

## بررسی خصوصیات ضد اکسیدانی و ضد میکروبی نانوامولسیون سنتز شده توسط اسانس گیاه درمنه در شرایط آزمایشگاهی (In-Vitro)

محجوبه ایرانی<sup>۱</sup>، مسعود همایونی تبریزی<sup>۲</sup>، توران اردلان<sup>۳</sup>

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 به منظور بهبود اثربخشی آن‌ها مورد توجه 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 (۱۰۱-دی فنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل) و ABTS (۲،۲-آزینوبیس (۳-اتیل بنزوتیازولین ۶-سولفونیک اسید) مورد بررسی 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 ( $IC_{50}=80\mu g/ml$ ) و ABTS ( $IC_{50}=79\mu g/ml$ ) 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 ۱۴۳-۱۴۴، اردیبهشت ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست‌شناسی، تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۵۰۵

Email: mhomayouni6@gmail.com

### مقدمه

بیماری‌های عفونی انسان داشته است (۲). با این حال، 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.

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

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۳</sup> گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی و به منظور بررسی توان مهوری نانومولسیون اسانس درمنه بر رادیکال‌های آزاد و همچنین ارزیابی میزان مهور رشد و تکثیر باکتری گونه/استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد.

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

#### تهیه نانومولسیون اسانس گیاه درمنه:

در این بررسی از روش اولتراسونیک با قدرت بالا (۷۵۰ وات) در فرکانس ۲۰ کیلوهرتز برای سنتز نانومولسیون استفاده شد. برای این منظور، از ۹ میلی‌لیتر سورفکتانت تویین 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 مهور 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 طول موج ۵۱۷ نانومتر کاهش پیدا نموده و به این ترتیب با توجه به کاهش شدت جذب می‌توان به توان آنتی‌اکسیدان ترکیب مورد بررسی پی برد.

به منظور بررسی توان مهور رادیکال‌های آزاد DPPH توسط نانومولسیون 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 نانومولسیون آماده‌سازی گردید و به هر یک از غلظت‌ها با حجم مساوی رادیکال‌های آزاد DPPH اضافه شد. از نانومولسیون (بدون اسانس درمنه) رقیق‌شده با اتانول به همراه DPPH به‌عنوان کنترل منفی و از گلوکاتینون با DPPH به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نتایج حاصل از این بررسی به‌صورت IC<sub>50</sub> بیان شد که نشانگر غلظتی از نانومولسیون است که توان مهور ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد را دارا می‌باشد (۱۴).

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 مورد بررسی قرار گرفته‌اند و توانایی آن‌ها در مهور رشد میکروبی، اکسیداسیون و واکنش‌های آنزیمی در برخی مطالعات گزارش شده است (۵). روغن‌های اساسی از جمله مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه به شمار می‌رود که از گذشته‌های دور به‌عنوان داروهای ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، تسکین‌دهنده، هضم‌کننده، ادرار آور و همچنین مواد نگه‌دارنده و حشره‌کش‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۶). گزارش‌های زیادی در مورد فعالیت‌های زیستی، از جمله فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان روغن‌های اساسی گونه‌های مختلف مانند *Eriocephalus Arctotis auriculata Jacq* و *Artemisia Dougllassiana africanus L annua* و .... وجود دارد (۷).

گیاه درمنه (*Artemisia*) از خانواده کمیوزیته بوده و گونه‌های مختلف آن دارای فعالیت‌های دارویی، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشند. مطالعات مختلف اثرات آنتی‌باکتریال بسیار قوی اسانس گیاه درمنه را تأیید و مشخص شده است که در برخی موارد فعالیت ضد میکروبی آن از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده 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 از جمله 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 نانومولسیون تهیه شده از گیاه درمنه (*Artemisia aucheri Boiss*) انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

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 به طوری که 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 ۷۰ درصد 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 گلوکاتایون به‌عنوان کنترل مثبت در غلظت ۴۴،۳۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر حدود ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد را مهار کرده است. مقایسه قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط نانوامولسیون با گلوکاتایون به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان اثرات مهار بالایی 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 گلوکاتایون در مهار رادیکال‌های آزاد ABTS نشان داد که گلوکاتایون در غلظت  $> 10$  میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد می‌باشد. مقایسه میزان مهار نانوامولسیون با گلوکاتایون در غلظت‌های مشابه اثرات پایین‌تر نانوامولسیون را نشان می‌دهد اما در حالت کلی می‌توان گفت نانوامولسیون حاصل دارای اثرات مهار بالایی بر رادیکال‌های آزاد ABTS می‌باشد. مقایسه میزان مهار رادیکال‌های آزاد ABTS با DPPH نشان می‌دهد که نانوامولسیون اثر مهار 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.

فرمول مورد استفاده عبارت‌اند از: درصد مهار رادیکال آزاد  $OD = DPPH$  - کنترل / نمونه  $OD$  کنترل  $\times 100$

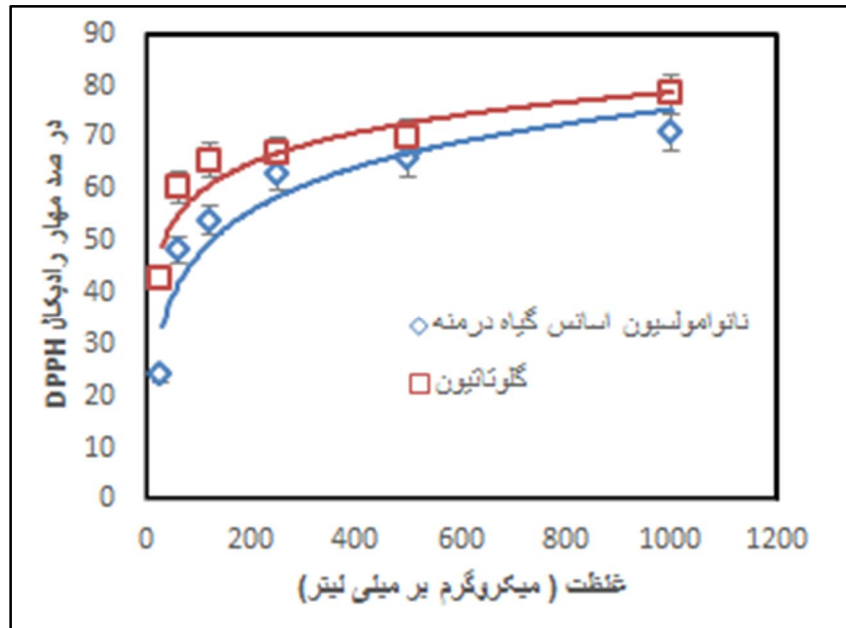
#### ارزیابی میزان مهار رادیکال‌های آزاد ABTS

فن ارزیابی اثرات مهار رادیکال‌های 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 مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای انجام این روش، ابتدا باید رادیکال‌های آزاد ABTS از طریق اکسیداسیون ABTS توسط پتاسیم پر سولفات تولید شود.

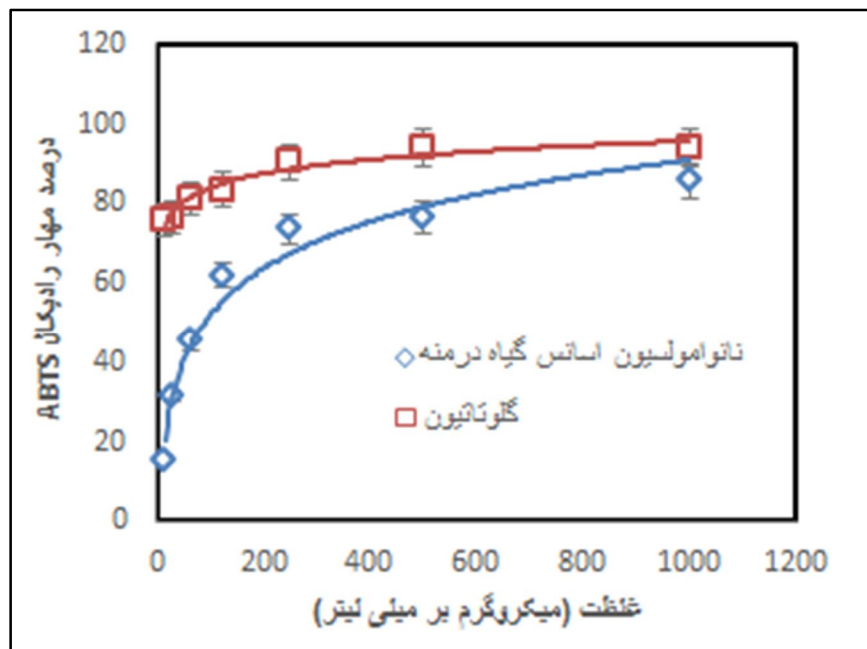
ابتدا ABTS ۷ میلی مولار تهیه شد و در ادامه به آن پتاسیم پر سولفات اضافه گردید، محلول حاصل ۱۶ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شد و سپس به میزان ۴۰ برابر رقیق‌سازی شد. محلول حاصل به عنوان محلول کاری جهت ارزیابی توان مهار نانوامولسیون استفاده گردید. برای این منظور، غلظت‌های مختلف نانوامولسیون تهیه و سپس به هر یک با حجم برابر محلول حاوی رادیکال‌های آزاد اضافه شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. از نانوامولسیون (بدون اسانس درمنه رقیق شده با آب به همراه DPPH به‌عنوان کنترل منفی و از گلوکاتایون با DPPH به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۴)). فرمول محاسبه میزان مهار عبارت‌اند از: درصد مهار رادیکال‌های آزاد  $OD = ABTS$  - کنترل / نمونه  $OD$  کنترل  $\times 100$

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

برای انجام این روش، ابتدا یک یا دو کلونی از باکتری‌های خالص استافیلوکوکوس اورئوس در محیط نوترینت برات 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 برات حاوی باکتری رشد یافته وارد و سپس این سوآب در چند جهت به طوری که 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



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



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

نانوآمولسیون 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 مورد بررسی می‌باشد. اندازه‌گیری هاله عدم رشد در این بررسی نشان داد که

#### سنجش فعالیت ضد میکروبی نانوآمولسیون:

در این بررسی از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌منظور بررسی اثرات ضد میکروبی نانوآمولسیون درمنه استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است دو دیسک آغشته به

دیسک آنتی بیوتیک آمپی سیلین هاله عدم رشد ۱۳ میلی متر را ایجاد نموده است در حالی که دیسک آغشته به نانوامولسیون درمنه هاله عدم رشد ۱۰ میلی متری را ایجاد نموده که نشان دهنده اثرات

ضد میکروبی نانوامولسیون در مهار سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد.



**شکل (۱):** فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون در مقایسه با آنتی بیوتیک آمپی سیلین با هاله عدم رشد به ترتیب ۱۰ و ۱۳ میلی متر که نشان دهنده اثرات بالای نانوامولسیون در مهار باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد.

## بحث و نتیجه گیری

روغن های اساسی به دلیل دارا بودن ترکیبات فعال آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی به خوبی شناخته شده اند و به عنوان مواد مؤثر در محصولات غذایی، دارویی و آرایشی به طور گسترده ای مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۶). از روغن های اساسی (منابع احتمالی مولکول های فعال زیستی طبیعی) در سطح جهانی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی جدید، نگه دارنده مواد غذایی و ترکیبات مؤثر برای درمان بیماری های عفونی استفاده شده است. در تحقیقات مختلف اثرات ضد باکتریایی اسانس های گیاهی مانند آویشن، پونه کوهی، میخک و پرتقال و اجزای آن ها مانند تیمول، کارواکرول، اوژنول، لیمونن و دارچین نشان داده شده است (۱۷ و ۱۸). علاوه بر این، گیاهان شامل مقدار قابل توجهی آنتی اکسیدان های فیتوشیمیایی مانند فلاونوئیدها، فنولیک ها، کاروتنوئیدها و تانن ها هستند که می توانند برای از بین بردن رادیکال های آزاد اضافی موجود در بدن استفاده شوند (۱۹). تا کنون اثر آنتی اکسیدانی بسیاری اسانس ها از جمله اکالیپتوس (۲۰)، مرزه (۲۱)، گاو گیلان (۲۲)، به لیمو و مینتستایچیس مولیس (۲۳)، پونه (۲۴)، میخک (۲۵)، رزماری (۲۶) و ... تأیید شده است. با توجه به اینکه اسانس ها توسط FDA (سازمان غذا و داروی آمریکا) و EPA (آژانس حفاظت از محیط زیست) به عنوان مواد GRAS (عموماً به عنوان ایمن شناخته

شده) شناخته شده اند و از طرفی دارای اثرات دارویی متنوعی می باشد به همین دلیل مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته اند (۲۷).

باین حال، حلالیت پایین و نوسانات بالا آن ها دو مانع اصلی برای استفاده از این ترکیبات در زمینه های دارو و درمان می باشد. به همین دلیل، کپسوله کردن این ترکیبات به منظور افزایش حلالیت، پایداری و اثربخشی آن ها از اهمیت بالایی برخوردار است. نانوامولسیون ها به عنوان یک سیستم انتقال برای داروهای دارای حلالیت پایین در نظر گرفته شده اند و با توجه به ابعاد نانومتری و ویژگی های منحصر به فرد خود قادر به انتقال ترکیبات دارویی و حفظ آن ها از عوامل محیطی و افزایش دسترسی زیستی آن ها می باشند (۲۸). در مطالعات قبلی از اسانس های متنوع گیاهی از جمله 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 امولسیون ها 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 امولسیون ها به عنوان یک ماده ضد میکروبی نوآوری جدید و امیدوارکننده است چرا که این ترکیبات با ایجاد اختلال در غشای بیرونی، اثرات مهارتی گسترده ای در برابر باکتری ها،

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 درمغه اثرات آنتی‌اکسیدان ضعیف‌تری را نشان می‌دهد. مقایسه هاله عدم رشد باکتری اورئوس در تیمار با نانوامولسیون روغن کتان و نانوامولسیون اسانس درمغه اثرات آنتی باکتریایی قوی‌تر نانوامولسیون درمغه 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 مهار بالایی رادیکال‌های آزاد DPPH ( $IC_{50}: 0.023 \mu\text{g/ml}$ ) و ABTS ( $IC_{50}: 0.004 \mu\text{g/ml}$ ) توسط نانوامولسیون بره موم (۳۸) را در مقایسه با نانوامولسیون درمغه نشان می‌دهد. به‌طور مشابه در مطالعات مختلف اثرات آنتی‌اکسیدان نانوامولسیون‌ها بر علیه دو رادیکال آزاد بررسی شده است که قابل مقایسه با مطالعه حاضر می‌باشد. برای مثال نانوامولسیون‌های 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 مهار بر علیه رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH می‌باشند. همچنین نانوامولسیون گیاه پنج انگشتی (۴۴) و اسانس سیر (۴۵) نیز اثرات مهار خوبی بر رادیکال‌های آزاد DPPH نشان دادند که قابل مقایسه با مطالعه حاضر می‌باشد. اثرات آنتی‌اکسیدان یا آنتی باکتریایی نانوامولسیون‌های 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 نانوامولسیون‌ها نیز به دلیل تغییر میزان پایداری آن‌ها در طی زمان ذخیره سازی محدودیت‌هایی برای

ویروس‌های دارای پوشش و قارچها دارند. نانو امولسیون‌ها از نظر ترمودینامیکی برای هم جوشی با غشاهای لیپیدی مناسب می‌باشند و این همجوشی با جذب الکترواستاتیک بین بار کاتیونی امولسیون و بار آنیونی در پاتوزن افزایش می‌یابد و همین امر منجر به لیز سلولی و مرگ پاتوزن می‌گردد. با توجه به اینکه مکانیسم عملکرد نانو امولسیون‌ها اختلال غیر اختصاصی غشای سلولی باکتریایی است بنابراین نانو امولسیون‌ها منجر به ایجاد سوبیه‌های 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 درمغه جهت بررسی اثرات مهار 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 مهار تقریباً مشابهی با آنتی‌بیوتیک را اعمال می‌کند. به‌طور مشابه در مطالعات قبلی اثر مهار 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 نانوامولسیون‌ها می‌توان به توان بالای آن‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد اشاره نمود. نتایج بررسی توان آنتی‌اکسیدان نانوامولسیون اسانس درمغه نشان داد که این ترکیب با غلظت حدود ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر است حدود ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH را مهار نماید.

در بررسی انجام شده در سال ۲۰۱۳ ترکیبات موجود در اسانس گیاه درمغه گونه *Artemisia aucheri Boiss* شناسایی و اثرات آنتی باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی آن مورد بررسی قرار گرفت. این ترکیبات شامل p-سیمن، ۸، ۱-سینئول، لینالول، ترنس بتا اوسیمین، گاما ترپینن، دودکان، اکتانول استات، ترینن، بورنئول، لاواندولول و استات بورنیل به‌عنوان ترکیبات مونوترپن و استریم کریزانتیل، دهیدرو آرومادندرین و کاریوفیلل اکسید به‌عنوان ترکیبات سسکوئیترپن بود. در این بررسی هیچگونه اثر مهار بر رادیکال‌های آزاد DPPH گزارش نشد درحالی‌که اثر مهار اسانس مورد نظر بر سوبیه‌های 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 مهار 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

### 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.

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 تأییدی بر اثرات آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی نانوامولسیون مورد بررسی است و این ویژگی‌ها، فرمولاسیون تهیه شده را به یک گزینه جذاب برای مطالعات بالینی تبدیل می‌کند.

### References:

- 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.
- Nigam A, Gupta D, Sharma A. Treatment of infectious disease: beyond antibiotics. *Microbial Res* 2014;169(9-10):643-51.
- Marianne Frieri K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect* 2017;10:369-78.
- 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.
- 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.
- Pavela R, Benelli G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Pharmacol Sci* 2016;21(12):1000-7.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Life* 2016;10:87-96.
  19. Kumar M, Chandel M, Kumar S, Kaur S. Studies on the antioxidant/genoprotective activity of extracts of *Koeleruteria 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 Biol* 2016;76(1):101-8.
  23. Olmedo R, Ribotta P, Grosso NR. Antioxidant activity of essential oils extracted from *Aloysia triphylla* and *Mintostachys 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, Coisson 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 Sci* 2012;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, Pesarakli 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. Hassanzadeh H, Alizadeh M, Bari MR. Formulation of garlic oil-in-water nanoemulsion: antimicrobial and physicochemical aspects. *IET nanobiotechnol* 2018;12(5):647-52.

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

Mahjobe Irani<sup>1</sup>, Masoud Homayouni Tabrizi<sup>2\*</sup>, Touran Ardalan<sup>3</sup>

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 (IC<sub>50</sub> = 80µg / ml) and ABTS (IC<sub>50</sub> = 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

<sup>1</sup> Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

<sup>2</sup> Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran (Corresponding author)

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran