌ترین امیدها، برای انتقال و بارگذاری آن‌ها می‌باشد، تهیه چنین فرمولاسیون‌هایی می‌تواند سبب افزایش حلالیت، کاهش نوسانات، بهبود خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، افزایش پایداری و فعالیت‌های زیستی و محافظت از آن‌ها در تعامل با محیط‌زیست گردد (۱۲). لذا این بررسی باهدف بررسی اثرات ضد اکسیدان و ضد باکتریایی نانوامولسیون تهیه شده از گیاه درمنه *Artemisia aucheri Boiss)* انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی و به‌منظور بررسی توان مهاری نانوامولسیون اسانس درمنه بر رادیکال‌های آزاد و همچنین ارزیابی میزان مهار رشد و تکثیر باکتری گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد.

مواد مورداستفاده در این بررسی شامل اسانس درمنه تهیه شده از شرکت طبیب داروی کاشان، توئین ۸۰، اتیلن گلیکول تهیه شده از شرکت مرک آلمان، پودر ABTS، DPPH، گلوتاتیون و پتاسیم پرسولفات تهیه شده از شرکت سیگما و آب مقطر دیونیزه تهیه شده از شرکت بتا ژن مشهد بود.

تهیه نانوامولسیون اسانس گیاه درمنه:

در این بررسی از روش اولتراسونیک با قدرت بالا (۷۵۰ وات) در فرکانس ۲۰ کیلوهرتز برای سنتز نانوامولسیون استفاده شد. برای این منظور، از ۹ میلی‌لیتر سورفکتانت توئین ۸۰، ۱ میلی‌لیتر پلی‌اتیلن گلیکول، ۳ میلی‌لیتر اسانس درمنه و ۸۷ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد و ترکیب حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در امواج فراصوت برای تشکیل نانوقطراتی همگن، پراکنده شد (۱۳).

ارزیابی میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH:

اساس این فن بر مبنای احیای رادیکال‌های آزاد DPPH تولیدشده در شرایط آزمایشگاهی توسط ترکیب آنتی‌اکسیدان می‌باشد. احیای این رادیکال‌های آزاد سبب تغییر رنگ محلول از بنفش به رنگ زرد شده که توسط دستگاه طیف‌سنجی قابل ارزیابی می‌باشد. در حالت کلی DPPH یک رادیکال آزاد با یک الکترون جفت نشده بر روی یکی از اتم‌های پل نیتروژنی می‌باشد و زمانی که در مجاورت یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی قرار می‌گیرد به‌عنوان پذیرنده الکترون عمل کرده، احیاشده و رنگ بنفش تبدیل به رنگ زرد می‌گردد و به دنبال تغییر رنگ میزان جذب در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر کاهش پیدا نموده و به‌این‌ترتیب با توجه به کاهش شدت جذب می‌توان به توان آنتی‌اکسیدان ترکیب موردبررسی پی برد.

به‌منظور بررسی توان مهار رادیکال آزاد DPPH توسط نانوامولسیون درمنه ابتدا رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از حل کردن ۱ میلی‌گرم پودر DPPH در ۱۷ میلی‌لیتر اتانول تولید شد و در ادامه غلظت‌های مختلف نانوامولسیون آماده‌سازی گردید و به هر یک از غلظت‌ها با حجم مساوی رادیکال آزاد DPPH اضافه شد. از نانوامولسیون (بدون اسانس درمنه (رقیق‌شده با اتانول به همراه DPPH به‌عنوان کنترل منفی و از گلوتاتیون با DPPH به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نتایج حاصل از این بررسی به‌صورت IC_{50} بیان شد که نشانگر غلظتی از نانوامولسیون است که توان مهار ۵۰درصد از رادیکال‌های آزاد را دارا می‌باشد (۱۴).

فرمول مورداستفاده عبارت‌اند از: درصد مهار رادیکال آزاد DPPH= OD کنترل-OD نمونه/ OD کنترل ×۱۰۰

ارزیابی میزان مهار رادیکال‌های آزاد ABTS:

فن ارزیابی اثرات مهاری رادیکال آزاد ABTS توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان یک روش ساده و سریع می‌باشد و به دلیل فعال‌تر بودن رادیکال‌های آزاد ABTS نسبت به DPPH و به دنبال آن افزایش سرعت واکنش‌پذیری این روش در بسیاری از مطالعات مورداستفاده قرار می گیرد. برای انجام این روش، ابتدا باید رادیکال‌های آزاد ABTS از طریق اکسیداسیون ABTS توسط پتاسیم پر سولفات تولید شود.

ابتداABTS ۷ میلی مولار تهیه شد و در ادامه به آن پتاسیم پر سولفات اضافه گردید، محلول حاصل ۱۶ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شد و سپس به میزان ۴۰ برابر رقیق‌سازی شد. محلول حاصل به عنوان محلول کاری جهت ارزیابی توان مهار نانوامولسیون استفاده گردید. برای این منظور، غلظت‌های مختلف نانوامولسیون تهیه و سپس به هر یک با حجم برابر محلول حاوی رادیکال آزاد اضافه شد و جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد.. از نانوامولسیون (بدون اسانس درمنه (رقیق‌شده با آب به همراه DPPH به‌عنوان کنترل منفی و از گلوتاتیون با DPPH به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۴). فرمول محاسبه میزان مهار عبارت‌اند از: درصد مهار رادیکال آزاد ABTS = OD کنترل-OD نمونه/ OD کنترل ×۱۰۰

ارزیابی اثر ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس درمنه با روش دیسک انتشاری (disc diffusion):

برای انجام این روش، ابتدا یک یا دو کلونی از باکتری های خالص *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط نوترینت براث استریل کشت داده شد و پس از مدت‌زمان لازم این باکتری‌ها از انکوباتور خارج‌شده و کدورت لوله حاوی کشت باکتری با لوله نیم ماک فارلند مقایسه و یکسان‌سازی شد. جهت آنتی بیوگرام، یک سوآب استریل در نوترینت براث حاوی باکتری رشد یافته وارد و سپس این سوآپ در چند جهت به‌طوری‌که تمام سطح پلیت پر از باکتری شود روی محیط مولر هینتون آگار کشیده شد. سپس دیسک‌های آغشته شده به ۲۰ میکرولیتر نانوامولسیون (از غلظت استوک) و دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با استفاده از پنس استریل در فواصل منظم از یکدیگر بر روی محیط کشت حاوی باکتری قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیت‌های حاوی باکتری از انکوباتور خارج و قطر هاله عدم رشد توسط خط کش و با معیار میلی‌متر اندازه‌گیری شد (۱۵).

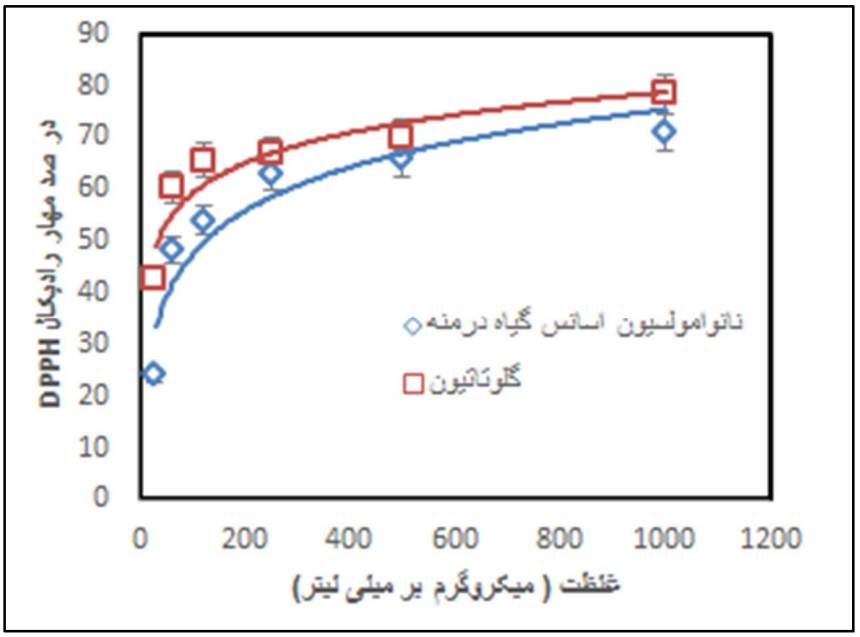
یافته‌ها

مهار رادیکال‌های آزاد DPPH:

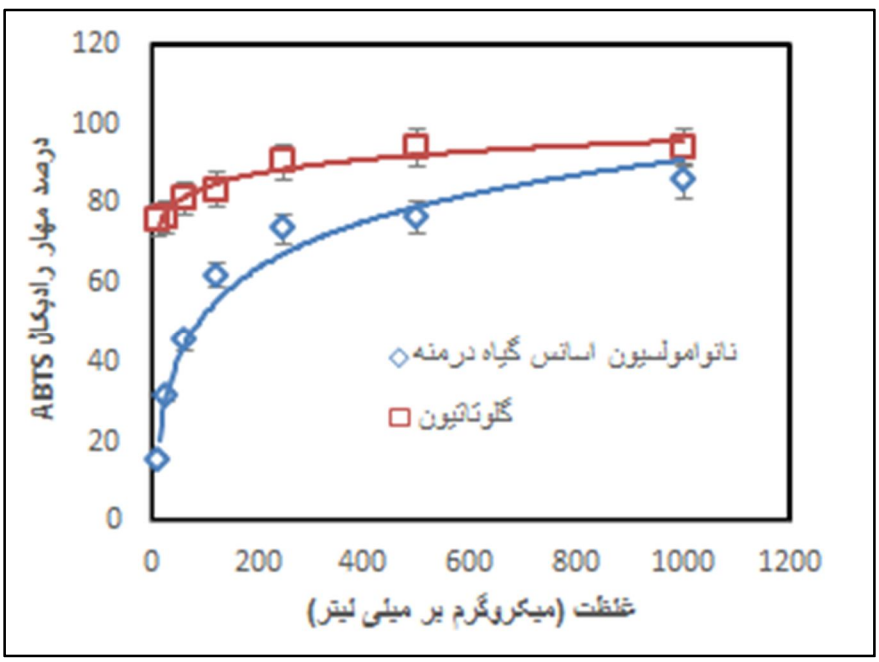
همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با افزایش غلظت نانوامولسیون رابطه مستقیم دارد. به عبارتی با افزایش غلظت تیمار میزان مهار افزایش چشمگیری را نشان می‌دهد به‌طوری‌که میزان مهار در غلظت ۳۰ میکروگرم بر ملی لیتر حدود ۲۳ درصد گزارش شده است و با افزایش غلظت تیمار به ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تقریباً حدود ۷۰درصد از رادیکال‌های آزاد مهار شده‌اند. داده‌ها نشان می‌دهد نانوامولسیون با IC_{50} حدود ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر است رادیکال‌های آزاد DPPH را مهار نماید درحالی‌که گلوتاتیون به‌عنوان کنترل مثبت در غلظت ۴۴،۳۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر حدود ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد را مهار کرده است. مقایسه قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH توسط نانوامولسیون با گلوتاتیون به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان اثرات مهاری بالای نانوامولسیون بر مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را تأیید می‌کند.

مهار رادیکال‌های آزاد ABTS:

شکل ۲ نشان می‌دهد که نانوامولسیون درمنه به‌صورت وابسته به غلظت قادر است رادیکال‌های آزاد ABTS را مهار نماید. میزان IC_{50} محاسبه‌شده ۷۹،۸۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد که نشان می‌دهد نانوامولسیون در غلظت ۷۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر است ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد ABTS را مهار نماید. بررسی غلظت میانه گلوتاتیون در مهار رادیکال‌های آزاد ABTS نشان داد که گلوتاتیون در غلظت < ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به مهار ۵۰درصد رادیکال‌های آزاد می‌باشد. مقایسه میزان مهار نانوامولسیون با گلوتاتیون در غلظت‌های مشابه اثرات پایین‌تر نانوامولسیون را نشان می‌دهد اما در حالت کلی می‌توان گفت نانوامولسیون حاصل دارای اثرات مهاری بالایی بر رادیکال‌های آزاد ABTS می‌باشد. مقایسه میزان مهار رادیکال‌های آزاد ABTS با DPPHنشان می‌دهد که نانوامولسیون اثر مهاری یکسانی بر هر دو رادیکال آزاد داشته و قادر است ۵۰ درصد هر دو رادیکال را در غلظت حدود ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مهار نماید.



نمودار (۱): افزایش میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در معرض غلظت‌های مختلف نانومولسیون در مقایسه با گلوتاتیون به‌عنوان ترکیب آنتی‌اکسیدان.



نمودار (۲): افزایش میزان مهار رادیکال آزاد ABTS در معرض غلظت‌های مختلف نانومولسیون در مقایسه با گلوتاتیون به‌عنوان ترکیب آنتی‌اکسیدان

سنجش فعالیت ضد میکروبی نانومولسیون:

در این بررسی از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌منظور بررسی اثرات ضد میکروبی نانومولسیون درمنه استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است دو دیسک آغشته به نانومولسیون و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با فاصله مناسب از یکدیگر قرار گرفته‌اند و در اطراف دیسک‌ها هاله شفاف مشاهده می‌گردد که نشانگر محدوده عدم رشد باکتری در حضور ترکیب موردبررسی می‌باشد. اندازه‌گیری هاله عدم رشد در این بررسی نشان داد که

دیسک آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین هاله عدم رشد ۱۳ میلی‌متر را ایجاد نموده است درحالی‌که دیسک آغشته به نانوامولسیون درمنه هاله عدم رشد ۱۰ میلی‌متری را ایجاد نموده که نشان‌دهنده اثرات ضد میکروبی نانوامولسیون در مهار سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد.

شکل (۱): فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون در مقایسه با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با هاله عدم رشد به ترتیب ۱۰ و ۱۳ میلی‌متر که نشان‌دهنده اثرات بالای نانوامولسیون در مهار باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

روغن‌های اساسی به دلیل دارا بودن ترکیبات فعال آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی به‌خوبی شناخته شده‌اند و به‌عنوان مواد مؤثر در محصولات غذایی، دارویی و آرایشی به‌طور گسترده‌ای مورداستفاده قرار گرفته‌اند (۱۶). از روغن‌های اساسی (منابع احتمالی مولکول‌های فعال زیستی طبیعی) در سطح جهانی به‌عنوان ترکیبات ضد میکروبی جدید، نگه‌دارنده مواد غذایی و ترکیبات مؤثر برای درمان بیماری‌های عفونی استفاده شده است. در تحقیقات مختلف اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی مانند آویشن، پونه کوهی، میخک و پرتقال و اجزای آن‌ها مانند تیمول، کارواکرول، اوژنول، لیمونن و دارچین نشان داده شده است (۱۷ و ۱۸). علاوه بر این، گیاهان شامل مقدار قابل‌توجهی آنتی‌اکسیدان‌های فیتوشیمیایی مانند فلاوونوئیدها، فنولیک‌ها، کاروتنوئیدها و تانن‌ها هستند که می‌توانند برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد اضافی موجود در بدن استفاده شوند (۱۹). تا کنون اثر آنتی‌اکسیدانی بسیاری اسانس‌ها ازجمله اکالیپتوس (۲۰)، مرزه (۲۱)، گاوا گیلاس (۲۲)، به لیمو و مینتستاچیس مولیس (۲۳)، پونه (۲۴)، میخک (۲۵)، رزماری (۲۶) و .... تأیید شده است. با توجه به اینکه اسانس‌ها توسط FDA (سازمان غذا و داروی آمریکا) وEPA (آژانس حفاظت از محیط‌زیست) به‌عنوان مواد GRAS (عموماً به‌عنوان ایمن شناخته شده) شناخته شده‌اند و از طرفی دارای اثرات دارویی متنوعی می‌باشد به همین دلیل موردتوجه بسیاری از محققین قرار گرفته‌اند (۲۷).

بااین‌حال، حلالیت پایین و نوسانات بالا آن‌ها دو مانع اصلی برای استفاده از این ترکیبات در زمینه‌های دارو و درمان می‌باشد. به همین دلیل، کپسوله کردن این ترکیبات به‌منظور افزایش حلالیت، پایداری و اثربخشی آن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. نانو امولسیون‌ها به‌عنوان یک سیستم انتقال برای داروهای دارای حلالیت پایین در نظر گرفته شده‌اند و با توجه به ابعاد نانومتری و ویژگی‌های منحصر به فرد خود قادر به انتقال ترکیبات دارویی و حفظ آن‌ها از عوامل محیطی و افزایش دسترسی زیستی آن‌ها می‌باشند (۲۸). در مطالعات قبلی از اسانس‌های متنوع گیاهی ازجمله روغن چریش، روغن اوکالیپتوس، روغن آویشن، روغن پوسته آجیل بادام هندی، روغن سیترولا، روغن ریحان، روغن علف لیمو، روغن میخک و روغن مگاپوتامیک برای تهیه نانو امولسیون‌ها استفاده شده است (۲۵، ۲۹-۳۲). در این بررسی از اسانس درمنه به دلیل اثرات دارویی آن برای تهیه نانوامولسیون استفاده شد.

استفاده از نانو امولسیون‌ها به‌عنوان یک ماده ضد میکروبی نوآوری جدید و امیدوارکننده است چرا که این ترکیبات با ایجاد اختلال در غشای بیرونی، اثرات مهاری گسترده‌ای در برابر باکتری‌ها،

ویروس‌های دارای پوشش و قارچها دارند. نانو امولسیون‌ها از نظر ترمودینامیکی برای هم جوشی با غشاهای لیپیدی مناسب می باشندو این همجوشی با جذب الکترواستاتیک بین بار کاتیونی امولسیون و بار آنیونی در پاتوژن افزایش می‌یابد و همین امر منجر به لیز سلولی و مرگ پاتوژن می‌گردد. با توجه به اینکه مکانیسم عملکرد نانو امولسیون‌ها اختلال غیر اختصاصی غشای سلولی باکتریایی است بنابراین نانو امولسیون‌ها منجر به ایجاد سویه‌های مقاوم نمی‌شود و استفاده از آن‌ها به‌عنوان یک عامل ضد میکروبی درمان امیدوارکننده به شمار می‌رود (۳۳).

به همین منظور در این بررسی از نانوامولسیون اسانس درمنه جهت بررسی اثرات مهاری بر رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد و بررسی هاله عدم رشد باکتری اورئوس (10mm) در تیمار با نانوامولسیون در مقایسه با هاله عدم رشد آن در تیمار با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نشان داد که نانوامولسیون تهیه شده اثر مهاری تقریباً مشابهی با آنتی‌بیوتیک را اعمال می‌کند. به‌طور مشابه در مطالعات قبلی اثر مهاری نانوامولسیون تهیه شده از اسانس پونه کوهی (۳۴)، نانوامولسیون آویشن (۳۵) و نانو امولسیون‌های سینامالدهید (۳۶) بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی و تأیید شده است.

از دیگر ویژگی‌های نانوامولسیون ها می‌توان به توان بالای آن‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد اشاره نمود. نتایج بررسی توان آنتی‌اکسیدان نانوامولسیون اسانس درمنه نشان داد که این ترکیب با غلظت حدود ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر است حدود ۵۰درصد از رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH را مهار نماید.

در بررسی انجام شده در سال ۲۰۱۳ ترکیبات موجود در اسانس گیاه درمنه گونه *Artemisia aucheri Boiss* شناسایی و اثرات آنتی باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی آن موردبررسی قرار گرفت. این ترکیبات شامل ρ-سیمن، ۱،۸-سینئول، لینالول، ترنس بتا اوسیمن، گاما ترپینن، دودکان، اکتانول استات، تریئن، بورنئول، لاواندولول و استات بورنیل به‌عنوان ترکیبات مونوترپن و استریم کریزانتنیل، دهیدرو آرومادندرین و کاریوفیلل اکسید به‌عنوان ترکیبات سسکوئیترپن بود. در این بررسی هیچگونه اثر مهاری بر رادیکال‌های آزاد DPPH گزارش نشد درحالی‌که اثر مهاری اسانس مورد نظر بر سویه‌های مختلف باکتریایی تأیید و در این میان وجود هاله عدم رشد ۱۹ میلی‌متری برای باکتری اورئوس در مقابل هاله عدم رشد ۲۱ میلی‌متری جنتامایسین اثرات مهاری این اسانس را بر علیه باکتریهای گرم مثبت تأیید نمود (۳۷). مقایسه اثر اسانس با نانوامولسیون حاصل از اسانس (نتایج مطالعه حاضر) نشان می‌دهد که نانوامولسیون دارای اثرات مشابه با اسانس در مهار باکتری اورئوس می‌باشد درحالی‌که اثرات آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون تهیه شده در این بررسی بسیار بیشتر از خود اسانس به تنهایی می‌باشد. در بررسی‌های مختلف مشابه با مطالعه حاضر به‌منظور بر طرف نمودن محدودیت‌های استفاده از اسانس‌ها، از روش کپسوله کردن و تبدیل آن‌ها به نانوقطرات استفاده نمودند و اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات را بررسی کردند.

در بررسی انجام شده در سال ۲۰۲۰ از روغن بذر کتان جهت سنتز نانوامولسیون استفاده شد و نتایج مطالعه انجام شده نشان داد نانوامولسیون روغن کتان قادر به مهار رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH با غلظت میانه ۳۵۰ و ۲۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد که در مقایسه با نانوامولسیون اسانس درمنه اثرات آنتی‌اکسیدان ضعیف‌تری را نشان می‌دهد. مقایسه هاله عدم رشد باکتری اورئوس در تیمار با نانوامولسیون روغن کتان و نانوامولسیون اسانس درمنه اثرات انتی باکتریایی قوی‌تر نانوامولسیون درمنه را تأیید می‌کند (۱۵).

به‌طور مشابه، میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH **و** ABTS در حضور نانوامولسیون زیره سیاه بررسی و IC_{50} آن به ترتیب ۱۲۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (۱۴) که در مقایسه با مطالعه حاضر، نانوامولسیون زیره سیاه قادر است رادیکال‌های آزاد ABTS را با قدرت بیشتر و رادیکال‌های آزاد DPPH را با توان پایین‌تر مهار نماید.

نتایج بررسی انجام شده در سال ۲۰۱۹، توان مهاری بالای رادیکال‌های آزاد DPPH (IC_{50}: 0.023 µg/ml) و ABTS (IC_{50}: 0.004 µg/ml) توسط نانوامولسیون بره موم (۳۸) را در مقایسه با نانوامولسیون درمنه نشان می‌دهد. به‌طور مشابه در مطالعات مختلف اثرات آنتی‌اکسیدان نانوامولسیون ها بر علیه دو رادیکال آزاد بررسی شده است که قابل مقایسه با مطالعه حاضر می‌باشد. برای مثال نانوامولسیون های تهیه شده از هسته آلبالو (۳۹)، زیره سیاه (۱۴)، عصاره گوجه فرنگی غنی از لیکوپن (۴۰)، زیره سبز (۴۱)، روغن چریش (۴۲) و روغن بذر تمشک قرمز (۴۳) همگی دارای اثرات مهاری بر علیه رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH می‌باشند. همچنین نانوامولسیون گیاه پنج انگشتی (۴۴) و اسانس سیر (۴۵) نیز اثرات مهاری خوبی بر رادیکال‌های آزاد DPPH نشان دادند که قابل مقایسه با مطالعه حاضر می‌باشد. اثرات آنتی‌اکسیدان یا آنتی باکتریایی نانوامولسیون های تهیه شده در مطالعات مختلف بسیار متفاوت می‌باشد و این تفاوت به روش سنتز، مواد به کار رفته در فرمولاسیون، اثرات اسانس مورد استفاده و بسیاری دیگر از فاکتورهای متغیر ارتباط دارد و بررسی و بهینه سازی فاکتورهای دخیل می‌تواند دستیابی به فرمولاسیون‌های بهینه را امکان پذیر سازد. اگر چه استفاده از نانوامولسیون ها نیز به دلیل تغییر میزان پایداری آن‌ها در طی زمان ذخیره سازی محدودیت‌هایی برای

استفاده از آن‌ها ایجاد می‌کند ولی با این وجود تهیه فرمولاسیون‌های مختلف می‌تواند بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی، اثرات بیولوژیک و همچنین بر پایداری آن‌ها مؤثر باشد.

پتانسیل بالای نانوامولسیون برای مهار رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH با IC_{50} حدود ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد و مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور نانوامولسیون تاییدی بر اثرات آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی نانوامولسیون موردبررسی است و این ویژگی‌ها، فرمولاسیون تهیه شده را به یک گزینه جذاب برای مطالعات بالینی تبدیل می‌کند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در آزمایشگاه گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شد. بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر خود را اعلام می‌دارند.

تمامی آزمایش‌های این تحقیق با رعایت موازین اخلاقی و طبق تأیید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی با شناسه مصوبه IR.IAU.MSHD.REC.1399.147 انجام شد.

حامی مالی:

این تحقیق هیچ کمک مالی خاصی از سازمان‌های تأمین مالی بخش‌های دولتی، تجاری یا غیر انتفاعی دریافت نکرده است.

References:

1. Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, Hanson KE, May L, Quinn TC, et al. Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. Clin Infect Dis 2013;57(suppl_3):S139-S70.
2. Nigam A, Gupta D, Sharma A. Treatment of infectious disease: beyond antibiotics. Microbial Res 2014;169(9-10):643-51.
3. Marianne Frieri K, Boutin A. Antibiotic resistance. JInfect 2017;10:369-78.
4. Sundararajan B, Moola AK, Vivek K, Kumari BR. Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of Ocimum basilicum L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (Culex quinquefasciatus). Microb Pathog 2018;125:475-85.
5. Singh G, Kapoor I, Singh P, de Heluani CS, de Lampasona MP, Catalan CA .Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of Zingiber officinale. Food Chem Toxicol 2008;46(10):3295-302.
6. Pavela R, Benelli G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. Trends Pharmacol Sci 2016;21(12):1000-7.
7. Asghari G, Jalali M, Sadoughi E. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from the seeds of Artemisia aucheri Boiss. Jundishapur J Nat. Pharm Prod 2012;7(1):11.
8. Bagheri R, Chaichi M, Mohseni-Saravi M, Amin G, Zahedi G. Grazing affects essential oil compositions of Artemisia sieberi Besser. Pak J Biol Sci: PJBS 2007;10(5):810-3.
9. Behmanesh B, Heshmati G, Mazandarani M, Rezaei M, Ahmadi A, Ghaemi E, et al. Chemical composition and antibacterial activity from essential oil of Artemisia sieberi Besser subsp. Sieberi in North of Iran. Asian J Plant Sci 2007; 6: 562-4.
10. Pavoni L, Benelli G, Maggi F, Bonacucina G. Green nanoemulsion interventions for biopesticide formulations. In: Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives Elsevier; 2019. P. 133-60.
11. Pavoni L, Perinelli DR, Bonacucina G, Cespi M, Palmieri GF. An Overview of Micro-and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. J Nanomater 2020;10(1):135.
12. Perlatti B, de Souza Bergo PL, Fernandes JB, Forim MR. Polymeric nanoparticle-based insecticides: a controlled release purpose for agrochemicals. Insecticides-Development of safer and more effective technologies. IntechOpen; 2013.
13. Khatamian N, Homayouni Tabrizi M, Ardalan P, Yadamani S, Darchini Maragheh A. Synthesis of Carum Carvi essential oil nanoemulsion, the cytotoxic effect, and expression of caspase 3 gene. J Food Biochem 2019;43(8):e12956.
14. Khatamian N, Homayouni Tabrizi M, Ardalan P. Effect of carum carvi essential oil nanoemulsion on tubo cancer cells and L929 normal cells and evaluation

of antioxidant activity. Stud Med Sci 2019;30(4):315-21.

15. Keykhasalar R, Homayouni Tabrizi M, Ardalan P. Antioxidant Property and Bactericidal Activity of Linum usitatissimum Seed Essential Oil Nanoemulsion (LSEO-NE) on Staphylococcus aureus. Int J Infect 2020; 7(2):e101639.
16. Jin W, Xu W, Liang H, Li Y, Liu S, Li B. Nanoemulsions for food: properties, production, characterization, and applications. Emulsions: Elsevier; 2016. P. 1-36.
17. Hadadi Z, Nematzadeh GA, Ghahari S. A study on the antioxidant and antimicrobial activities in the chloroformic and methanolic extracts of 6 important medicinal plants collected from North of Iran. BMC Chem 2020;14:1-11.
18. Alexandre EMC, Lourenço RV, Bittante AMQB, Moraes ICF, do Amaral Sobral PJ. Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications. Food Packag Shelf Life2016;10:87-96.
19. Kumar M, Chandel M, Kumar S, Kaur S. Studies on the antioxidant/genoprotective activity of extracts of Koelreuteria paniculata laxm. Am J Biomed Sci 2012;1:177-89.
20. Safaei-Ghomi J, Abbasi-Ahd A, Behpour M, Batooli H. Antioxidant activity of the essential oil and metanolic extract of Eucalyptus largiflorens and Eucalyptus intertexta from central Iran. J Essent Oil-Bear Plants 2010;13(3):377-84.
21. Fathi A, Sahari M, Barzegar M, Naghdi Badi H. Antioxidant activity of Satureja hortensis L. essential oil and its application in safflower oil. J Med Plants 2013;1(45):51-67.
22. Scur M, Pinto F, Pandini J, Costa W, Leite C, Temponi L. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of Psidium cattleianum Sabine. Braz J Biol2016;76(1):101-8.
23. Olmedo R, Ribotta P, Grosso NR. Antioxidant activity of essential oils extracted from Aloysia triphylla and Minthostachys mollis that improve the oxidative stability of sunflower oil under accelerated storage conditions. Eur J Lipid Sci Tech 2018;120(8):1700374.
24. Shams Moattar F, Sariri R, Giahi M, Yaghmaee P. Essential oil composition and antioxidant activity of Calamintha officinalis Moench. Appl Biotechnol Rep 2018;5(2):55-8.
25. Anwer MK, Jamil S, Ibnouf EO, Shakeel F. Enhanced antibacterial effects of clove essential oil by nanoemulsion. J Oleo Sci 2014:ess13213.
26. Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coïsson JD, Arlorio M, et al. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of Rosmarinus officinalis L. J Agric Food Chem 2004;52(11):3530-5.
27. Miresmailli S, Isman MB. Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions. Trends Plant Sci 2014;19(1):29-35.
28. Zorzi GK, Caregnato F, Moreira JCF, Teixeira HF, Carvalho ELS. Antioxidant effect of nanoemulsions containing extract of Achyrocline satureioides (Lam) DC—Asteraceae. AAPS PharmSciTech. 2016;17(4):844-50.
29. Anjali C, Sharma Y, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Neem oil (Azadirachta indica) nanoemulsion—a potent larvicidal agent against Culex quinquefasciatus. Pest Manag Sci2012;68(2):158-63.
30. Pant M, Dubey S, Patanjali P, Naik S, Sharma S. Insecticidal activity of eucalyptus oil nanoemulsion with karanja and jatropha aqueous filtrates. Int Biodeter Biodegr 2014;91:119-27.
31. Salvia-Trujillo L, Rojas-Graü A, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. Physicochemical characterization of lemongrass essential oil–alginate nanoemulsions: effect of ultrasound processing parameters. Food Bioproc Tech 2013;6(9):2439-46.

32. Ghosh V, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Formulation and characterization of plant essential oil based nanoemulsion: evaluation of its larvicidal activity against Aedes aegypti. Asian J Chem 2013;25(Supplementary Issue):S321.
33. Pandya S. Nanoemulsion and their antimicrobial activity. Researchgate publications 2015.
34. Moraes-Lovison M, Marostegan LF, Peres MS, Menezes IF, Ghiraldi M, Rodrigues RA, et al. Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté. LWT 2017;77:233-40.
35. Patel A, Ghosh V. Thyme (Thymus vulgaris) Essential Oil–Based Antimicrobial Nanoemulsion Formulation for Fruit Juice Preservation. In:Biotechnological Applications in Human Health. Springer; 2020. P. 107-14.
36. Otoni CG, de Moura MR, Aouada FA, Camilloto GP, Cruz RS, Lorevice MV, et al. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. Food Hydrocoll 2014;41:188-94.
37. Bidgoli RD, Ebrahimabadi A, Heshmati G, Pessarakli M. Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of Artemisia aucheri Boiss. From Iran Curr Res Chem 2013;5:1-10.
38. Seibert JB, Bautista-Silva JP, Amparo TR, Petit A, Pervier P, dos Santos Almeida JC, et al. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. Food Chem 2019;287:61-7.
39. Darchini Maragheh A, Homayouni Tabrizi M, Karimi E. Evaluation of antioxidant and cytotoxic effects of nanoemulsion of cherry kernel oil on A549 lung cancer and HUVEC normal cells. Jundishapur J Health Sci 2019;18(1):71-9.
40. Ha TVA, Kim S, Choi Y, Kwak H-S, Lee SJ, Wen J, et al. Antioxidant activity and bioaccessibility of size-different nanoemulsions for lycopene-enriched tomato extract. Food Chem 2015;178:115-21.
41. Allahghadri T, Rasooli I, Owlia P, Nadooshan MJ, Ghazanfari T, Taghizadeh M, et al. Antimicrobial property, antioxidant capacity, and cytotoxicity of essential oil from cumin produced in Iran. J Food Sci 2010;75(2:(H54-H61.
42. Rinaldi F, Hanieh PN, Longhi C, Carradori S, Secci D, Zengin G, et al. Neem oil nanoemulsions: characterisation and antioxidant activity. J Enzyme Inhib Med Chem 2017;32(1):1265-73.
43. Gledovic A, Janosevic Lezaic A, Krstonosic V, Djokovic J, Nikolic I, Bajuk-Bogdanovic D, et al. Low-energy nanoemulsions as carriers for red raspberry seed oil: Formulation approach based on Raman spectroscopy and textural analysis, physicochemical properties, stability and in vitro antioxidant/biological activity. PLoS One 2020;15(4):e0230993.
44. Balasubramani S, Rajendhiran T, Moola AK, Diana RKB. Development of nanoemulsion from Vitex negundo L. essential oil and their efficacy of antioxidant, antimicrobial and larvicidal activities (Aedes aegypti L.). Environ Sci Pollut Res Int 2017;24(17):15125-33.
45. Hasssanzadeh H, Alizadeh M, Bari MR. Formulation of garlic oil-in-water nanoemulsion: antimicrobial and physicochemical aspects. IET nanobiotechnol 2018;12(5):647-52.

Original Article

EVALUATION OF IN VITRO ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF NANOEMULSIONS SYNTHESIZED BY *ARTEMISIA AUCHERI BOISS* ESSENTIAL OIL

Mahjobe Irani[1], Masoud Homayouni Tabrizi [2*], Touran Ardalan[3]

Received: 07 October 2020; Accepted: 10 March, 2021

Abstract

Background & Aims: Due to the threat to human health with diseases related to oxidative stress and infectious diseases, today the use of natural compounds and changes in them to improve their effectiveness has received much attention. The aim of this study was to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of nanoemulsions prepared from *Artemisia* ***aucheri*** *Boiss* essential oil (AABEO-NE).

Materials & Methods: The AABEO-NE was synthesized by ultrasound method and formulated with 9 ml of Tween 80, 1 ml of polyethylene glycol, 3 ml of Artemisia essential oil, and 87 ml of distilled water. The antioxidant activities of nanoemulsions were investigated using various biochemical methods such as DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) and ABTS (2,2-azinobis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid). Then, the antibacterial activity of nanoemulsion was evaluated by the disk diffusion (DD) method.

Results: The data obtained from this study showed that nanoemulsions synthesized by Artemisia essential oil have a high potential for inhibiting DPPH radicals (IC50 = 80µg / ml) and ABTS (IC50 = 79µg / ml). The existence of a growth inhibition zone (10mm) in the sample treated with AABEO-NE confirmed the antibacterial effects of AABEO-NE

Conclusion: According to the results, AABEO-NE can be used as a safe, natural, and effective antibiotic for bacterial infections caused by S. aureus and also, this formulation can be used due to its high antioxidant effects in the treatment of diseases related to oxidative stress.

Keywords: *Nanoemulsion, Artemisia essential oil, Antioxidant, Antimicrobial*

Address: Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
Tel: +985138435050
E-mail: mhomayouni6@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2021: 32(2): 143 ISSN: 2717-008X

[1] *Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran*

[2] *Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran (Corresponding author)*

[3] *Department of Chemistry, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran*