








Research Article

Design of Nanoemulsions Containing Essential Oil of *Artemisia Kopetdaghensis*: Investigation of Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity on Two Isolates from Clinical Specimens

Elyas Salahi¹ , Ahmad Asgharzadeh^{2*} , Amir Amani³ , Maryam Besharati⁴ ,
Maryam Tatari⁵ 

¹ PhD Candidate in Horticultural Science, Shirvan Branch, Islamic Azad University, Shirvan, Iran

² Assistant Professor, Department of Horticulture, Shirvan Branch, Islamic Azad University, Shirvan, Iran

³ Professor of Pharmaceutics, Department of Advanced Technologies, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

⁴ Postdoc Researcher, Department of Advanced Technologies, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Agronomy, Shirvan Branch, Islamic Azad University, Shirvan, Iran

*Corresponding author: Ahmad Asgharzadeh, Department of Horticulture, Shirvan Branch, Islamic Azad University, Shirvan, Iran. E-mail: asg.ahmad@yahoo.com

DOI: [10.32592/nkums.15.1.10](https://doi.org/10.32592/nkums.15.1.10)

How to Cite this Article:

Salahi E, Asgharzadeh A, Amani A, Besharati M, Tatari M Design of Nanoemulsions Containing Essential Oil of *Artemisia Kopetdaghensis*: Investigation of Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity on Two Isolates from Clinical Specimens. J North Khorasan Univ Med Sci. 2023;15(1):10-17. DOI: 10.32592/nkums.15.1.10

Received: 13 July 2022

Accepted: 20 September 2022

Keywords:

Artemisia kopetdaghensis
Antimicrobial
Essential oil
Nanoemulsion

Abstract

Introduction: The *Artemisia* plant is known by its scientific name, which is the exclusive species of Kopeh Daghi in Iran. The present study aimed to design a nanoemulsion of the essential oil of Kopeh Daghi and investigate its antimicrobial activity on the gram-negative bacteria *Escherichia coli* and the gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*.

Method: At first, the essential oil extraction was performed using a Clevenger. Nanoemulsion was prepared by a spontaneous method using Tween 80 as oil in water. The size of nanoparticles was determined using the dynamic light scattering method. The antioxidant and antibacterial effects of Nanoemulsion at a concentration of 15% of essential oil were investigated.

Results: In the current research, 38 compounds were identified in the species of *Artemisia kopetdaghensis*, of which Davanone, with 28.89%, was the most effective substance. The results of the antioxidant test demonstrated that pure essential oil (IC₅₀= 7.05 mg/ml) and Nanoemulsion containing essential oil (IC₅₀= 46.51 mg/ml) had the highest antioxidant activity, respectively. Furthermore, regarding the inhibition of bacterial growth, Nanoemulsion was the most effective in *Staphylococcus aureus* with a non-growth zone diameter of 8 mm. In *Escherichia coli*, pure essential oil was the most effective, with a non-growth zone diameter of 9 mm.

Conclusion: In general, the antibacterial properties of 15% nanoemulsion were better compared to 15% essential oil. Moreover, Nanoemulsion containing the medicinal plant essential oil had more antioxidant properties compared to 15% essential oil.



طراحی نانومولسیون‌های حاوی اسانس گونه درمنه کپه داغی (Artemisia kopetdaghensis): بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی بر دو سویه بیمارستانی

الیاس صلاحی^۱، احمد اصغرزاده^{۲*}، امیر امانی^۳، مریم بشارتی^۴، مریم تاتاری^۵

^۱ دانشجوی دکتری علوم باغبانی، واحد شیروان، دانشگاه آزاد اسلامی، شیروان، ایران

^۲ استادیار، گروه باغبانی، واحد شیروان، دانشگاه آزاد اسلامی، شیروان، ایران

^۳ استادار فارماسیوتیکس، گروه فناوری‌های نوین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

^۴ پسادکتری، گروه فناوری‌های نوین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

^۵ استادیار، گروه زراعت، واحد شیروان، دانشگاه آزاد اسلامی، شیروان، ایران

*نویسنده مسئول: احمد اصغرزاده، گروه زراعت، واحد شیروان، دانشگاه آزاد اسلامی، شیروان، ایران. ایمیل: asg.ahmad@yahoo.com

DOI: 10.32592/nkums.15.1.10

| | |
|---|--|
| تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۲ | چکیده |
| تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۶ | مقدمه: گیاه درمنه با نام علمی Artemisia شناخته می‌شود که گونه کپه داغی انحصاری ایران است. هدف از این مطالعه، طراحی نانومولسیون اسانس درمنه کپه داغی و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن بر باکتری گرم منفی /شریشیا کلی و باکتری گرم مثبت /استافیلوکوکوس اورئوس است. |
| واژگان کلیدی: | روش کار: در ابتدا، اسانس گیری با استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد. نانومولسیون به روش خودبه‌خودی و با استفاده از توئین ۸۰ به صورت روغن در آب تهیه شد. اندازه نانوذرات با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی تعیین شد. اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی نانومولسیون در غلظت ۱۵ درصد از اسانس بررسی شد. |
| اسانس درمنه کپه داغی ضد میکروبی نانومولسیون | یافته‌ها: در تحقیق حاضر، ۳۸ ترکیب گونه درمنه کپه داغی شناسایی شد که داوانون با ۲۸/۸۹ درصد، بیشترین ماده مؤثره را به‌خود اختصاص داد. نتایج آزمون آنتی‌اکسیدانی نشان داد که اسانس خالص (C ₅₀ = ۷/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و نانومولسیون حاوی اسانس ۱۵ درصد (C ₅₀ =۴۶/۵۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌ترتیب بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشته است. همچنین، در زمینه مهار رشد باکتری، نانومولسیون ۱۵ درصد در باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس با قطر هاله عدم رشد ۸ میلی‌متر، بیشترین کارایی را داشت. در باکتری /شریشیا کلی، اسانس خالص با قطر هاله عدم رشد ۹ میلی‌متر، بیشترین کارایی را داشته است. |
| | نتیجه‌گیری: به‌طور کلی، از نظر خواص ضدباکتریایی، نانومولسیون ۱۵ درصد در مقایسه با اسانس ۱۵ درصد عملکرد بهتری داشته است. همچنین، نانومولسیون حاوی اسانس ۱۵ درصد گیاه درمنه، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری در مقایسه با اسانس ۱۵ درصد دارد. |

مقدمه

در سالیان اخیر، ترکیبات مختلفی از گیاهان دارویی تهیه شده است که برای معالجه بیماری‌های گوناگون کاربرد دارد. درمنه (Artemisia) از خانواده کاسنی است که رویشگاه آن بیشتر در نواحی خشک و کویری است و اسانس آن عطر فراوانی دارد. همچنین، کاربردهای بیولوژیک آن به‌خوبی شناخته شده است [۱، ۲]. گیاه درمنه از جمله گیاهان دارویی است که گونه‌های مختلفی در دنیا دارد و ۳۴ گونه از آن در ایران وجود دارد [۳، ۴] که در مناطق مختلف ایران رشد می‌کند [۵]. برای گیاه درمنه، خواص متعددی از جمله ضد میکروبی، ضدانگلی و ضد ویروسی نام برده شده است [۶]. گیاهان دارویی به‌دلیل اینکه منشأ طبیعی دارند و با شرایط محیطی هماهنگ هستند، در جلوگیری از امراض مختلف مفید هستند [۷]. اسانس‌ها ترکیباتی دارند که در تمام قسمت‌های گیاه وجود دارد و کاربردهای فراوانی دارند [۸].

بوی درمنه به‌دلیل وجود ترکیبات مونوترپنی، در اسانس آن‌ها است [۹]. بیشترین ترکیبات اسانس درمنه به‌ترتیب شامل آلفاپینن و سینئول است [۱۰]. نانومولسیون‌های روغن در آب و آب در روغن به‌صورت دو مایع جداگانه هستند که قابلیت حل شدن ندارند و تنها با کمک یک سورفکتانت مناسب، این عمل امکان‌پذیر است [۱۱]. به‌طور کلی، اندازه ذرات نانومولسیون کمتر از ۵۰۰ نانومتر است [۱۲]. هرچه اندازه قطرات نانومولسیون کوچک‌تر باشد، ظاهر آن شفاف است و اگر درشت باشد، با رنگ سفید شیری مشخص است [۱۳].

حامل و با سرعت جریان ۰/۹ میلی لیتر بر دقیقه و طیف سنج جرمی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. شناسایی طیف‌های حاصل با رسم کروماتوگرام یک سری از پارافین‌های نرمال (C₅-C₃₀) تحت شرایط یکسان با تزریق نمونه انجام شد. با توجه به زمان بازداری این ترکیب‌ها، اندیس کواتز برای هر جزء موجود در کروماتوگرام نمونه محاسبه شد.

آماده‌سازی نانوامولسیون

از روش خودبه‌خودی برای تهیه نانوامولسیون استفاده شد. بدین منظور، ابتدا ۱/۲ گرم توئین ۸۰ و ۰/۶ گرم اسانس با ترازوی دیجیتال وزن و با استفاده از همزن مگنت‌دار با هم ترکیب شدند. سپس، ۰/۴ گرم اتانول ۹۶ درصد به ترکیب قبلی افزوده شد. در نهایت، ۱/۷۲ گرم آب مقطر به‌صورت قطره‌ای به فاز قبلی اضافه و با چرخش ۷۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه فرمولاسیون نهایی تهیه شد [۲۰].

اندازه‌گیری ذرات نانوامولسیون و تعیین پایداری

برای اندازه‌گیری ذرات، از روش پراکندگی نور دینامیکی (Dynamic light scattering) استفاده شد. برای مشخص کردن میزان پایداری نانوامولسیون تهیه‌شده، محلول‌ها به مدت ۶۰ روز در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ چرخه دمایی ۲۴ ساعته در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) و دمای محیط (۲۷ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

بررسی فعالیت ضدباکتریایی

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bacteriocidal Concentration) با استفاده از باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* (سویه‌های بیمارستانی) انجام شد. برای مشخص شدن حداقل غلظت بازدارندگی، از روش رقیق‌سازی در پلیت‌های ۹۶ خانه، رقت‌سازی انجام شد. یک کلونی از هر یک از سویه‌ها، جداگانه به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتیک سوی برای منتقل شد. سپس، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری انجام شد. سپس، کدورت محیط کشت‌های حاوی باکتری با استفاده از آب مقطر استریل به غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند (۱۰^۸CFU/ml) (کلنی باکتری در واحد/ میلی لیتر) تنظیم شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت روی محیط کشت مولر هینتون آگار به‌وسیله سوآپ استریل کشت یکنواخت داده شد. سپس، ۵۰ میکرولیتر از نانوامولسیون حاوی اسانس، اسانس خالص و اسانس ۱۵ درصد وزنی، روی دیسک‌های خالی استریل بارگذاری شد. در ادامه، دیسک حاوی تیمار با پنس استریل با فواصل استاندارد ۱/۵ سانتی‌متر از لبه پلیت، روی سطح محیط کشت قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. میانگین قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر، با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد [۲۱]. از دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک

نانوامولسیون‌ها به دلیل پایداری فیزیکی که در بلندمدت دارند، به منظور محافظت از داروها در برابر عوامل محیطی مختلف مانند اکسید شدن و هیدرولیز استفاده می‌شوند [۱۴]. همچنین، به دلیل قدرت نفوذپذیری زیاد و ماندگاری، برای اندامی خاص استفاده می‌شوند [۱۵].

نانوامولسیون‌ها به دلیل اینکه در داروهای با خاصیت آب‌گریزی زیاد حل می‌شوند، مسیری را برای افزایش سرعت حل کردن دارو فراهم می‌کنند [۱۶]. از فناوری نانوامولسیون می‌توان در صنایع آرایشی و به‌صورت موضعی برای کاربردهایی نظیر دهانی [۱۷]، چشمی [۱۸] و پوست [۱۹] استفاده کرد.

هدف اصلی این مطالعه، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و همچنین خواص ضدباکتریایی گیاه درمنه کپه داغی، از گونه‌های گیاهی غالب منطقه خراسان شمالی، بر دو باکتری گرم منفی (*اشریشیا کلی*) (*Escherichia coli*) و گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) (*Staphylococcus aureus*) است که منجر به رسیدن به فرمول مناسبی از طریق استفاده هم‌زمان اسانس در ترکیب با سیستم نانوامولسیون برای بررسی تأثیرات ضدباکتریایی در مقابل آلودگی‌های موجود شد.

روش کار

مواد

مواد آزمایشی شامل توئین ۸۰ (شرکت مرک آلمان)، محیط کشت مولر هینتون آگار (شرکت مرک آلمان) و آب مقطر دو بار تقطیر بود. اسانس از گیاه درمنه کپه داغی تهیه شد که در آذر ۱۴۰۰ از منطقه گلستان شیروان جمع‌آوری شده بود. نمونه گیاهی مدنظر با شماره هر بار بومی MP1201 توسط کارشناسان گیاهان دارویی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان شمالی تأیید شد.

اسانس‌گیری

پس از جمع‌آوری گیاهان از محیط و خشک کردن آن‌ها در سایه، گیاهان به قطعات ریز تبدیل شدند و به‌روش تقطیر با بخار، با استفاده از دستگاه کلونجر (یک لیتری ساخت ایران) اسانس آن استخراج شد. سپس، با استفاده از سدیم سولفات، آب اضافی خارج و اسانس در یخچال نگهداری شد.

شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس

مواد تشکیل‌دهنده اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی GCMS Shimadzu (مدل QP2010SE) ساخت ژاپن) شناسایی شد. این دستگاه به ستون RtX-5MS (طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت فاز ثابت ۰/۲۵ میکرومتر) مجهز است که برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم شد: دمای ابتدایی آن ۶۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۴ دقیقه، دمای دستگاه تا رسیدن به دمای ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد، در هر دقیقه ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و به مدت ۱۳ دقیقه در این دما باقی ماند. از گاز هلیوم به‌عنوان گاز

جدول ۱. ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه درمنه کپه داغی

| ردیف | ترکیبات | شاخص | درصد |
|------|-------------------------|------|-------|
| ۱ | Cyclopentanol | ۹۹۹ | ۰/۴۶ |
| ۲ | Camphene | ۱۰۰۱ | ۰/۶۵ |
| ۳ | Sabinene | ۱۰۳۶ | ۰/۴۰ |
| ۴ | Beta-Myrcene | ۱۰۶۳ | ۷/۱۵ |
| ۵ | Benzene | ۱۱۱۲ | ۱/۲۰ |
| ۶ | Beta-Phelladrene | ۱۱۲۰ | ۰/۵۱ |
| ۷ | 1,8-Cineol | ۱۱۲۵ | ۱/۶۸ |
| ۸ | 1,8-Cyclohexndiol | ۱۱۵۹ | ۰/۴۳ |
| ۹ | Nonilene | ۱۱۹۲ | ۰/۶۸ |
| ۱۰ | Terpinolene | ۱۲۲۴ | ۰/۳۹ |
| ۱۱ | Linalool | ۱۲۵۴ | ۵/۹۳ |
| ۱۲ | Beta-Thujone | ۱۲۶۴ | ۴/۷۸ |
| ۱۳ | Alpha-Thujone | ۱۲۸۲ | ۱/۲۱ |
| ۱۴ | Camphor | ۱۶۴۵ | ۷/۹۹ |
| ۱۵ | Terpendiol | ۱۶۶۳ | ۰/۷۹ |
| ۱۶ | Lavandalol | ۱۶۸۹ | ۵/۰۹ |
| ۱۷ | Terpenol | ۱۴۱۱ | ۰/۹۹ |
| ۱۸ | Benzenemethanol | ۱۴۲۸ | ۰/۴۸ |
| ۱۹ | Alpha-Terpineol | ۱۴۴۳ | ۰/۴۷ |
| ۲۰ | 2,3-Epoxygerminal | ۱۵۴۴ | ۰/۶۱ |
| ۲۱ | Neral | ۱۵۶۵ | ۰/۹۹ |
| ۲۲ | Geraniol | ۱۵۹۸ | ۰/۶۶ |
| ۲۳ | Geranial | ۱۶۴۷ | ۱/۱۴ |
| ۲۴ | Bornyl Acetate | ۱۶۸۴ | ۰/۹۳ |
| ۲۵ | Geranyl Acetate | ۱۶۸۹ | ۰/۳۷ |
| ۲۶ | Neryl Acetate | ۱۷۱۰ | ۱/۲۱ |
| ۲۷ | Cis-Jasmone | ۱۷۷۱ | ۱/۰۰ |
| ۲۸ | Davanone | ۲۱۱۷ | ۰/۵۶ |
| ۲۹ | Davana Ether | ۲۱۷۴ | ۰/۶۹ |
| ۳۰ | Zingiberene | ۲۱۷۸ | ۰/۴۹ |
| ۳۱ | Naphthalene | ۲۱۸۱ | ۰/۵۴ |
| ۳۲ | Beta-Bisabolene | ۲۱۹۰ | ۰/۸۳ |
| ۳۳ | Davana oil | ۲۱۹۴ | ۱/۰۵ |
| ۳۴ | Furanylidene | ۲۱۹۷ | ۱/۲۱ |
| ۳۵ | Beta-Sesquiphellandrene | ۲۲۰۵ | ۱/۴۴ |
| ۳۶ | Nerolidol | - | ۰/۸۸ |
| ۳۷ | Spatholenol | - | ۰/۸۳ |
| ۳۸ | Davanone | - | ۲۸/۸۹ |

سفوتاکسیم به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۲۲].

بررسی اثرات آنتی اکسیدانی با روش DPPH (۲) و ۲- دی فنیل - ۱ -

پیکریل هیدرازیل (Diphenyl picrylhydrazyl)

در این روش، ابتدا ۰/۱ میلی لیتر از محلول متانولی نمونه مدنظر (در غلظت های ۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر) در یک لوله آزمایش ریخته شد. سپس، به آن ۰/۱ میلی لیتر محلول متانولی دی فنیل پیکریل هیدرازیل (شرکت سیگما-آلد ریچ ساخت آمریکا) اضافه شد (۰/۱۶ میلی مولار). محتویات هر لوله با ورتکس کاملاً مخلوط و پس از گذشت ۳۰ دقیقه، در دمای اتاق و در تاریکی، جذب آن ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (الایزا ریدر) مدل elx800 Ts (محصول کارخانه بیوتک آمریکا) در برابر بلانک حاوی متانول خوانده شد. هرچه قدرت آنتی اکسیدانی نمونه بیشتر باشد، رنگ محلول حاصل زردتر است [۲۳]. برای محاسبه IC₅₀ عصاره های مدنظر از نرم افزار Graphpad Prism نسخه ۵ استفاده شد.

روش آماری

برای تحلیل داده ها، از نرم افزار SAS (Statistical Analysis System) و برای مقایسه میانگین ها، از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

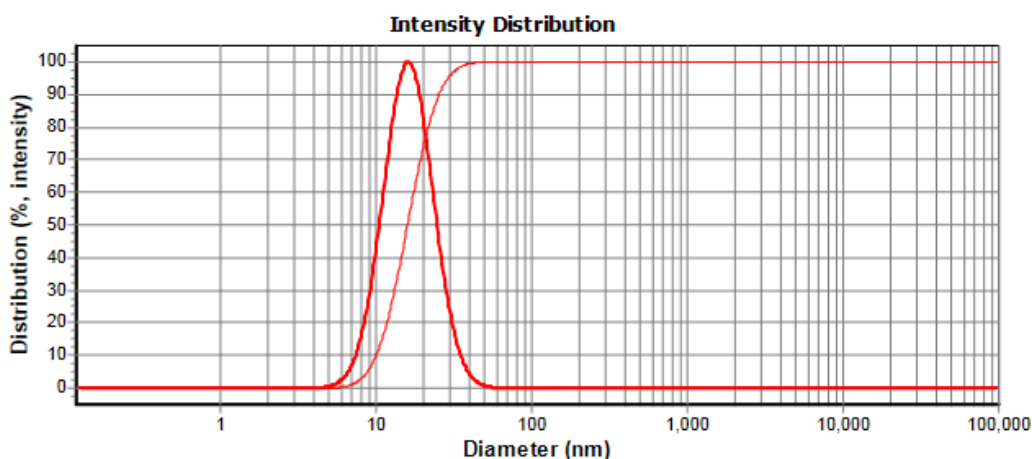
یافته ها

شناسایی ترکیبات اسانس

در مجموع، ۳۸ ترکیب از اسانس مدنظر شناسایی شد که میزان آن ها در جدول ۱ ذکر شده است.

توزیع اندازه ذرات نانومولسیون و بررسی پایداری

در مطالعه انجام شده، اندازه ذرات به دست آمده از نانومولسیون ۱۵ درصد درمنه کپه داغی، ۱۶/۳ نانومتر بود (شکل ۱). در بررسی پایداری، نانومولسیون ها بعد از ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و چرخه های دمایی سرما-گرم، شفاف باقی ماندند و تغییری در رنگ و اندازه ذرات مشاهده نشد.



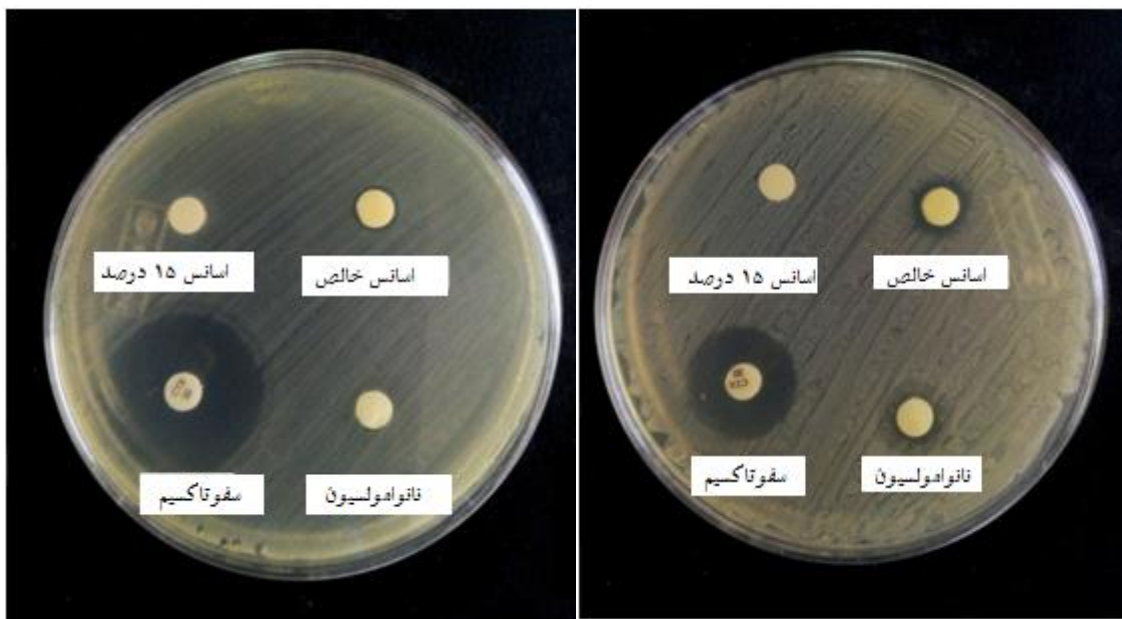
شکل ۱. میانگین توزیع اندازه ذره ای نانومولسیون گونه درمنه کپه داغی بر حسب نانومتر

جدول ۲. ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوامولسیون حاوی ۱۵ درصد اسانس، اسانس خالص، اسانس ۱۵ درصد و سفوتاکسیم با توجه به قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

| قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر | | | |
|----------------------------------|----------------------|------------|---------------|
| باکتری | نانوامولسیون ۱۵ درصد | اسانس خالص | اسانس ۱۵ درصد |
| استافیلوکوکوس اورئوس | ۸/۰±۰/۵ | ۱۱/۱±۰/۰ | - |
| اورئوس | - | - | ۲۱/۰±۱/۱ |
| اشریشیا کلی | - | ۹/۰±۱/۱ | ۲۴/۲±۰/۰ |

بررسی فعالیت ضدباکتریایی

جدول ۲ و ۳ و همچنین شکل ۲ نتایج اثرات ضدباکتری نانوامولسیون ۱۵ درصد و اسانس ۱۵ درصد درمنه کپه داغی را علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی نشان می‌دهد. با توجه به قطر هاله عدم رشد، نانوامولسیون اسانس ۱۵ درصد درمنه نسبت به اسانس خالص و اسانس ۱۵ درصد (رقیق شده) اثرات بهتری علیه استافیلوکوکوس اورئوس داشت. همچنین، با وجود اینکه اسانس رقیق شده فعالیت ضد میکروبی در حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی نداشت، نانوامولسیون اسانس ۱۵ درصد فعالیت ضد میکروبی داشت که از اسانس خالص ضعیف‌تر بود.



شکل ۲. هاله عدم رشد باکتری در نانوامولسیون حاوی اسانس ۱۵ درصد، اسانس خالص، اسانس درمنه کپه داغی ۱۵ درصد و سفوتاکسیم (CTX) بر باکتری‌های گرم مثبت (راست) و گرم منفی (چپ) با روش انتشار دیسک

جدول ۳. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) در نمونه‌های اسانس درمنه کپه داغی

| حداقل غلظت کشندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر) | | | حداقل غلظت بازدارندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر) | | |
|---|------------|----------------------|---|------------|----------------------|
| اسانس ۱۵ درصد | اسانس خالص | نانوامولسیون ۱۵ درصد | اسانس ۱۵ درصد | اسانس خالص | نانوامولسیون ۱۵ درصد |
| - | ۳۲۰۰۰ | ۶۴۰۰۰ | - | ۸۰۰۰ | ۱۶۰۰۰ |
| - | - | ۶۴۰۰۰ | - | ۳۲۰۰۰ | ۳۲۰۰۰ |

بر میلی‌لیتر در اسانس خالص مشاهده شد. نانوامولسیون ۱۵ درصد و اسانس خالص به ترتیب با ۴۶/۵۱ و ۳۷۶/۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اثرات کمتری داشتند.

بحث

بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس درمنه کپه داغی، شامل داونون (۲۸/۸۹ درصد)، کامفور (۷/۹۹ درصد)، بتا میرسن (۷/۱۵ درصد) و لینالول (۵/۹۳ درصد) بودند. در یک تحقیق که ترکیبات شیمیایی اسانس و عصاره درمنه کوهی بررسی شد، بیشترین ترکیبات شامل ۱ و ۸ سینئول (۲۲/۶۵ درصد)، داونون (۱۳/۸۲ درصد) و کامفور (۹/۹۲ درصد) بودند [۲۴]. اسانس موجود در گونه درمنه خراسانی نیز

جدول ۴. بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس ۱۵ درصد، اسانس خالص و نانوامولسیون ۱۵ درصد با روش DPPH

| نمونه | (IC ₅₀ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) |
|-----------------------|--|
| اسانس ۱۵ درصد | ۳۷۶/۶۳ |
| نانوامولسیون ۱۵ درصد | ۴۶/۵۱ |
| اسانس خالص | ۷/۰۵ |
| میسل | - |
| بوتیل هیدروکسی تولوئن | ۰/۳ |

a: مقادیر IC₅₀ بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی درمنه کپه داغی با روش DPPH نتایج حاصل از آزمون DPPH (جدول ۴) مشخص کرد که تیمار میسل (نانوامولسیون بدون اسانس) اثرات آنتی‌اکسیدانی نداشته است. بهترین عملکرد در مهار رادیکال‌های آزاد با IC₅₀ به میزان ۷/۰۵ میلی‌گرم

بررسی شد و نتایج نشان داد که اثر اسانس از بوتیل هیدروکسی تولوئن (Butylated Hydroxy Toluene) (به‌عنوان کنترل مثبت) بیشتر بود [۳۴]. در یک مطالعه در زمینه بررسی خصوصیات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره درمنه، حساس‌ترین باکتری به تیمارهای آزمایشی، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تعیین شد [۳۵]. در تحقیقی نیز مشخص شد که اسانس گونه درمنه اثرات ضدباکتریایی دارد [۳۶]. در یک مطالعه آزمایشگاهی درباره اثرات ضد میکروبی نانومولسیون عصاره آبی گیاه نعناع‌فلغلی بر باکتری *اشریشیا کلی*، قطر هاله عدم رشد ۴/۲۱ میلی‌متر به‌دست آمد [۳۷]. در مجموع، نانومواد از دو طریق باعث غیرفعال شدن و مرگ باکتری می‌شوند. در روش مستقیم، نانومواد سبب آزادسازی یون‌هایی می‌شوند که با گروه تیول پروتئین‌های موجود بر سطح سلول باکتری واکنش می‌دهند. نانومواد باعث غیرفعال کردن پروتئین‌ها، کاهش نفوذپذیری غشا و درنهایت، مرگ سلولی می‌شود [۳۹، ۳۸].

در این آزمایش، از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. هدف روش‌های آگار میکروداپلوشن و براث میکروداپلوشن، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عامل ضد میکروبی سنجیده شده است که تحت شرایط مشخصی، مانع از رشد باکتری بررسی شده می‌شود

[۴۰-۴۱]. روش دیسک دیفیوژن آگار، یک روش رایج و کم‌هزینه در اندازه‌گیری حساسیت ضد میکروبی است. در صورتی که، از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی معتبر استفاده شود، می‌توان از روش دیسک دیفیوژن آگار برای تعیین حساسیت ارگانیزم‌ها به‌منظور غربالگری اولیه و تعیین درمان مناسب استفاده کرد [۴۲].

نتایج آزمایش‌های آنتی‌اکسیدانی نشان داد اسانس خالص با $IC_{50}=7/05$ میکروگرم بر میلی‌لیتر، تأثیر زیادی در مهار رادیکال‌های آزاد دارد. میزان مهارکنندگی در نانومولسیون ۱۵ درصد، اسانس ۱۵ درصد و بوتیل هیدروکسی تولوئن نیز به ترتیب ۴۶/۵۱، ۳۷۶/۶۳ و ۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در تحقیق دیگری در زمینه خواص آنتی‌اکسیدانی گونه درمنه خراسانی، میزان اسانس درمنه و بوتیل هیدروکسی تولوئن به ترتیب ۴/۹ و ۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد [۲۵] که با نتایج تحقیق حاضر مشابهت داشت.

نتیجه‌گیری

بیشترین ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس گیاه درمنه کپه داغی، داوانون (۲۸/۸۹ درصد) بود. اثرات ضدباکتریایی تیمارهای آزمایشی نشان داد که نانومولسیون ۱۵ درصد در مقایسه با اسانس ۱۵ درصد، کارایی بهتری داشته است. علاوه بر این، داده‌های به‌دست‌آمده مشخص کرد که نانومولسیون حاوی اسانس گیاه درمنه ($IC_{50}=7/05$ میکروگرم بر میلی‌لیتر) خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری در مقایسه با اسانس ۱۵ درصد دارد و در مهار رادیکال آزاد موفق عمل کرد. هرچه میزان این عدد کمتر باشد، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر است.

شامل سیس-وربونل (۲۶/۷۴ درصد)، ۱ و ۸ سینئول (۲۰/۰۵ درصد)، کامفور (۱۵/۰۶ درصد) و کریسانتینیل استات (۸/۵۶ درصد) بودند [۲۵]. ترکیبات اسانس درمنه کرمانی از ۱ و ۸ سینئول (۲۶/۹۳ درصد)، کامفور (۱۶/۹۷ درصد)، آلفا-توجون (۷/۵۲ درصد) و بورنئول (۷/۴۷ درصد) تشکیل شده بود [۲۶]. تفاوت در میزان مقادیر مواد مؤثره موجود در اسانس، طبق گزارشات مختلف، ناشی از نوع محیطی که گیاه در آن رشد می‌کند و همچنین، اختلاف آب‌وهوایی مناطق مختلف است [۲۷].

اسانس خالص در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، در مقایسه با *اشریشیا کلی* با قطر هاله عدم رشد ۱۱ میلی‌متر، عملکرد بیشتری داشت. بررسی حداقل غلظت بازدارندگی نشان داد که اسانس خالص و نانومولسیون ۱۵ درصد به ترتیب با ۸۰۰۰ و ۱۶۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، خاصیت ضدباکتری بهتری در مقایسه با *اشریشیا کلی* داشتند. مطالعات نشان می‌دهند که اثرات ضدباکتریایی عصاره آبی درمنه کوهی در باکتری *اشریشیا کلی* در بازه بین ۱۶۰ تا ۳۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. همچنین، در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، این بازه بین ۶۰ تا ۱۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است [۲۸]. در گزارشی که اثرات ضدباکتریایی اسانس گونه درمنه شرقی بررسی شد، قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های گرم مثبت ۲۰ میلی‌متر گزارش شد که تأثیر قوی اسانس را نشان داد [۲۹].

در بررسی اثرات ضدباکتریایی گونه درمنه آکه گاراوی هیرون (*Artemisia Echegarayi Hieron*) مشاهده شد که قطر هاله عدم رشد در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* به ترتیب ۹ و ۱۰ میلی‌متر است [۳۰]. گزارشی درباره اثرات ضدباکتریایی اسانس درمنه معطر مشخص کرد که هاله عدم رشد در باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* به ترتیب ۸ و ۷ میلی‌متر بود [۳۱]. دلیل حساسیت زیاد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی، احتمالاً به ساختار سلولی آن‌ها مربوط است. به این صورت که، در باکتری‌های گرم منفی، برخلاف باکتری‌های گرم مثبت، یک غشای خارجی وجود دارد که از آن‌ها محافظت می‌کند.

تحقیقات زیادی اثرات ضدباکتریایی تعدادی از گونه‌های درمنه را ثابت می‌کند؛ به این صورت که حداقل غلظت بازدارندگی عصاره درمنه کوهی و دشتی در باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۱۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود [۲۸]. در یک تحقیق، اثرات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی اسانس گونه‌های مختلف درمنه بررسی و مشخص شد که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، حساس‌ترین باکتری به این گونه‌ها است [۳۲]. اثرات ضدباکتریایی اسانس درمنه کوتنسیس بر قطر هاله عدم رشد سودوموناس *آیرزینوزا*، ۱۳/۴ میلی‌متر به‌دست آمد و به میزان ۰/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر علیه این باکتری خواص ضدباکتریایی قابل قبولی نشان داد [۳۳]. در مطالعه‌ای، اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاه درمنه تورانیکا (*Artemisia Turanica*)

سپاسگزاری

مطالعه با کد IR.NKUMS.REC.1400.076 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی تصویب شد.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافع ندارند.

نویسندگان از همکاری صمیمانه آزمایشگاه نانوپزشکی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، همچنین آقای دکتر هادی یزدانی که در تمام مراحل این پژوهش کمال همکاری را داشتند، قدردانی می‌کنند. این

References

- Mahboubi M, Farzin N. Antimicrobial activity of Artemisia sieberi essential oil from central Iran. *Iranian J Microbiol*. 2009;1(2):43-48.
- Hashemi Z, Hojati M, Taharnejad M. Evaluation of antioxidant activity of Artemisia sieberi essential oil on oxidative stability of frying oil. *EJFPP*. 2014;6(1):19-35.
- Alzoreky NS, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int J Food Microbiol*. 2003;80(3):223-230. DOI: 10.1016/s0168-1605(02)00169-1 PMID: 12423924
- Tariq KA, Chishti MZ, Ahmad F, Shawl AS. Anthelmintic activity of extracts of Artemisia absinthium against ovine nematodes. *Vet Parasitol*. 2009;160(1-2):83-88. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.10.084 PMID: 19070963
- Mozaffarian V. Dictionary of Iranian plant names. Tehran: Contemporary Culture Publications; 1996.
- Hakimi Maybodi MH, Afkhami Aghdaee M, Mijalili BF. An investigation into biological activities of Artemisia Persia's essential oil. *Pajouheshmag*. 2003;16(61):2-5.
- Mazandarani M, Khormali A. Autecology, ethnopharmacology, total phenol and flavonoids and antioxidant activity of Ditrachia graveolens (L.) Greuter. In different extraction from Bandargaz region. *EJMP*. 2015;6(2):69-78.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol*. 2004;94(3):223-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022 PMID: 15246235
- Prabhakaran J, Maharaj S. Allelopathic potential of Cissus quadrangularis L. on growth of floral millet (Pennisetum typhoides ST. and HUB). *IJRBS*. 2013;3(1):18-21.
- Farzaneh M, Ahmadzadeh M, Hadian J, Tehrani AS. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of Artemisia on some soil-borne phytopathogens. *Commun Agricul Appl Biol Sci*. 2005;71(3):1327-1333. PMID: 17390897
- Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *J Phys Condens Matter*. 2006;18:R635. DOI: 10.1088/0953-8984/18/41/R01
- Sharma A, Kumar P. Understanding implantation window, a crucial phenomenon. *J Hum Reprod Sci*. 2012;5(1):2-6. DOI: 10.4103/0974-1208.97777 PMID: 22870007
- Aulton ME, Taylor K. Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines. Elsevier Health Sciences; 2013.
- Zhang Y, Shang Z, Gao C, Du M, Xu S, Song H, et al. Nanoemulsion for solubilization, stabilization, and in vitro release of pterostilbene for oral delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2014;15(4):1000-1008. DOI: 10.1208/s12249-014-0129-4 PMID: 24831090
- Jiang SP, He SN, Li YL, Feng DL, Lu XY, Du YZ, et al. Preparation and characteristics of lipid nanoemulsion formulations loaded with doxorubicin. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3141-3150. DOI: 10.2147/IJN.S47708 PMID: 23990722
- Yu H, Huang Q. Improving the oral bioavailability of curcumin using novel organogel-based nanoemulsions. *J Agric Food Chem*. 2012;60(21):5373-5379. DOI: 10.1021/jf300609p PMID: 22506728
- Tiwari SB, Shenoy DB, Amiji MM. Nanoemulsion formulations for improved oral delivery of poorly soluble drugs. *Nanotech*. 2006;1:475-478.
- Calvo P, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J Pharm Sci*. 1996;85(5):530-536. DOI: 10.1021/js950474+ PMID: 8742946
- Shakeel F, Baboota S, Ahuja A, Ali J, Aqil M, Shafiq S. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. *AAPS PharmSciTech*. 2007;8(4):E104. DOI: 10.1208/pt0804104 PMID: 18181525
- Saberi AH, Fang Y, McClements DJ. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions by spontaneous emulsification: Effect of propylene glycol and ethanol on formation, stability, and properties. *Food Res Int*. 2013;54(1):812-820. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.08.028
- Asgharisana F, Gaibi S. study of the role of common bacterial etiology in neonatal sepsis in Urumiah Shahid. *NCMBI*. 2011;1(3):17-21.
- Javanshir A, Karimi E, Homayouni Tabrizi M. Investigation of Antioxidant and anti-bacterial potential of Ricinus communis L. nano-emulsions. *Jundishapur Sci Med J*. 2020;19(1):1-9. DOI: 10.22118/JSMJ.2020.193939.1761
- Kang W, Yang H, Hong HJ, Han CH, Lee YJ. Anti-oxidant activities of kiwi fruit extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Korean J Vet Res*. 2012;52(4):275-280.
- Saeidi P, Ketabchi S, Rowshan V. Assessment of chemical compositions and antibacterial activity of the extract and essential oil of Artemisia aucheri collected from Iran. *JMW*. 2017;9(4):346-354.
- Sardarodiyani M, Arian Far A. Investigation of chemical components, antibacterial and antioxidant properties of essential oil Artemisia Khorasanica in North Khorasan area. *IFSET*. 2019;11(1):37-55.
- Ghanjali A, Pourramezani Harati M. Survey Of antibacterial and antifungal impact of essential oil of Artemisia Kermanensis. *JPEP*. 2013;7(28):32-39.
- Letchamo W, Xu HL, Gosselin A. Variations in photosynthesis and essential oil in thyme. *J Plant Physiol*. 1995;147(1):29-37. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81408-2
- Nasirpour M, Yavarmansh M, Mohamadi Sani A, Mohamdzade Moghadam M. Antibacterial effect of aqueous extract of Artemisia aucheri, Artemisia sieberi and Hyssopus officinalis L. on the food borne pathogenic bacteria. *FSCT*. 2014;12(46):73-84.
- Hendi E, Sefidkon F, Yousefi M, Teimouri M. Essential oil composition and antimicrobial activities of oil, alcoholic extract of Artemisia sieberi from Firoozkooch region. *IJBIO*. 2012;25(3):445-455.
- Laciari A, Vaca Ruiz ML, Carrizo Flores R, Saad JR. Actividad antibacteriana y antioxidante del aceite esencial extraído de Artemisia echegarayi Hieron.(Asteraceae). *Rev Argent Microbiol*. 2009;41(4):226-231.
- Younessi M, Farmani B, Alirezalu K, Fathizadeh O, Sabzi Nojaded M. Study of phytochemical composition and antibacterial effects of artemisia fragrans willd. essential oil in different seasons. *FSCT*. 2019;16(91):357-367.
- Erel ŞB, Reznicek G, Şenol SG, Yavaşoğlu NÜ, Konyalıoğlu S, Zeybek AU. Antimicrobial and antioxidant properties of Artemisia L. species from western Anatolia. *Turk J Biol*. 2012;36:75-84. DOI: 10.3906/biy-0912-27
- Saffari E, Khalili MA, MehrAbadi JF. The antibacterial activity of

- Artemisia quettensis essential oil and its synergy with imipenem. *Med J Tabriz Univ Med*. 2019;41(5):80-88. DOI: 10.34172/mj.2019.061
34. Sardarodiyani M, Arianfar A. Essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Artemisia Turanica on typical foodborne pathogens. *JFST*. 2018; 15(78):295-309.
 35. Niakan M, Attar Pour Yazdi MM, Safaei-Ghomi J, Khaloei M, Djafari Z. Effect of Methanol Extracts of Artemisia persica on Kinetic Growth of S. aureus and B. subtilis Bacteria. *J Med Plants*. 2011;10(40):139-143.
 36. Kazemi M, Dakhili M, Dadkhah A, Yasrebifar Z, Larijani K. Composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of Artemisia kermanensis Podl., an endemic species from Iran. *J Med Plants Res*. 2011;5(18):4481-4486.
 37. Heydari M, Bagheri M. The antimicrobial effects of hydro-extract of Mentha piperita lamiaceae essential oil nanoemulsion on gram-negative bacteria of Escherichia coli: A laboratory study. *J Rafsanjan Univ Med Sci*. 2019;18(6):515-528.
 38. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*. 2004;275(1):177-182. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.02.012 PMID: 15158396
 39. Feng Q, Wu J, Chen G, Cui F, Kim T, Kim J. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver Ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(4):662-668. DOI: 10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::aid-jbm10>3.0.co;2-3 PMID: 11033548
 40. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163-175. DOI: 10.1038/nprot.2007.521 PMID: 18274517
 41. Bialvaei AZ, Kal HS. Colistin mechanisms and prevalence of resistance. *Cur Med Res Opin*. 2015;31(4):707-721. DOI: 10.1185/03007995.2015.1018989 PMID: 25697677
 42. Sedighi I, Solgi A, Alikhani MY, Emad Momtaz H, Mihani F. Comparison of two different disk diffusion agar tests in determination of antibiotic susceptibility for E-coli isolated from urinary tract infection in pediatrics. *Avicenna J Clin Med*. 2010;17(1):17-20.