



## تأثیر فرم‌های نانوذره، نانوکامپوزیت، نانوکپسوله و لیپوزومی اسانس‌های نعناع فلفلی (*Mentha piperita L.*) و رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) در کاهش بیوفیلم باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی

سحر تیموری: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

محمود پوریوسف میانداوب: دانشیار گروه زراعت و آگرواکولوژی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران. (\* نویسنده مسئول) pooryousefm@yahoo.com

لیلا جیل عاملی: استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

شهرام آرمیده: دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

اعظم حدادی: دانشیار گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

نانوذره،  
نانوکامپوزیت،  
نانوکپسوله،  
نانولیپوزوم،  
نعناع فلفلی،  
رزماری

**زمینه و هدف:** استفاده از اسانس‌ها در کنترل باکتری‌های بیماری‌زا به دلیل حلالیت پایین در آب و فعالیت زیستی اندک با محدودیت‌هایی روبه‌رو است. لذا استفاده از نانوذرات، نانوکامپوزیت، نانوکپسوله و لیپوزومی می‌تواند یکی از راه‌های رفع این محدودیت‌ها باشد.

**روش کار:** نمونه‌های گیاهی نعناع فلفلی *Mentha piperita L.* و رزماری *Rosmarinus officinalis L.* مورد آزمایش در این تحقیق از مرکز رشد واحدهای فناوری کشاورزی جهاد دانشگاهی ارومیه جمع‌آوری و توسط متخصصین گیاه‌شناسی دانشگاه ارومیه مورد تایید قرار گرفت. گیاهان جمع‌آوری شده در تاریکی کاملاً خشک گردید و سپس گیاهان خشک شده به‌وسیله دستگاه مخلوط‌کن پودر شد. برای تهیه اسانس از دستگاه کلونجر استفاده شد. اسانس‌های حاصل از گیاهان رزماری و نعناع فلفلی با استفاده از روش تقطیر توسط GC-MS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته‌ها:** متیل‌سیکلوهگزانول ۹۰/۳۵ درصد و منتون ۲۳/۰۱ درصد به‌ترتیب اجزای اصلی گیاه نعناع فلفلی، Camphor ۲۳/۲۲ درصد و Alpha-pinene ۱۷/۹۹ درصد گیاه رزماری به‌دست آمد. اندازه ذرات نانومولسیون، نانوکامپوزیت، نانوکپسوله و نانولیپوزوم اسانس نعناع فلفلی به ترتیب ۳/۳۴، ۲۷/۱۴، ۱۹/۲۵ و ۱۹/۰۱ نانومتر به‌دست آمد و در رزماری ۲/۶۹، ۷۱/۰۷، ۳۵/۰۲ و ۲۵/۳۸ نانومتر به‌دست آمد. اسانس خالص و حالت‌های نانو اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی خواص ضد میکروبی مناسبی بر علیه هر دو گروه باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی نشان داد که حالت‌های نانو نسبت به حالت خالص اسانس خواص ضد میکروبی بالایی دارد. نتایج نشان داد باکتری‌های گرم‌مثبت حساس‌ترین باکتری‌ها و بیشترین تأثیر و باکتری‌های گرم‌منفی مقاوم‌ترین و کمترین تأثیر را در برابر حالت‌های مختلف نانو داشت.

**نتیجه‌گیری:** اندازه‌ی ذرات تمامی فرمولاسیون‌ها در طی زمان اختلاف معنی‌داری نشان دادند، اندازه ذرات نانوذره‌ها نسبت به نانوکپسوله، نانوکامپوزیت و نانولیپوزوم‌ها تفاوت کمی داشت، اما در حالت کلی همه نمونه‌ها پایدار بوده به‌صورتی که تغییر اندازه ذرات پس از گذشت یک ماه قابل قبول بود. در آزمون اثرات ضد میکروبی، تأثیر اسانس در دو حالت آزاد و کپسوله شده در حامل‌های لیپیدی در برابر باکتری گرم‌مثبت بیشتر از باکتری گرم‌منفی بود، همچنین میزان بازدارندگی نانوذره و نانولیپوزوم در مقایسه با اسانس آزاد در همه باکتری‌ها (استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیا کلی، موراکسلا کاتارالیس) بالاتر بود.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Teimouri S, Pouryousef Miandoab M, Jabalameli L, Aramideh S, Haddadi A. The Effect of Nanoparticle, Nanocomposite, Nanocapsule, and Liposome Forms of Peppermint (*Mentha piperita L.*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) Essential Oils in Reducing the Biofilm of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. Razi J Med Sci. 2023;30(6): 327-344.

\*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با 3.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.

## The Effect of Nanoparticle, Nanocomposite, Nanocapsule, and Liposome Forms of Peppermint (*Mentha piperita* L.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Essential Oils in Reducing the Biofilm of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria

**Sahar Teimouri:** PhD Student, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

**Mahmoud Pouryousef Miandoab:** Associate Professor, Department of Agronomy and Agroecology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran, (\*Corresponding author) [shojaei.vahid@yahoo.com](mailto:shojaei.vahid@yahoo.com)

**Leila Jabalameli:** Assistance Professor, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

**Shahram Aramideh:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

**Azam Haddadi:** Associate Professor, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

### Abstract

**Background & Aims:** One of the most important factors of pathogenicity and multidrug resistance of bacteria is the formation of biofilm. Bacterial biofilm includes communities of microorganisms, extracellular products, and materials in the space between them that are attached to a surface. The thickness of the biofilm can be significant from a single cell layer to a community depending on the adhesive polymeric environment in which it is located. In the 21st century, resistance to antibiotics was considered one of the biggest threats in the world, which is known to be a great danger to the health of humans and animals, and it has been proven to be an effective disaster. Finally, in the last few years, scientists have thought of replacing some organic and natural substances with antibiotics in order to minimize the harm caused by them, until the phenomenon of antibiotic resistance is raised as an important problem in health care. This feature spreads antibiotic-resistant microbial pathogens. Bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, Coagulase-negative staphylococcus, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterococcus*, and *Escherichia coli*, which are receiving a lot of attention now and can be said to be the most resistant bacteria. It is compared to antibiotics and leads to the most dangerous infections in humans and animals. *Staphylococcus aureus* can produce multi-layered biofilm in one layer of glycocalyx. Due to its special structure and the presence of extracellular polymeric substances, biofilm reduces the penetration of antimicrobial agents. It is difficult to treat infections caused by biofilm-forming bacteria, and due to the distinctive properties of biofilms and their role in reducing the penetration of drugs into bacterial cells, biofilm-forming bacteria have high drug resistance and need to be used. There are different treatment methods to treat this type of infection. *Pseudomonas-aeruginosa* is also one of the most important hospital pathogens. One of the treatment problems of this bacterium is its antibiotic resistance to common antibiotic treatments, which is related to biofilm production. One of the most important effects of antibiotics is drug resistance. Antibiotic resistance occurs when bacteria change in a way that reduces or completely eliminates the effect of the drug. This modified bacterium survives and causes new damage to body systems. In the last few years, scientists have been thinking of replacing some organic and natural substances instead of antibiotics in order to minimize the harm caused by them, until the phenomenon of antibiotic resistance has been raised as an important problem in health care. This feature spreads antibiotic-resistant microbial pathogens. Plant secondary metabolites such as essential oils and plant extracts have been investigated for their antimicrobial effect and it has been found that most of the plant essential oils extracted from plants have insecticidal, antifungal, antiparasitic, antibacterial, antiviral, antioxidant and cell killing properties. The active compounds of plant extracts and essential oils are volatile and some of them are hardly soluble in water and are easily oxidized. One of the problems of essential oils is their effectiveness. The method that can be suggested to increase the

### Keywords

Nanoparticle,  
Nanocomposite,  
Nanocapsule,  
Nanoliposome,  
Peppermint,  
Rosemary

Received: 22/04/2023

Published: 08/09/2023

effectiveness and consumption of essential oils is to convert the essential oil into a nano form or use nanocomposite, nanoparticle, nanocapsule and liposome for further penetration into cells. Some studies show that encapsulated essential oils increase the antimicrobial and antioxidant properties of the compounds and also cause their properties to be preserved for a longer period of time. Due to their antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer properties, essential oils can be suitable substitutes in food and medicine fields and to deal with bacterial infections and pathogenic bacteria. They can also be an alternative to antibiotics. One of the latest methods to improve the transmission and effect of plant essential oils is the use of nanotechnology and the production of nanoparticle, nanocomposite, nanocapsule and liposome. Europe, Africa and Asia grow. This plant has received much attention in this family due to its aromatic compounds, antioxidant compounds and special biological characteristics. In recent studies, the antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant effects and activities of rosemary have been investigated. The essential oils obtained from rosemary and peppermint plants were analyzed by GC and GC-MS using the distillation method. Methyl cyclohexanol (35.90%) and menthone (23.01%) were the main components of the peppermint plant, camphor (23.22%), and alpha-pinene (17.99%) of the rosemary plant, respectively. The particle size of nano-emulsion, nano-composite, nano-capsule, and nano-liposome of both essential oils (rosemary and peppermint) was determined below 100 nm, which was confirmed by scanning electron microscope (FESEM) analysis. The antibacterial activity of *Mentha piperita* L and *Rosmarinus officinalis* L against gram-positive and gram-negative bacteria was determined using the MIC method.

**Methods:** The samples of rosemary and peppermint plants tested in this research were collected from the growth center of agricultural technology units of Urmia University and were approved by botanical specialists of Urmia University. The collected plants were completely dried in the dark and then the dried plants were powdered by a blender. To prepare essential oil, essential oil was extracted from the Cloninger machine available in the laboratory of Urmia University.

**Results:** Nanocapsules containing rosemary and peppermint essential oils were obtained with particle sizes of 19.25 and 35.2, respectively. Nanocomposite containing rosemary and peppermint essential oil was obtained with particle sizes of 27.14 and 71.7, respectively. Nanoliposomes containing rosemary and peppermint essential oils were obtained with particle sizes of 19.1 and 25.38, respectively.

**Conclusion:** The particle size of all formulations showed a significant difference over time, the particle size of nano emulsions was slightly different compared to nano-capsules, nano-composites, and nanoliposomes, but in general, all samples were stable. If the change in particle size was acceptable after one month. In the test of antimicrobial effects, the effect of essential oil in both free and encapsulated states in lipid carriers against Gram-positive bacteria was higher than Gram-negative bacteria, and the inhibition rate of nanoemulsion and nanoliposome compared to free essential oil in all bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*), *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*) and *Candida albicans* fungus was higher. nanoemulsion also had more antimicrobial effects compared to nanoliposomes.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Teimouri S, Pouryousef Miandoab M, Jabalameli L, Aramideh S, Haddadi A. The Effect of Nanoparticle, Nanocomposite, Nanocapsule, and Liposome Forms of Peppermint (*Mentha piperita* L.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Essential Oils in Reducing the Biofilm of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Razi J Med Sci.* 2023;30(6): 327-344.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

## مقدمه

سواد رسانه‌ای و اطلاعاتی به مجموعه‌ای از مهارت‌ها و یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی و مقاومت چند دارویی باکتری‌ها، تشکیل بیوفیلم است (۱). بیوفیلم باکتری‌ها شامل تجمعاتی از میکروارگانیسم‌ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود در فضای بین آن‌ها است که به یک سطح متصل شده‌اند. ضخامت بیوفیلم می‌تواند از یک لایه تک سلولی تا یک جامعه، قابل توجه باشد که بستگی به محیط پلیمری چسبناک که در آن قرار گرفته است، دارد (۲). در قرن بیست و یکم میلادی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یکی از بزرگترین تهدید در جهان به شمار می‌رفت که خطر بزرگی برای سلامت انسان‌ها و حیوانات شناخته شده است و ثابت شده است که یک بلائی موثر در مبارزه با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا است (۳). در نهایت در چند سال اخیر دانشمندان به فکر جایگزین کردن بعضی از مواد آلی و طبیعی به جای آنتی‌بیوتیک‌ها بوده‌اند تا مضرات ناشی از آن‌ها را به حداقل برسانند تا این که پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان یک مشکل مهم در مراقبت‌های بهداشتی مطرح شده است. این ویژگی، پاتوژن‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک را گسترش می‌دهد (۴).

باکتری‌هایی مانند *پسودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوک کواگولازمنفی*، *سالمونلا*، *شیگلا*، *انتروکوکوس* و *اشریشیاکلی* که اکنون توجه زیادی به آنها می‌شود و می‌توان بیان کرد که به‌عنوان مقاوم‌ترین باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد و منجر به خطرناک‌ترین عفونت‌ها در انسان و حیوانات می‌شوند (۵). *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند بیوفیلم چند لایه در یک لایه گلیکوکالیکس تولید کند. بیوفیلم به دلیل ساختار خاص خود و وجود مواد پلیمری خارج سلولی باعث کاهش نفوذ عوامل ضد میکروبی می‌شود. درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مولد بیوفیلم مشکل است و به دلیل خواص متمایز و نقش بیوفیلم‌ها در کاهش نفوذ دارو به داخل سلول باکتریایی، باکتری‌های مولد بیوفیلم مقاومت دارویی زیادی داشته و نیاز به استفاده از روش‌های درمانی متفاوتی برای درمان این نوع عفونت‌ها وجود دارد (۶). *پسودوموناس آئروژینوزا* نیز یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی است. یکی

از مشکلات درمانی این باکتری، مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن به درمان‌های رایج آنتی‌بیوتیکی است که با تولید بیوفیلم مرتبط می‌باشد (۷). یکی از مهمترین اثرات آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت دارویی است. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها وقتی ایجاد می‌شود که باکتری به گونه‌ای تغییر کند که اثر دارو را کم کند یا کاملاً از بین ببرد. این باکتری تغییر یافته زنده می‌ماند و آسیب‌های جدیدی به سیستم‌های بدن وارد می‌کند (۸).

یکی از مشکلات اسانس‌ها تأثیرپذیری آن‌ها است، روشی که برای افزایش تأثیرپذیری و میزان مصرف اسانس‌ها قابل پیشنهاد است تبدیل اسانس به فرم نانو یا استفاده از نانوذره، نانوکامپوزیت، نانوکپسوله و نانولیپوزوم برای نفوذ بیشتر به سلول است (۹). برخی از مطالعات نشان می‌دهد اسانس‌های نانو شده خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات را افزایش دهد و همچنین سبب حفظ خواص آن‌ها برای مدت طولانی‌تر شود (۱۰). اسانس‌ها به دلیل ویژگی ضد میکروبی، ضد اکسیدانی، ضد التهابی و ضد سرطان می‌توانند جایگزین مناسبی در زمینه‌های غذایی و دارویی و برای مقابله با عفونت‌های باکتریایی و باکتری‌های بیماری‌زا باشند. همچنین می‌توانند یکی از موارد جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند (۱۱). یکی از جدیدترین روش‌ها به منظور بهبود انتقال و تأثیر اسانس‌های گیاهی استفاده از فناوری نانو و تولید نانو ذره، نانوکامپوزیت، نانوکپسوله و لیپوزوم اسانس‌های گیاه رزماری و نعناع فلفلی می‌باشد (۱۲).

نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita L.* و نام رایج *Peppermint* یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که متعلق به خانواده *Lamiaceae* است. اما از نظر شیمیایی، برگ‌ها حاوی اسانس (۴-۵ درصد)، فلاونوئیدها، تانن‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک پلی‌فنل، تری‌ترپن، توکوفرول‌ها، کاروتنوئیدها و موادمعدنی هستند (۱۳). نعناع فلفلی ۱-۱/۰ درصد روغن فرار تولید می‌کند که عمدتاً از منتول، منتون، منتوفوران و منتیل‌استات تشکیل شده است. از کاربردهای دارویی آن می‌توان به خنک‌کنندگی، تقویت معده، ضد تب، ضد سرفه، ضد استفراغ و ضد عفونی‌کننده التهاب ریه اشاره کرد. منتول به‌عنوان یک ترکیب ضد عفونی‌کننده مهم نیز شناخته می‌شود که اثرهای آنتی‌بیوتیکی قوی

دارد (۱۴).

رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis L.* از خانواده *Lamiaceae* است. در شرایط طبیعی، می‌تواند حدود ۱ تا ۲/۵ متر ارتفاع داشته باشد. از نظر شیمیایی رزماری حاوی مقادیر قابل توجهی از مواد فعال بیولوژیکی اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، ترینها هستند که عمده اجزای آنها  $\alpha$ -پینن، بتا-پینن، کامفن، بورنتول، کامفور، لینالول و  $\beta$ -کاریوفیلین می‌باشد. مواد یافت شده در اکثر روغن‌ها عبارتند از:  $\beta$ -میرسن، بورنیل استات، وربنون، لیمونن و سابینن که ترکیبات ترینها هستند. در آنها همچنین برخی فلاونوئیدها را نیز یافته‌اند مثل: لوتئولین، آپیزین، دیوسمتین، هیسپیدولین و هسپریدین (۱۵، ۱۶). رزماری می‌تواند چندین اثر دارویی را به دلیل تعامل بین مولکول‌های گیاه و سیستم‌های آلی افزایش دهد. اثرات نشان داده شده توسط این گیاه عبارتند از: توانایی کاهش آسم، تصلب شرایین، آب مروارید، قولنج کلیوی، سمیت کبدی، زخم معده، بیماری‌های التهابی، بیماری ایسکمیک قلبی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی رزمارینیک اسید کنترل هیپرکلسترولمی و استرس اکسیداتیو و تسکین خستگی جسمی و ذهنی کاهش فشار خون میوکارد با اسید رزمارینیک اثر ضدزخم کاهش پراکسیداسیون لیپید در قلب و مغز اثرات ضد رگ‌زایی و محافظت عصبی کارنوزیک اسید و کارنوزول پیشگیری از مشکلات مربوط به آترواسکلروز اثرات ضدسرطانی و ضدتکثیر ضدویروسی و اثرات ضد میکروبی ظرفیت‌های محافظ کبدی، عصبی و محافظت کننده رادیویی ضد جهش‌زایی کاهش قند خون شل کننده عضلات و درمان آلرژی پوستی و توانایی درمان رفتار افسردگی را نام برد (۱۷، ۱۸).

نانوپزشکی، کاربرد فناوری نانو در حوزه‌های مختلف علوم پزشکی و سلامت است. یکی از این حوزه‌ها داروسازی و دارورسانی است. سیستم‌های تحویل دارو را می‌توان به عنوان ابزاری قدرتمند برای درمان موثر بیماری‌ها تعریف کرد که قادر به انتقال عوامل درمانی به صورت انتخابی به نقطه هدف می‌باشند، از جمله مزایای این سیستم‌ها کاهش عوارض جانبی نامطلوب در

بافت‌های طبیعی، برای محافظت از ترکیبات در برابر تخریب آنزیمی و به حداکثر رساندن اثربخشی داروهای درمانی می‌باشد. امروزه دانش نانو در رابطه با تکنولوژی‌های جدید کمک بزرگی در مطالعه میکروبیولوژی دارد که شامل نانوتکنولوژی در تمام زمینه‌ها از جمله در کنترل بیماری‌های عفونی باکتریایی می‌باشد (۱۲). نانوتکنولوژی یک حوزه چند رشته‌ای است که طیف وسیعی از مواد و فرآیندها را در علوم شیمیایی، فیزیکی، بیولوژیکی، الکترونیکی و مهندسی را در بر می‌گیرد. تمرکز آن بر ساخت، تعیین خصوصیات و آزمایش مواد در محدوده نانومقیاس، تقریباً بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است. حداقل اندازه ذرات، در رابطه با سطح رشد، خواص منحصر به فرد و جدیدی را نشان می‌دهد و پتانسیل گسترده‌ای را برای استفاده‌های تکنولوژیکی ایجاد می‌کند (۱۹).

نانوامولسیون و نانوکپسوله یکی از شاخه‌های فناوری نانو می‌باشد که به‌طور وسیعی در تهیه اسانس‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. کپسوله‌کردن تکنیک بسته بندی اجزا و ترکیبات حساس در داخل یک پوشش یا دیواره است، تا از تأثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی محیطی، اکسیداسیون و تبخیر مصون بمانند. با استفاده از این روش ضمن جلوگیری از هدر رفتن ترکیبات فرار و حساس به شرایط محیطی، می‌توان آن‌ها را تحت شرایط کنترل شده‌ای رها کرد (۲۰). نانولیپوزوم‌ها وزیکول‌های کلونیدی متشکل از لیپیدهای قطبی به ویژه فسفولیپیدها بوده که در حضور مولکول‌های آب ساختارهای کروی دو لایه‌ای را ایجاد می‌کنند (۲۱). نانوذرات کامپوزیتی ذرات نانومقیاس جامد هستند که از حداقل دو ماده متفاوت تشکیل شده‌اند که می‌توانند از طریق روش‌های مکانیکی یا شیمیایی تولید شوند (۲۲). سیستم‌های تحویل دارو از پلیمرهای طبیعی به دلیل سازگاری زیستی و غیرسمی بودن آن‌ها اهمیت (۲۳) برای اندازه‌گیری سائز ذرات نانوامولسیون‌های سنتز شده از روش پراکندگی نوردینامیکی استفاده شد پراکندگی نوردینامیکی یک نوع روش فیزیکی است که برای تعیین توزیع اندازه‌ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون‌ها استفاده می‌شود که یک نوع روش

اسانس از دستگاه کلونجر موجود در آزمایشگاه دانشگاه ارومیه استفاده شد. جداسازی و استخراج اسانس‌ها بدین گونه بود که ۱۰۰ گرم از اجزای گیاهان نعنای فلفلی و رزماری را به‌صورت جداگانه پودر شده و به همراه ۷۰۰ میلی‌لیتر آب داخل بالن ریخته و تحت تقطیر جداگانه قرار گرفت. پس از خالص‌سازی و خروج آب از هر کدام به اندازه ۲۰ میلی‌لیتر اسانس استخراج شد.



شکل ۱- مراحل استخراج اسانس‌ها

تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC-MS) با استفاده از Hewlett-Packard 5973 با ستون HP-5MS، (۳۰ متر در ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر) انجام شد. دمای ستون به مدت ۳ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته و تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۸ درجه سانتی‌گراد در دقیقه برنامه‌ریزی شد و به مدت ۵ دقیقه در ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. سرعت جریان هلیوم به‌عنوان گاز حامل (۱ میلی‌لیتر در دقیقه) بود. MS در ۷۰ eV گرفته شد. در راستای تهیه نانو امولسیون اسانس‌ها، ۱۰ گرم از تویین ۱۰ و ۹۰ میلی‌لیتر آب را با همزن مغناطیسی و بدون حرارت حل کرده و ۳ گرم اسانس را به آن اضافه کرده و محلول را مدت یک دقیقه روی ورتکس قرار داده تا کدر شود. محلول کدر را به مدت ۳۰ دقیقه تحت تاثیر امواج فراصوت دستگاه اولتراسونیک قرار داده تا هموژنیزه شده و رنگ محلول شفاف شد.

برای تهیه نانوکامپوزیت، از ۷۰٪ ترکیب محلول سدیم آلژینات و ۳۰٪ اسانس استفاده گردید. همچنین نانوکامپوزیت حاوی ۳٪ نانورس از طریق انحلال نانورس در آب مقطر با هم زن مغناطیسی به مدت ۲۴ ساعت در

غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده‌ی چند نانومتر تا چند میکرون به‌کار می‌رود و به برهمکنش نور با ذرات بستگی دارد. در فناوری‌های اخیر، ذراتی با قطر کمتر از نانومتر نیز با این روش قابل اندازه‌گیری هستند. این روش که به نوعی به برهمکنش نور با ذرات بستگی دارد.

محققان به تازگی به این نتیجه رسیده‌اند که بسیاری از اسانس‌ها خواص ضد میکروبی داشته و می‌توان از آنها به‌عنوان گزینه دوست‌دار محیط زیست به‌منظور از بین بردن باکتری‌ها و میکروب‌های مضر و بیماری‌زا استفاده کرد (۲۴). خاصیت ضد میکروبی اسانس‌ها بر پایه آب‌گریزی آنها استوار است. اسانس‌ها نامحلول در آب هستند و به درون غشای سلول (میکروب) نفوذ می‌کنند و باعث نشت سیتوپلاسم به خارج از سلول و در طی آن تجزیه پروتئین‌های غشا، لخته شدن سیتوپلاسم، خروج نیروی محرکه پروتونی و مرگ سلول را رقم می‌زنند. تئوری‌های زیادی درباره تاثیر اسانس و عصاره‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیان شده است که حساسیت بالای باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی به علت وجود اختلاف در دیواره سلولی می‌باشد (۲۵). لذا این پژوهش قصد دارد تولید نانوذره، نانوکامپوزیت، نانوکپسوله و لیپوزوم حاوی اسانس نعنای فلفلی و رزماری جهت بررسی افزایش تاثیرپذیری به داخل باکتری‌ها، بیوفیلم و مهار باکتری‌های استافیلوکوکوس آروئوس و پسودوموناس آئروژینوزا آنها می‌باشد.

## روش کار

این پژوهش از کمیسیون اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری با کد IR.IAU.SARI.REC.1402.247 به تصویب رسید. نمونه‌های گیاهی رزماری و نعنای فلفلی مورد آزمایش در این تحقیق در فصل تابستان از مرکز رشد واحد فناوری کشاورزی جهاد دانشگاهی ارومیه جمع‌آوری و توسط متخصصین گیاه‌شناسی دانشگاه ارومیه مورد تایید قرار گرفت. گیاهان جمع‌آوری شده در تاریکی کامل خشک گردید و سپس گیاهان خشک شده به وسیله دستگاه مخلوط‌کن پودر شد. برای تهیه

(کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر)، لازم و ضروری است ابتدا یک قطره از هر نمونه‌ی نانو حامل‌ها بر روی یک فویل آلومینیومی انتقال داده و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه الکترونی‌رویشی تصویربرداری شد. در این پژوهش از دو گونه سویه‌های باکتریایی استاندارد و بالینی شامل *Staphylococcus aureus* ATCC 1764 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1310 از بانک میکروبی مرکز تحقیقات داروی دانشکده میکروبی دانشگاه تبریز تهیه شد. سپس میکروارگانیسم‌های به‌دست آمده از کشت غنی‌سازی میکروارگانیسم‌ها در ۱ میلی‌لیتر براث مولر هینتون، مرک، آلمان، انکوبه شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار، مرک، آلمان کشت داده شده و در یک لوله آزمایش دیگر از محلول نیم‌مک‌فارلند اضافه و سپس به‌صورت چشمی کدورت سوسپانسیون باکتریایی را با کدورت لوله نیم‌مک‌فارلند در مقابل یک صفحه سفید با خطوط سیاه مشخص مقایسه و در نهایت سوسپانسیون حاصل برای مطابقت با نیم مک‌فارلند توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر سنجیده شد. پس از حفاری، ۱۰۰ میکرولیتر محلول با غلظت موثر در DMSO (دی متیل سولفوکسید، مرک، آلمان) در هر دیسک ریخته شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد طی ۲۴ ساعت. قطر منطقه مهار اندازه‌گیری شد. مطالعه حاضر نشان داد که نمونه‌ها فعالیت قابل توجهی را در برابر تمامی باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی نشان می‌دهد. نمونه‌ها فعالیت مهار بر علیه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و پseudomonas آئروژینوزا را نشان داد. این نتایج جالب هستند و این مطالعه اهمیت همبستگی بین محتوای شیمیایی روغن و فعالیت‌های ضدباکتریایی را تایید می‌کند. برای سنجش قدرت تشکیل بیوفیلم در هر سویه باکتری‌ها، ابتدا یک کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته باکتری در محیط کشت تریپتیک سوی براث (Tryptic soy broth -TSB) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تهیه شد و در نهایت انکوبه شد. سپس رقیق‌سازی باکتریایی به نسبت ۱ به ۱۰۰ صورت گرفته در مرحله بعد، به

دمای محیط تهیه خواهد گردید. محلول ۳۰ درصد اسانس‌ها به محلول نانورس اضافه و توسط هموژنایزر دو محلول به مدت ۵ دقیقه هموژن شده و سپس به مدت ۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد. گلیسرول به میزان ۵۰٪ وزن پلیمر به محلول اضافه و با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه ترکیب شده و محلول حاصله پس از خالص‌سازی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد.

برای تهیه نانو کپسول اسانس‌ها در این مطالعه، ۵ گرم از اسانس و ۵ گرم توپین ۸۰ را توسط همزن مخلوط کرده و آرام آرام به محلول سدیم آلژینات ۱٪ (۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۱ میلی‌لیتر محلول سدیم آلژینات) اضافه کرده و به مدت ۲ ساعت بدون حرارت همزده تا رنگ محلول کدر شد. محلول به مدت ۱۰ دقیقه تحت تاثیر امواج فراصوت دستگاه اولتراسونیک قرار گرفت. برای تهیه نانو لیپوزوم، ۲ گرم لسیتین و ۲ گرم توپین ۸۰ را به همراه ۳۸ گرم آب مقطر به مدت ۵ ساعت توسط مگنت مغناطیسی و بدون حرارت همزده تا محلولی یکنواخت به‌دست آمد. سپس ۴ گرم از اسانس را به دیسپرسیون آبی لسیتین اضافه کرده و مخلوط را به مدت ۱۰ دقیقه تحت شرایط سونیکاسیون قرار داده و سپس برای ریز شدن اندازه ذرات به مدت ۲ دقیقه تحت تاثیر امواج فراصوت اولتراسونیک قرار داده شد. در راستای تعیین اندازه ذرات نانو، روش تفرق دینامیک نور (DLS= Dynamic light scattering) که طیف‌سنجی ارتباط فوتونی (PCS= Photon correlation spectroscopy) هم نامیده می‌شود، برای اندازه‌گیری اندازه ذرات در محیط مایع مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای تعیین اندازه ذرات نانواسانس‌ها را داخل شیشه پنی‌سیلین ریخته و درب آن را محکم می‌بندیم و با فویل آلومینیومی آن‌ها رو می‌پوشانیم و برای آنالیز به‌وسیله دستگاه DLS به دانشگاه تبریز ارسال کردیم که اندازه ذرات نانوذره، نانوکامپوزیت، نانوکپسوله و نانولیپوزوم در هر دو اسانس (رزماری و نعناع فلفلی) زیر ۱۰۰ نانومتر تعیین شد.

برای بررسی مورفولوژی نانوحامل‌ها، تأیید اندازه و پایداری آن‌ها طی مدت زمان نگهداری در مقیاس نانو

دقیقه ماکروپلیت‌ها را با آب شسته تا رنگ‌های اضافی از چاهک‌ها خارج شوند تا در دمای اتاق خشک شدند. پس از خشک شدن ماکروپلیت‌ها ۱۲۰ میکرولیتر از محلول اسید استیک ۳۳ درصد در آب، به‌منظور حل کردن رنگ متصل به چاهک‌ها، به هر چاهک اضافه شد.

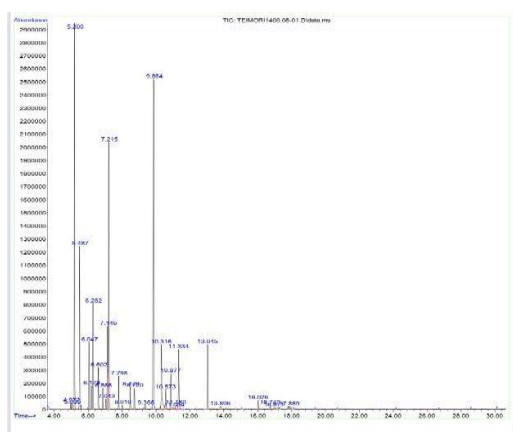
### یافته‌ها

در مجموع ۵۰ ترکیب از اسانس گیاه نعناع فلفلی توسط تجزیه‌های GC/MS شناسایی شد (جدول ۱). از میان آن‌ها Methyl-Cyclohexanol با ۳۵/۹۰ درصد و Menthone با ۲۳/۰۱ درصد اجزای عمده اسانس را تشکیل داده است (شکل ۲).

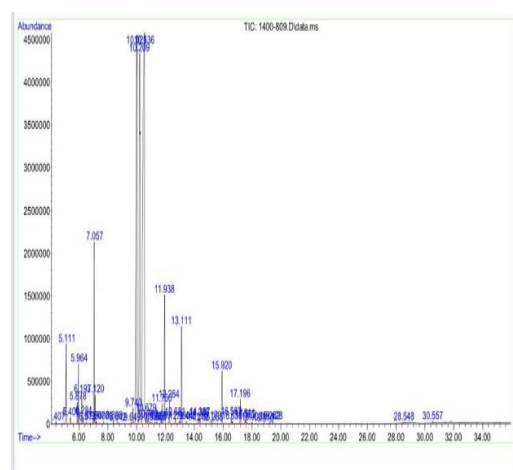
ماکروپلیت‌های الیزای ته صاف با جنس پلی استرین ۲۴ خلنه‌ای، ۱۲۰ میکرولیتر از محلول باکتری تلقیح شده ریخته شد، پس از این که ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد در درون انکوباتور قرار داده شد چاهک‌ها به آرامی ۳ مرتبه توسط ۲۰۰ میکرولیتر قرص PBS شسته و به صورت وارونه در دمای اتاق قرار داده شد تا ماکروپلیت‌ها خشک شوند. جهت فیکس کردن بیوفیلیم‌ها از متانول ۹۹ درصد استفاده شد به این صورت که به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر از متانول داخل چاهک‌ها اضافه و پس از ۱۵ دقیقه الکل را خارج کرده تا ماکروپلیت‌ها خشک شدند. در مرحله بعد به تمام چاهک‌ها ۱۲۰ میکرولیتر از رنگ کریستال ویوله ۰/۲٪ به منظور رنگ‌آمیزی بیوفیلیم اضافه شد و پس از ۲۰

جدول ۱- اجزای شناسایی شده اسانس نعناع فلفلی توسط تجزیه‌های GC/MS

شماره	نام ترکیب	زمان	درصد	شماره	نام ترکیب	زمان	درصد
۲۶	Z-3hexenyl	۱۱/۶۸۰	۰/۰۹٪	۱	Furan	۴/۴۰۷	۰/۰۴٪
۲۷	n-Valeric	۱۱/۷۶۰	۰/۴۴٪	۲	Alpha-Pinene	۵/۱۱۱	۱/۴۶٪
۲۸	Cyclohexanone	۱۱/۹۳۸	۳/۴۲٪	۳	Camphene	۵/۴۰۹	۰/۱۵٪
۲۹	2-Cyclohexen	۱۲/۲۶۴	۰/۶۵٪	۴	Sabinene	۵/۸۷۸	۰/۴۴٪
۳۰	Bicyclo heptane	۱۲/۲۸۱	۰/۱۶٪	۵	Beta-Pinene	۵/۹۶۴	۱/۱۹٪
۳۱	Lavandulyl Acetate	۱۲/۹۹۰	۰/۱۳٪	۶	Beta-Myrcene	۶/۱۹۳	۰/۵۸٪
۳۲	Menthyl acetate	۱۳/۱۱۱	۲/۴۸٪	۷	3-Octanol	۶/۲۸۴	۰/۲۱٪
۳۳	Cyclohexene, 4-methyl	۱۳/۴۴۸	۰/۰۶٪	۸	Sabinene	۶/۵۱۳	۰/۰۵٪
۳۴	Car-3-en-2-one	۱۴/۲۴۹	۰/۰۴٪	۹	Benzene	۶/۹۵۴	۰/۰۵٪
۳۵	Cyclopentane	۱۴/۳۳۵	۰/۱۶٪	۱۰	dl-Limonene	۷/۰۵۷	۴/۰۵٪
۳۶	Octyne	۱۴/۳۸۷	۰/۲۱٪	۱۱	Cineole	۷/۱۲۰	۰/۵۹٪
۳۷	Beta-Bourbonene	۱۵/۱۷۰	۰/۱۰٪	۱۲	Alpha-Ocimene	۷/۲۰۰	۰/۰۶٪
۳۸	Elemene	۱۵/۲۸۵	۰/۰۴٪	۱۳	Gamma-Terpinene	۷/۷۰۹	۰/۰۷٪
۳۹	Trans-Caryophyllene	۱۵/۹۲۰	۱/۳۲٪	۱۴	Alpha-Terpinolene	۸/۳۹۰	۰/۰۸٪
۴۰	Trans-bete-Farnesene	۱۶/۵۶۷	۰/۱۶٪	۱۵	Linalool	۸/۶۴۲	۰/۰۵٪
۴۱	Alpha-Humulene	۱۶/۶۳۰	۰/۰۶٪	۱۶	Tricyclo	۹/۶۴۹	۰/۰۷٪
۴۲	Germacrene-D	۱۷/۱۹۶	۰/۶۱٪	۱۷	Camphor	۹/۷۴۰	۰/۵۵٪
۴۳	Bicyclogermacrene	۱۷/۵۱۱	۰/۱۵٪	۱۸	Menthone	۱۰/۰۲۱	۲۳/۰۱٪
۴۴	Mint Furanine	۱۷/۵۶۲	۰/۲۰٪	۱۹	Menthofuran	۱۰/۲۰۹	۱۹/۸۵٪
۴۵	Delta-Cadinene	۱۸/۰۰۳	۰/۰۶٪	۲۰	Methyl-Cyclohexanol	۱۰/۵۳۶	۳۵/۹۰٪
۴۶	Eucalyptol	۱۸/۸۱۰	۰/۰۶٪	۲۱	D-Neoisomenthol	۱۰/۶۷۹	۰/۲۹٪
۴۷	Caryophyllene	۱۹/۲۶۲	۰/۰۸٪	۲۲	D-Isomenthol	۱۰/۷۸۲	۰/۱۹٪
۴۸	Naphthalene	۱۹/۴۲۸	۰/۰۸٪	۲۳	Bicyclo-hept2-ene-2-methano	۱۰/۹۵۹	۰/۰۴٪
۴۹	Dodecanoic	۲۸/۵۴۸	۰/۰۹٪	۲۴	Bicyclo-hept-3-ene-2-one	۱۱/۲۶۸	۰/۰۵٪
۵۰	5-Morpholino	۳۰/۵۵۷	۰/۰۶٪	۲۵	Benzoxepin	۱۱/۳۸۸	۰/۰۹٪



شکل ۳- کروماتوگرام TIC حاصل از دستگاه GCMS برای نمونه رزماری



شکل ۲- کروماتوگرام TIC حاصل از دستگاه GCMS برای نمونه نعناع‌فلغلی.

کامپوزیت، نانوکپسوله و نانولیپوزومی اسانس رزماری می‌باشد. در تصاویر b, d, f, h به ترتیب نانوذره، نانو کامپوزیت، نانوکپسوله و نانولیپوزومی اسانس نعناع‌فلغلی می‌باشد که تجمع بالا نانو ذرات، تمایز بین ذرات و محاسبه‌ی میانگین اندازه ذرات کار دشواری است و عدم وجود مرز مشخص میان ذرات، محاسبه‌ی اندازه ذرات را با خطا روبرو می‌کند. قطر خانو ذرات در بازه‌ی ۲۰ تا ۳۰ نانومتر متغیر است. نانوها اغلب دارای شکل کروی بوده

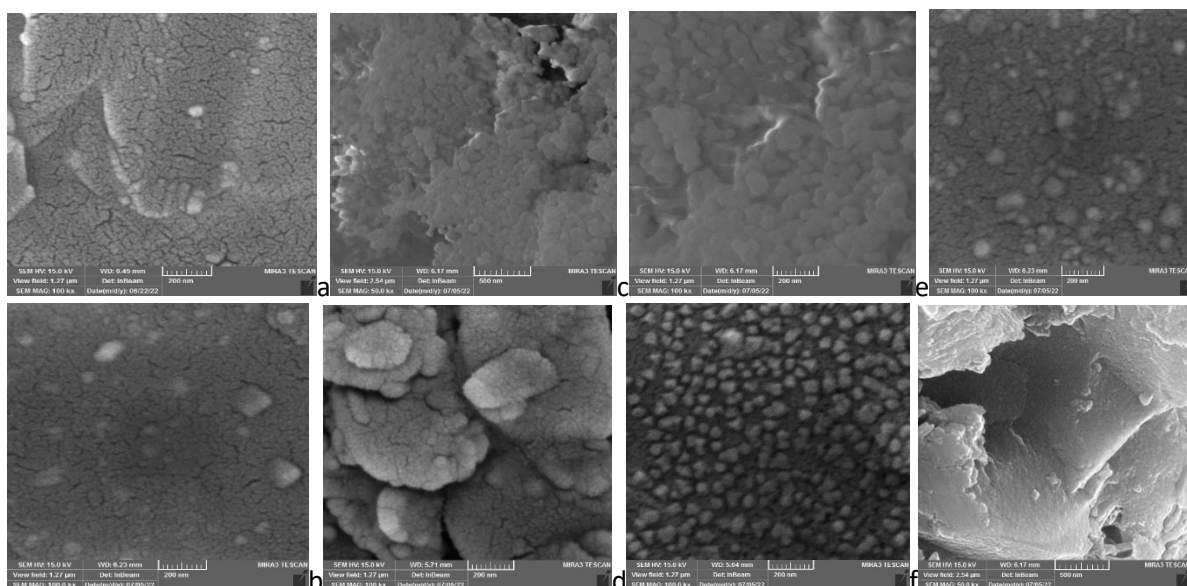
در اسانس گیاه رزماری در مجموع ۲۹ ترکیب شناسایی شد (جدول ۲). از میان آن‌ها Camphor با ۲۳/۲۲ درصد و Alpha-pinene با ۱۷/۹۹ درصد اجزای عمده اسانس رزماری را تشکیل داده است (شکل ۳). تصاویر FESEM مربوط به نانوذره، نانوکامپوزیت، نانوکپسوله و نانولیپوزومی گیاهان رزماری و نعناع‌فلغلی در شکل ۴ نمایش داده شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود در تصاویر a, C, e, g به ترتیب نانوذره، نانو

جدول ۲- اجزای شناسایی شده اسانس رزماری توسط تجزیه‌های GCMS

شماره	نام ترکیب	زمان	درصد	شماره	نام ترکیب	زمان	درصد
۱۶	Octadien	۸/۷۳۰	۱/۲۶ %	۱	Carene	۴/۹۷۲	۰/۲۵ %
۱۷	Cyclopenten	۸/۳۶۶	۰/۲۵ %	۲	Bicyclo [3.1.0] hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)	۵/۰۳۵	۰/۲۰ %
۱۸	Camphor	۹/۸۶۴	۲۳/۲۲ %	۳	Alpha-Pinene	۵/۲۰۰	۱۷/۹۹ %
۱۹	Borneol	۱۰/۳۱۶	۴/۴۴ %	۴	Camphene	۵/۴۸۷	۶/۷۰ %
۲۰	Cyclohexadie-1-ol,4-methyl-1-ethylethyl	۱۰/۵۷۳	۱/۱۱ %	۵	Beta-Pinene	۶/۰۴۷	۲/۸۸ %
۲۱	Alpha-4-trimethyl	۱۰/۸۷۷	۲/۱۵ %	۶	Octanone	۶/۱۷۹	۱/۰۸ %
۲۲	Cyclohexasiloxane	۱۱/۰۹۴	۰/۲۰ %	۷	Pyridineethanamine	۶/۲۸۲	۴/۳۷ %
۲۳	Santolina epoxide	۱۱/۱۸۰	۰/۷۴ %	۸	Alpha-Phellandrene	۶/۶۰۲	۱/۷۹ %
۲۴	Bicyclo (3.1.1) hept-3en-2-one4,6,6, trimethyl	۱۱/۳۳۴	۳/۵۶ %	۹	Carene	۶/۸۶۶	۰/۹۲ %
۲۵	Bicyclo (2.2.1) hepta -2-ol	۱۳/۰۴۵	۳/۳۱ %	۱۰	Banzene,1-methyl	۷/۰۴۳	۰/۵۰ %
۲۶	Caryophyllene	۱۳/۸۰۶	۰/۴۵ %	۱۱	Limonene	۷/۱۴۶	۵/۵۷ %
۲۷	Alpha-Caryophyllene	۱۶/۷۴۲	۰/۳۳ %	۱۲	Eucalyptol	۷/۲۱۵	۱۲/۸۹ %
۲۸	Pentasiloxane	۱۶/۹۷۱	۰/۳۰ %	۱۳	Cyclohexadiene	۷/۷۹۸	۱/۵۲ %
۲۹	Alpha-Caryophyllene	۱۷/۸۶۹	۰/۲۴ %	۱۴	Terpineol	۸/۰۱۰	۰/۲۶ %
-	-	-	-	۱۵	Cyclohexene,1-methyl-4-(1-methyle thylidene)	۸/۴۷۹	۱/۱۴ %

مقادیر میانگین  $\pm$  انحراف معیار قطر هاله مهاری رشد استافیلوکوکوس اورئوس به روش انتشار دیسک کربی باینر متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس رزماری و نعناع‌فلغلی به ترتیب در (جدول ۷ و ۸) نشان داده شد. جهت مقایسه قطر هاله مهاری رشد استافیلوکوکوس اورئوس به روش انتشار دیسک کربی باینر متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس رزماری و نعناع‌فلغلی از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و آزمون تکمیلی توکی استفاده گردید.

و دارای سطح صاف و بدون تخلخل هستند. همچنین میانگین اندازه‌ی ذرات بین صفر تا ۱۰۰ نانومتر به دست آمد. اندازه و توزیع اندازه ذرات سیستم‌های کلوئیدی نانوذره، نانوکامپوزیت‌ها، نانوکپسوله‌ها و نانولیپوزوم‌ها به وسیله دستگاه DLS موجود در دانشگاه تبریز اندازه گیری شد (جدول ۳، ۴، ۵، ۶) که اندازه ذرات نانوذره، نانوکامپوزیت، نانوکپسوله و نانولیپوزوم هر دو اسانس (رزماری و نعناع‌فلغلی) زیر ۱۰۰ نانومتر تعیین شد (نمودار ۱ تا ۸).



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روشی نشر میدانی نانوذره (a, b)، نانوکامپوزیت (c, d) و نانوکپسوله (e, f) و نانولیپوزومی (g, h) گیاهان رزماری و نعناع‌فلغلی

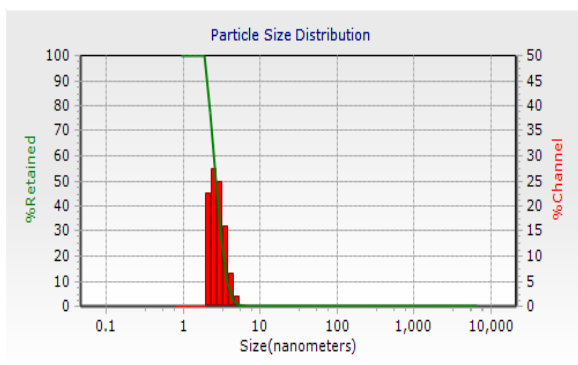
جدول ۵- اندازه ذرات نانوکپسوله اسانس نعناع‌فلغلی و رزماری

Peaks Summary			Peaks Summary		
Dia (نانومتر)	حجم %	عرض	Dia (نانومتر)	حجم %	عرض
۲/۳۵	۱۰۰	۲۱/۱۹	۳/۳۴	۱۰۰	۱/۷۸
۲۵/۱۹	۱۰۰	۷/۰۲	۲/۶۹	۱۰۰	۱/۳۱

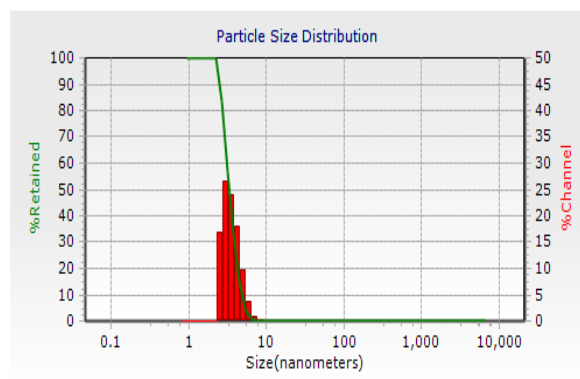
جدول ۳- اندازه ذرات نانومولسیون اسانس نعناع‌فلغلی و رزماری

جدول ۶- اندازه ذرات نانولیپوزوم اسانس نعناع‌فلغلی و رزماری

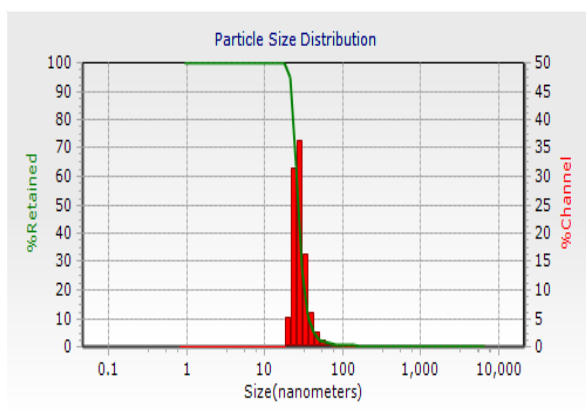
Peaks Summary			Peaks Summary		
Dia (نانومتر)	حجم %	عرض	Dia (نانومتر)	حجم %	عرض
۳۸/۲۵	۱۰۰	۱۱/۷۱	۷/۷۱	۱۰۰	۶۷/۹
۱/۱۹	۱۰۰	۶/۰۸	۱۴/۲۷	۱۰۰	۱۰/۴۳



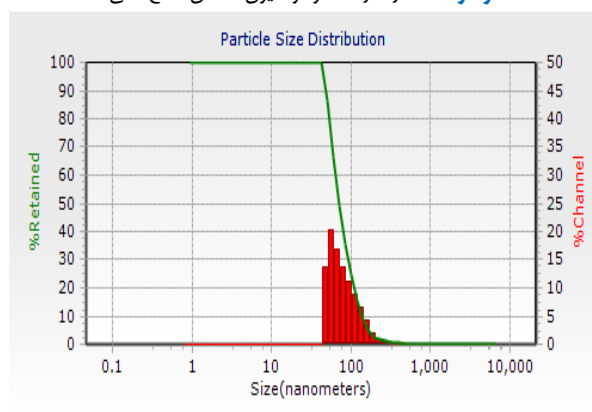
نمودار ۲- اندازه ذرات نانومولسیون اسانس رزماری.



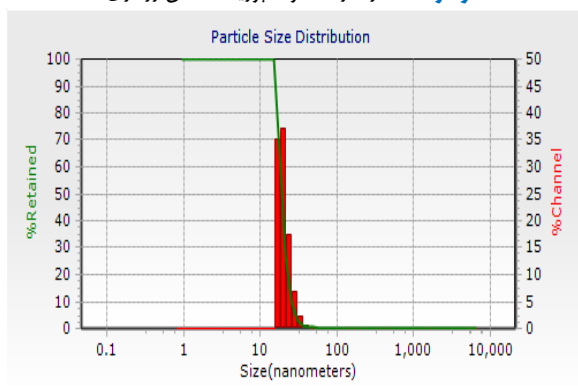
نمودار ۱- اندازه ذرات نانومولسیون اسانس نعنای فلفلی.



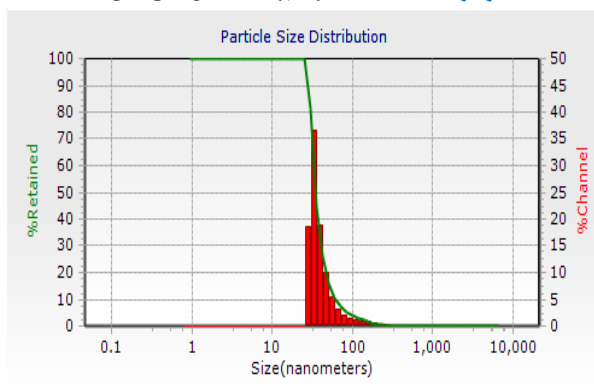
نمودار ۴- اندازه ذرات نانوکامپوزیت اسانس رزماری.



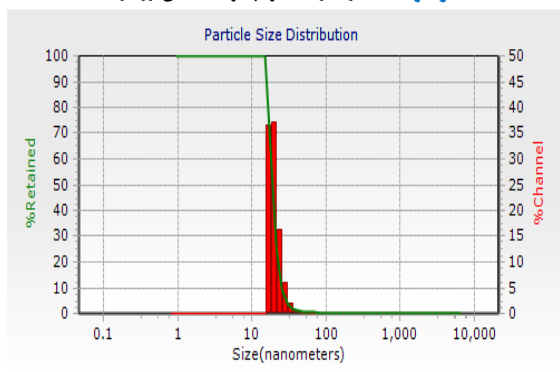
نمودار ۳- اندازه ذرات نانوکامپوزیت اسانس نعنای فلفلی.



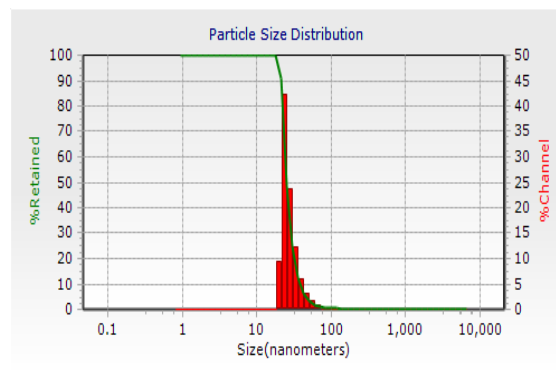
نمودار ۶- اندازه ذرات نانوکپسوله اسانس رزماری.



نمودار ۵- اندازه ذرات نانوکپسوله اسانس نعنای فلفلی.



نمودار ۸- اندازه ذرات نانولیپوزوم اسانس رزماری.



نمودار ۷- اندازه ذرات نانولیپوزوم اسانس نعنای فلفلی.

دارد. در کل نتایج آزمون تکمیلی توکی نشان داد میانگین قطر هاله مهاری رشد استافیلوکوکوس اورئوس متأثر از غلظت یک میلی گرم بر دسی لیتر فرم‌های اسانس خالص، فرم نانوذره، فرم لیپوزومی اسانس نعناع فلفلی نسبت به سایر غلظت‌ها و فرم نانوکپسوله و فرم نانوکامپوزیت نسبت به غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی گرم بر دسی لیتر به طور معنی داری بیشتر بوده است ( $P < 0/05$ ).

مقادیر میانگین  $\pm$  انحراف معیار قطر هاله مهاری رشد پسودوموناس آئروژینوزا به روش انتشار دیسک کربی بائر متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس رزماری و نعناع فلفلی به ترتیب در (جدول ۹ و ۱۰) نشان داده شد. جهت مقایسه قطر هاله مهاری رشد پسودوموناس آئروژینوزا به روش انتشار دیسک کربی بائر متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس رزماری و نعناع فلفلی از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و آزمون تکمیلی توکی استفاده گردید. نتایج حاکی از آن است که بین قطر هاله مهاری رشد پسودوموناس آئروژینوزا تحت تأثیر غلظت‌های مختلف فرم اسانس خالص ( $F_{(3,8)} = 51/00$  و  $P < 0/01$ )، فرم نانوذره ( $F_{(3,8)} = 37/86$ ) و فرم لیپوزومی ( $F_{(3,8)} = 115/00$  و  $P < 0/01$ )، فرم لیپوزومی

نتایج حاکی از آن است که بین قطر هاله مهاری رشد استافیلوکوکوس اورئوس تحت تأثیر غلظت‌های مختلف فرم اسانس خالص ( $F_{(3,8)} = 7/91$  و  $P < 0/01$ )، فرم نانوذره ( $F_{(3,8)} = 26/78$  و  $P < 0/01$ )، فرم لیپوزومی ( $F_{(3,8)} = 66/42$ ) و فرم نانوکپسوله ( $F_{(3,8)} = 69/18$  و  $P < 0/01$ ) و فرم نانوکامپوزیت ( $F_{(3,8)} = 41/28$  و  $P < 0/01$ ) اسانس رزماری تفاوت معنی داری وجود دارد. در کل نتایج آزمون تکمیلی توکی نشان داد میانگین قطر هاله مهاری رشد استافیلوکوکوس اورئوس متأثر از غلظت یک میلی گرم بر دسی لیتر فرم‌های نانوذره، فرم لیپوزومی، فرم نانوکپسوله و فرم نانوکامپوزیت اسانس رزماری نسبت به سایر غلظت‌ها و فرم اسانس خالص نسبت به غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی گرم بر دسی لیتر به طور معنی داری بیشتر بوده است ( $P < 0/05$ ). نتایج بین قطر هاله مهاری رشد استافیلوکوکوس اورئوس تحت تأثیر غلظت‌های مختلف فرم اسانس خالص ( $F_{(3,8)} = 66/93$  و  $P < 0/01$ )، فرم نانوذره ( $F_{(3,8)} = 167/27$  و  $P < 0/01$ )، فرم لیپوزومی ( $F_{(3,8)} = 396/33$ ) و فرم نانوکپسوله ( $F_{(3,8)} = 51/00$  و  $P < 0/01$ )، فرم نانوکامپوزیت ( $F_{(3,8)} = 39/27$  و  $P < 0/01$ ) اسانس نعناع فلفلی تفاوت معنی داری وجود

**جدول ۷-** مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف معیار قطر هاله مهاری رشد استافیلوکوکوس اورئوس متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس رزماری (میلی متر)

فرم اسانس رزماری					غلظت
نانوکامپوزیت	نانوکپسوله	لیپوزومی	نانوذره	اسانس خالص	(میلی گرم بر دسی لیتر)
۱۴/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>c</sup>	۱۷/۶۶ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>c</sup>	۱۶/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>d</sup>	۱۴/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>c</sup>	۱۲/۳۳ $\pm$ ۱/۵۲ <sup>b</sup>	۱
۱۰/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>b</sup>	۱۳/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>b</sup>	۱۴/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>c</sup>	۱۱/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>b</sup>	۱۱/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>ab</sup>	۰/۵
۸/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۹/۶۶ $\pm$ ۱/۱۵ <sup>a</sup>	۱۰/۶۶ $\pm$ ۱/۱۵ <sup>b</sup>	۸/۶۶ $\pm$ ۱/۱۵ <sup>a</sup>	۸/۳۳ $\pm$ ۱/۵۲ <sup>a</sup>	۰/۲۵
۸/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۸/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>a</sup>	۰/۱۲۵
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۹	معنی داری

**جدول ۸-** مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف معیار قطر هاله مهاری رشد استافیلوکوکوس اورئوس متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس نعناع فلفلی (میلی متر)

فرم اسانس نعناع فلفلی					غلظت
نانوکامپوزیت	نانوکپسوله	لیپوزومی	نانوذره	اسانس خالص	(میلی گرم بر دسی لیتر)
۱۴/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>c</sup>	۱۴/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>b</sup>	۱۷/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>C</sup>	۲۱/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>d</sup>	۱۶/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>c</sup>	۱
۱۳/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>c</sup>	۱۳/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>b</sup>	۱۴/۶۶ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>b</sup>	۱۶/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>C</sup>	۱۴/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۵
۱۰/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>b</sup>	۱۰/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۸/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۱۱/۶۶ $\pm$ ۱/۱۵ <sup>b</sup>	۱۰/۶۶ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۰/۲۵
۸/۶۶ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۹/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۹/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۹/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۰/۱۲۵
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	معنی داری

لیپوزومی نسبت به غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است (P<۰/۰۵).

مقادیر میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد کاهش تولید بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس رزماری و نعناع‌فللی در جدول شماره (۱۱ و ۱۲) گزارش گردیده است. جهت مقایسه میانگین درصد کاهش تولید بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس رزماری از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و آزمون تکمیلی توکی استفاده گردید. نتایج حاکی از آن است بین میانگین درصد کاهش تولید بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس تحت تأثیر غلظت‌های مختلف فرم اسانس خلص (F(۳,۸) = ۴۹۱/۰۴) و F(۳,۸) = ۴۱۲/۹۲) (P<۰/۰۱)، فرم لیپوزومی (F(۳,۸) = ۷۲۹/۱۳) (P<۰/۰۱)، فرم نانوکپسوله (F(۳,۸) = ۲۲۳۲/۹۷) (P<۰/۰۱) و فرم نانوکامپوزیت (F(۳,۸) = ۶۸۰/۸۰) (P<۰/۰۱) اسانس رزماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد. در کل نتایج آزمون تکمیلی توکی نشان داد میانگین درصد کاهش تولید بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس متأثر از غلظت

(P<۰/۰۱)، فرم نانوکپسوله (F(۳,۸) = ۹۱/۸۸) و F(۳,۸) = ۴۲/۰۳) اسانس رزماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد. و نتایج آزمون تکمیلی توکی نشان داد میانگین قطر هاله مهاری رشد پسودوموناس آئروژینوزا متأثر از غلظت یک میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تمامی فرم‌های اسانس خلص، فرم نانوذره، فرم لیپوزومی، فرم نانوکپسوله و فرم نانوکامپوزیت اسانس رزماری نسبت به سایر غلظت‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است (P<۰/۰۵).

نتایج بین قطر هاله مهاری رشد پسودوموناس آئروژینوزا تحت تأثیر غلظت‌های مختلف فرم اسانس خلص (F(۳,۸) = ۱۱۲/۶۶) و F(۳,۸) = ۱۰۰/۲۶) (P<۰/۰۱)، فرم لیپوزومی (F(۳,۸) = ۲۵۵/۰۰) و F(۳,۸) = ۳۰۵/۰۰) (P<۰/۰۱) و فرم نانوکامپوزیت (P<۰/۰۱) اسانس نعناع‌فللی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. و نتایج آزمون تکمیلی توکی نشان داد میانگین قطر هاله مهاری رشد پسودوموناس آئروژینوزا متأثر از غلظت یک میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تمامی فرم‌های اسانس خلص، فرم نانوکپسوله و فرم نانوکامپوزیت اسانس نعناع‌فللی نسبت به سایر غلظت‌ها و فرم نانوذره، فرم

**جدول ۹-** مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف معیار قطر هاله مهاری رشد پسودوموناس آئروژینوزا متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس رزماری (میلی‌متر)

فرم اسانس رزماری					غلظت (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
نانوکامپوزیت	نانوکپسوله	لیپوزومی	نانوذره	اسانس خلص	
۱۵/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>c</sup>	۱۳/۶۶ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>c</sup>	۱۴/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>c</sup>	۱۳/۰۰ $\pm$ ۱/۰ <sup>b</sup>	۱۳/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>c</sup>	۱
۱۲/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>b</sup>	۱۰/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>b</sup>	۱۲/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>b</sup>	۹/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۱۰/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>b</sup>	۰/۵
۸/۰۰ $\pm$ ۱/۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>a</sup>	۸/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۸/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>a</sup>	۰/۲۵
۸/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>a</sup>	۷/۶۶ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۱/۰ <sup>a</sup>	۰/۱۲۵
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	معنی‌داری

**جدول ۱۰-** مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف معیار قطر هاله مهاری رشد پسودوموناس آئروژینوزا متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس نعناع‌فللی (میلی‌متر)

فرم اسانس نعناع‌فللی					غلظت (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
نانوکامپوزیت	نانوکپسوله	لیپوزومی	نانوذره	اسانس خلص	
۱۴/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>c</sup>	۱۳/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>c</sup>	۱۶/۰۰ $\pm$ ۱/۰ <sup>c</sup>	۱۶/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>c</sup>	۱۳/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>c</sup>	۱
۱۲/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>b</sup>	۱۱/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>b</sup>	۱۵/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>c</sup>	۱۵/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>c</sup>	۱۱/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>b</sup>	۰/۵
۸/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>a</sup>	۱۱/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>b</sup>	۱۲/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>b</sup>	۸/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۰/۲۵
۸/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>a</sup>	۷/۶۶ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۸/۰۰ $\pm$ ۰/۰ <sup>a</sup>	۰/۱۲۵
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	معنی‌داری

مقادیر میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد کاهش تولید بیوفیلیم پَسودوموناس آئروژنوزا متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس رزماری و نعنای فلفلی به ترتیب در جدول شماره (۱۳ و ۱۴) گزارش گردیده است. نتایج آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه جهت مقایسه درصد کاهش تولید بیوفیلیم پَسودوموناس آئروژنوزا متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس رزماری نشان داد بین درصد کاهش تولید بیوفیلیم پَسودوموناس آئروژنوزا تحت تأثیر غلظت‌های مختلف فرم اسانس خالص ( $F_{(3,8)} = 215/00$  و  $P < 0/01$ )، فرم نانوذره ( $F_{(3,8)} = 267/27$ ) و فرم لیپوزومی ( $F_{(3,8)} = 621/90$ ) و فرم نانوکپسوله ( $F_{(3,8)} = 84/93$  و  $P < 0/01$ ) و فرم نانوکامپوزیت ( $F_{(3,8)} = 712/90$  و  $P < 0/01$ ) اسانس رزماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج آزمون تکمیلی توکی نشان داد میانگین درصد کاهش تولید بیوفیلیم پَسودوموناس آئروژنوزا متأثر از غلظت یک میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تمامی فرم‌های اسانس خالص، فرم نانوذره، فرم لیپوزومی، فرم نانوکپسوله و فرم نانوکامپوزیت اسانس رزماری نسبت به سایر غلظت‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است ( $P < 0/05$ ). نتایج آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه جهت مقایسه درصد کاهش تولید بیوفیلیم پَسودوموناس آئروژنوزا متأثر

یک میلی‌گرم بر دسی‌لیتر همه فرم‌های اسانس خالص، فرم نانوذره، فرم لیپوزومی، فرم نانوکپسوله و فرم نانوکامپوزیت اسانس رزماری نسبت به سایر غلظت‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است ( $P < 0/05$ ). جهت مقایسه درصد کاهش تولید بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس نعنای فلفلی از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و آزمون تکمیلی توکی استفاده گردید. نتایج حاکی است بین درصد کاهش تولید بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس تحت تأثیر غلظت‌های مختلف فرم اسانس خالص ( $F_{(3,8)} = 594/82$  و  $P < 0/01$ )، فرم نانوذره ( $F_{(3,8)} = 3556/83$  و  $P < 0/01$ )، فرم لیپوزومی ( $F_{(3,8)} = 2276/11$  و  $P < 0/01$ )، فرم نانوکپسوله ( $F_{(3,8)} = 652/75$  و  $P < 0/01$ ) و فرم نانوکامپوزیت ( $F_{(3,8)} = 723/77$  و  $P < 0/01$ ) اسانس نعنای فلفلی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. در کل نتایج آزمون تکمیلی توکی نشان داد میانگین درصد کاهش تولید بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس متأثر از غلظت یک میلی‌گرم بر دسی‌لیتر همه فرم‌های اسانس خالص، فرم نانوذره، فرم لیپوزومی، فرم نانوکپسوله و فرم نانوکامپوزیت اسانس نعنای فلفلی نسبت به سایر غلظت‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است ( $P < 0/05$ ).

**جدول ۱۱-** مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد کاهش تولید بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس رزماری (درصد)

فرم اسانس رزماری					غلظت
نانوکامپوزیت	نانوکپسوله	لیپوزومی	نانوذره	اسانس خالص	(میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
$30/66 \pm 1/15^c$	$61/33 \pm 0/57^c$	$51/33 \pm 1/52^c$	$28/66 \pm 1/15^c$	$22/33 \pm 0/57^c$	۱
$11/66 \pm 1/15^b$	$26/66 \pm 1/15^b$	$41/33 \pm 1/52^b$	$14/66 \pm 1/5^b$	$13/33 \pm 0/57^b$	۰/۵
$1/66 \pm 0/57^a$	$7/00 \pm 1/0^a$	$11/66 \pm 1/15^a$	$3/66 \pm 0/57^a$	$2/66 \pm 1/15^a$	۰/۲۵
$1/33 \pm 0/57^a$	$5/0 \pm 1/0^a$	$9/33 \pm 1/15^a$	$2/33 \pm 0/57^a$	$1/66 \pm 0/57^a$	۰/۱۲۵
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	معنی‌داری

**جدول ۱۲-** مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد کاهش تولید بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس نعنای فلفلی (درصد)

فرم اسانس نعنای فلفلی					غلظت
نانوکامپوزیت	نانوکپسوله	لیپوزومی	نانوذره	اسانس خالص	(میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
$41/33 \pm 1/52^d$	$40/66 \pm 1/15^d$	$67/66 \pm 2/51^c$	$86/00 \pm 1/73^d$	$60/33 \pm 2/51^d$	۱
$30/33 \pm 1/52^c$	$28/00 \pm 1/0^c$	$46/66 \pm 1/52^b$	$58/66 \pm 1/15^c$	$43/33 \pm 2/51^c$	۰/۵
$11/66 \pm 0/57^b$	$12/00 \pm 0/0^b$	$12/33 \pm 0/57^a$	$15/33 \pm 0/57^b$	$13/33 \pm 0/57^b$	۰/۲۵
$8/66 \pm 0/57^a$	$9/00 \pm 0/0^a$	$11/33 \pm 0/57^a$	$7/00 \pm 0/0^a$	$5/33 \pm 0/57^a$	۰/۱۲۵
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	معنی‌داری

داده‌ها و بررسی درصد ترکیبات حاصل می‌توان گفت که در اسانس نعناع‌فلغلی ۵۰ ترکیب شناسایی شده که عمده آن‌ها Methyl-Cyclohexanol و Menthol بوده است و در اسانس رزماری در مجموع ۲۹ ترکیب شناسایی شده که عمده آن‌ها Camphor و Alpha-pinene بوده است. در تحقیق شاو (Shu) و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی ترکیب شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع‌فلغلی (۲۶) اجزای شناسایی شده توسط دستگاه GC/MS با نتایج ما هم‌خوانی دارد. در تحقیق ماتاویو (Matthaiou) و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری ۳۱ ترکیب شناسایی شده (۲۷). نتایج این پژوهشگران با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی داشت.

تعیین اندازه نانوذرات محدوده توزیع اندازه ذرات و هم‌چنین پیک اندازه ذرات با استفاده از دستگاه تفریق دینامیکی نور DLS تعیین می‌شود که بدین منظور از دستگاه نانو سائزر استفاده گردید و در مطالعه حاضر اندازه ذرات نانوذره، نانوکامپوزیت، نانوکپسوله و لیپوزومی اسانس نعناع‌فلغلی به ترتیب ۳/۳۴، ۷۱/۷، ۳۵/۰۲ و ۲۵/۳۸ نانومتر می‌باشد. و اندازه ذرات نانوذره، نانوکامپوزیت، نانوکپسوله و لیپوزومی اسانس رزماری به

از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس نعناع‌فلغلی نشان داد بین درصد کاهش تولید بیوفیلیم پسودوموناس- آئروژنوزا تحت تأثیر غلظت‌های مختلف فرم اسانس خالص ( $F_{(3, 8)} = 30.1/70$  و  $P < 0.01$ )، فرم نلنوذره ( $F_{(3, 8)} = 37.5/82$  و  $P < 0.01$ )، فرم لیپوزومی ( $F_{(3, 8)} = 1237/86$  و  $P < 0.01$ )، فرم نانوکپسوله ( $F_{(3, 8)} = 1178/22$  و  $P < 0.01$ ) و فرم نانوکامپوزیت ( $F_{(3, 8)} = 396/38$  و  $P < 0.01$ ) اسانس نعناع‌فلغلی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج آزمون تکمیلی توکی نشان داد میانگین درصد کاهش تولید بیوفیلیم پسودوموناس آئروژنوزا متأثر از غلظت یک میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تمامی فرم‌های اسانس خالص، فرم نانوذره، فرم لیپوزومی، فرم نانوکپسوله و فرم نانوکامپوزیت اسانس نعناع‌فلغلی نسبت به سایر غلظت‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است ( $P < 0.05$ )

## بحث

با بررسی و مطالعه کروماتوگرام و طیف‌های جرمی حاصل از دستگاه کروماتوگرافی‌گازی دارای طیف‌سنج جرمی، ترکیبات موجود در روغن اسانس‌های نعناع‌فلغلی و رزماری به دست آمد که با مطالعه این

**جدول ۱۳ -** مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد کاهش تولید بیوفیلیم پسودوموناس آئروژنوزا متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس رزماری (درصد)

فرم اسانس رزماری					غلظت
نانوکامپوزیت	نانوکپسوله	لیپوزومی	نانوذره	اسانس خالص	(میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
$37.66 \pm 1.52^c$	$18.00 \pm 1.0^c$	$28.66 \pm 1.15^d$	$19.00 \pm 1.0^d$	$17.66 \pm 0.57^d$	۱
$18.33 \pm 0.57^b$	$11.00 \pm 1.0^b$	$9.66 \pm 0.57^c$	$8.33 \pm 0.57^c$	$10.66 \pm 0.57^c$	۰/۵
$8.33 \pm 0.57^a$	$8.33 \pm 1.15^a$	$7.33 \pm 0.57^b$	$6.66 \pm 0.57^b$	$8.66 \pm 0.57^b$	۰/۲۵
$7.33 \pm 0.57^a$	$6.33 \pm 0.57^a$	$4.33 \pm 0.57^a$	$3.66 \pm 0.57^a$	$6.33 \pm 0.57^a$	۰/۱۲۵
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	معنی‌داری

**جدول ۱۴ -** مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد کاهش تولید بیوفیلیم پسودوموناس آئروژنوزا متأثر از غلظت‌های مختلف فرم‌های اسانس نعناع‌فلغلی (درصد)

فرم اسانس نعناع‌فلغلی					غلظت
نانوکامپوزیت	نانوکپسوله	لیپوزومی	نانوذره	اسانس خالص	(میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
$33.00 \pm 1.0^d$	$27.33 \pm 0.57^d$	$54.33 \pm 1.52^d$	$52.66 \pm 3.05^d$	$25.66 \pm 1.15^c$	۱
$22.33 \pm 1.52^c$	$12.00 \pm 1.0^c$	$39.33 \pm 1.15^c$	$42.66 \pm 1.15^c$	$13.33 \pm 0.57^b$	۰/۵
$9.33 \pm 1.15^b$	$8.66 \pm 0.57^b$	$12.00 \pm 1.0^b$	$21.66 \pm 1.15^b$	$7.33 \pm 0.57^a$	۰/۲۵
$6.00 \pm 1.0^a$	$4.66 \pm 0.57^a$	$6.33 \pm 0.57^a$	$7.33 \pm 1.15^a$	$5.33 \pm 1.15^a$	۰/۱۲۵
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	معنی‌داری

ترتیب ۲/۶۹، ۲۷/۱۴، ۱۹/۲۵، ۱۹/۰۱ نانومتر می‌باشد. در تحقیق هو (Hu) و همکاران (۲۰۱۵) اسانس درمنه نانوکپسوله شده و میانگین توزیع اندازه ذرات نانوکپسول ۹۵/۹ نانومتر تعیین شد (۲۸). نتایج این پژوهشگران با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی داشت.

در تحقیقی که توسط ناگویان (Nguyen) و همکاران (۲۰۱۴) روی عصاره نعناع فلفلی انجام شده است، خواص ضدباکتریایی مناسبی بر علیه هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و منفی نیز گزارش شده است (۱۳). شاو (Shu) و همکاران (۲۰۱۶) در تحقیق خود ترکیب شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع فلفلی را مورد بررسی قرار دادند. این محققان اثر ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی را به روش رقیق سازی در محیط آگار و بر باکترهای اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی مورد بررسی قرار دادند (۲۶). نتایج این پژوهشگران نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس حساس‌ترین باکتری در برابر اسانس نعناع فلفلی می‌باشد و باکتری اشرشیا کلی نیز مقاوم‌ترین باکتری بود. در بررسی دمل (de Mel) و همکاران (۲۰۱۴) خواص ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون اسانس میخک به این نتیجه رسیدند که نانوامولسیون نسبت به اسانس خالص دارای خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بسیار خوبی است (۲۹) که نتایج این پژوهشگران با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی داشت.

سلیم (Selim) و همکاران (۲۰۱۴)، بیان کردند که اسانس نعناع فلفلی بر باکتری‌های گرم‌مثبت دارای فعالیت کشندگی بیشتری می‌باشد و باکتری‌های گرم‌منفی در برابر اسانس نعناع فلفلی مقاوم‌تر هستند (۳۴). اسکن (İşcan) و همکاران (۲۰۰۲) و تالوی (Talevi) و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که اسانس نعناع تأثیر بیشتری بر روی باکتری‌های گرم‌مثبت نسبت به گرم‌منفی دارد (۳۰، ۳۱) که نتایج این پژوهشگران با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی داشت.

ناگویان (Nguyen) و همکاران (۲۰۱۴) هاله‌ی عدم رشد گیاه نعناع فلفلی جمع‌آوری شده از کشور لیبی را برای باکتری *S. aureus* و *K. pneumoniae* به ترتیب

۱۷/۲±۰/۹ و ۱۲/۰±۴/۷ میلی‌متر گزارش کردند (۱۳) که نتایج این پژوهشگران تا حدودی با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی داشت. در بررسی ساویک (Saviuc) و همکاران (۲۰۱۵)، نشان دادند که اسانس‌ها عوامل آنتی‌بیوفیلیم قوی هستند که با مهار سیستم‌های ارتباطی بین سلولی و با ایجاد تغییرات در بستر (اشاره به تغییر پتانسیل اکسیداسیون و کاهش، مقاومت یا pH) عمل می‌کنند (۳۲). اسانس‌ها همچنین می‌توانند سلول‌های تعبیه شده در بیوفیلیم را با تغییر غشای سیتوپلاسمی به دلیل ترکیبات آب‌گریز خود از بین ببرند (۳۳). تحقیقات انجام شده توسط سلیم (Selim) و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که عدم وجود غشای خارجی در باکتری‌های گرم‌مثبت به تعامل مستقیم اسانس‌ها با غشای سلولی کمک می‌کند، یا بر نفوذپذیری آن تأثیر می‌گذارد و باعث نشت محتوای داخل سلولی می‌شود یا آنزیم‌های باکتری را غیرفعال می‌کند (۳۴) که نتایج این پژوهشگران با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی داشت. اسانس حاصل از گیاهان نعناع فلفلی و رزماری به رنگ زرد و دارای بویی نافذ بود. بازده اسانس حاصله با روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر، ۵/۰ درصد به دست آمد. نانوامولسیون حاوی اسانس رزماری و نعناع فلفلی به ترتیب با اندازه ذرات حدود ۳/۳۴ و ۲/۶۹ نانومتر به دست آمد. نانوکپسوله حاوی اسانس رزماری و نعناع فلفلی به ترتیب با اندازه ذرات حدود ۱۹/۲۵ و ۳۵/۲ نانومتر به دست آمد. نانوکامپوزیت حاوی اسانس رزماری و نعناع فلفلی به ترتیب با اندازه ذرات حدود ۲۷/۱۴ و ۷۱/۷ نانومتر به دست آمد. نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری و نعناع فلفلی به ترتیب با اندازه ذرات حدود ۱۹/۱ و ۲۵/۳۸ نانومتر به دست آمد (۵). اندازه‌ی ذرات تمامی فرمولاسیون‌ها در طی زمان اختلاف معنی‌داری نشان دادند، اندازه ذرات نانوذره نسبت به نانوکپسوله، نانوکامپوزیت و نانولیپوزوم‌ها تفاوت کمی داشت، اما در حالت کلی همه نمونه‌ها پایدار بوده به‌صورتی که تغییر اندازه ذرات پس از گذشت یک ماه قابل قبول بود (۲۲). در آزمون اثرات ضد میکروبی، تأثیر اسانس در دو حالت آزاد و کپسوله شده در حامل‌های لیپیدی در برابر

ارومیه به اجرا درآمد، نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از همکاری اساتید دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و ارومیه که در این پژوهش مشارکت داشتند صمیمانه سپاسگزاری نمایند

## References

1. Jegatheeswaran S, Sundrarajan M. PEGylation of novel hydroxyapatite/PEG/Ag nanocomposite particles to improve its antibacterial efficacy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;51:174-81.
2. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*. 1999;86(6):985-90.
3. Manus JM. Dix menaces à la santé mondiale en 2019. *Rev Francoph Lab*. 2019;2019(511):20-21.
4. Butaye P, Cloeckaert A, Schwarz S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22(3):205-10.
5. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel)*. 2017;4(3):58.
6. Huang P, Chen Y, Lin H, Yu L, Zhang L, Wang L, Zhu Y, Shi J. Molecularly organic/inorganic hybrid hollow mesoporous organosilica nanocapsules with tumor-specific biodegradability and enhanced chemotherapeutic functionality. *Biomaterials*. 2017;125:23-37.
7. Vojtová V, Kolár M, Hricová K, Uvzl R, Neiser J, Blahut L, Urbánek K. Antibiotic utilization and *Pseudomonas aeruginosa* resistance in intensive care units. *New Microbiol*. 2011;34(3):291-8.
8. Kastoris AC, Rafailidis PI, Vouloumanou EK, Gkegkes ID, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with other antibiotics for Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66(4):359-68.
9. Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, et al. Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules*. 2017;22(1):70.
10. Chen T, Zhao T, Wei D, Wei Y, Li Y, Zhang H. Core-shell nanocarriers with ZnO quantum dots-conjugated Au nanoparticle for tumor-targeted drug delivery. *Carbohydrate polymers*. 2013;92(2):1124-32.
11. Piñón-Segundo E, Leyva-Gómez G, Mendoza-Muñoz N, Zambrano-Zaragoza ML, Mendoza-Elvira S, Quintanar-Guerrero D. Approaches in Polymeric Nanoparticles for Vaginal Drug Delivery: A Review of the State of the Art. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1549.
12. Dahiya M, Saiwal N, Dureja H. Recent Patents

باکتری گرم مثبت بیشتر از باکتری گرم منفی بود، همچنین میزان بازداري نانوذره و نانولیپوزوم در مقایسه با اسانس آزاد در همه باکتری‌ها (استافیلوکوکوس - ارورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی، موراکیلا کاتارالیس) بالاتر بود. نانوامولسیون نیز در مقایسه با نانولیپوزوم اثرات ضد میکروبی بیشتری داشت، اثرات آنتی اکسیدانی نانوحامل‌ها بیشتر از اسانس مریم گلی بدون درون پوشانی بود (۱۷). نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که اثر آنتی اکسیدانی تیمارها در سطح ۵ درصد معنی دار بود، به طوری که بیشترین اثر آنتی اکسیدانی مربوط به نانوامولسیون و کمترین آن در اسانس در حالت آزاد بود. توصیه می‌گردد تحقیقات حاصل از اثرات قابل قبول نانوامولسیون‌ها در شرایط بالینی روی باکتری‌های عامل زخم بستر یا به شکل پماد روی زخم‌های پوستی و سوختگی مورد بررسی قرار گیرد.

## نتیجه گیری

اندازه‌ی ذرات تمامی فرمولاسیون‌ها در طی زمان اختلاف معنی‌داری نشان دادند، اندازه ذرات نانوذره نسبت به نانوکپسوله، نانوکامپوزیت و نانولیپوزوم تفاوت کمی داشت، اما در حالت کلی همه نمونه‌ها پایدار بوده به صورتی که تغییر اندازه ذرات پس از گذشت یک ماه قابل قبول بود. در آزمون اثرات ضد میکروبی، تأثیر اسانس در دو حالت آزاد و کپسوله شده در حامل‌های لیپیدی در برابر باکتری گرم مثبت بیشتر از باکتری گرم منفی بود، همچنین میزان بازداري نانوذره و نانولیپوزوم در مقایسه با اسانس آزاد در همه باکتری‌ها (استافیلوکوکوس ارورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی، موراکیلا کاتارالیس) بالاتر بود. نانوامولسیون نیز در مقایسه با نانولیپوزوم اثرات ضد میکروبی بیشتری داشت.

## تقدیر و تشکر

این پژوهش حاصل پایان نامه دکتری تخصصی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج است که با همکاری دانشگاه آزاد اسلامی و دانشگاه سراسری

- Bauab TM, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:1-15.
26. Shu XL, Shi QS, Feng J, Yang YH, Zhou G, Li WR. Poly ( $\gamma$ -glutamic acid)/beta-TCP nanocomposites via in situ copolymerization: Preparation and characterization. *J Biomater Appl*. 2016;31(1):102-11.
27. Matthaïou EI, Barar J, Sandaltzopoulos R, Li C, Coukos G, Omid Y. Shikonin-loaded antibody-armed nanoparticles for targeted therapy of ovarian cancer. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:1855-70.
28. Hu Y, Li J, Zhu X, Li Y, Zhang S, Chen X, Gao Y, Li F.  $17\beta$ -Estradiol-Loaded PEGylated Upconversion Nanoparticles as a Bone-Targeted Drug Nanocarrier. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(29):15803-11.
29. de Mel A, Naghavi N, Cousins BG, Clatworthy I, Hamilton G, Darbyshire A, Seifalian AM. Nitric oxide-eluting nanocomposite for cardiovascular implants. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(3):917-29.
30. Işcan G, Kirimer N, Kürkcüoğlu M, Başer KH, Demirci F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J Agric Food Chem*. 2002;50(14):3943-6.
31. Talevi A, Gantner ME, Ruiz ME. Applications of nanosystems to anticancer drug therapy (Part I. Nanogels, nanospheres, nanocapsules). *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2014;9(1):83-98.
32. Saviuc CM, Drumea V, Olariu L, Chifiriuc MC, Bezirtzoglou E, Lazăr V. Essential oils with microbicidal and antibiofilm activity. *Curr Pharm Biotechnol*. 2015;16(2):137-51.
33. Millezi AF, Cardoso Md, Alves E, Piccoli RH. Reduction of *Aeromonas hydrophyla* biofilm on stainless steel surface by essential oils. *Braz J Microbiol*. 2013;44(1):73-80.
34. Selim SA, Adam ME, Hassan SM, Albalawi AR. Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:179.
- and Formulation of Nanopharmaceuticals Using Ultrasonication Technique. *Recent Pat Nanotechnol*. 2018;12(2):86-100.
13. Nguyen KT, Zhao Y. Integrated graphene/nanoparticle hybrids for biological and electronic applications. *Nanoscale*. 2014;6(12):6245-66.
14. Lubbe A, Choi YH, Vreeburg P, Verpoorte R. Effect of fertilizers on galanthamine and metabolite profiles in *Narcissus* bulbs by  $1H$  NMR. *J Agric Food Chem*. 2011;59(7):3155-61.
15. Costa MM, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Deans SG, Scheffer JJ. Nitrogen stress induction on *Levisticum officinale* hairy roots grown in darkness and under photoperiod conditions: effect on growth and volatile components. *Biotechnol Lett*. 2008;30(7):1265-70.
16. Proft T, Baker EN. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(4):613-35.
17. Muhammad F, Nguyen TDT, Raza A, Akhtar B, Aryal S. A review on nanoparticle-based technologies for biotransformation. *Drug Chem Toxicol*. 2017;40(4):489-497.
18. Barbeau J, Cammas-Marion S, Auvray P, Benvegnu T. Preparation and Characterization of Stealth Archaeosomes Based on a Synthetic PEGylated Archaeal Tetraether Lipid. *J Drug Deliv*. 2011;2011:396068.
19. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*. 2014;6:25-64.
20. Zhang W, Wang L, Liu Y, Chen X, Liu Q, Jia J, Yang T, Qiu S, Ma G. Immune responses to vaccines involving a combined antigen-nanoparticle mixture and nanoparticle-encapsulated antigen formulation. *Biomaterials*. 2014;35(23):6086-97.
21. Lee Y, Thompson DH. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2017;9(5): 10.1002/wnan.1450
22. Nguyen S, Hiorth M, Rykke M, Smistad G. The potential of liposomes as dental drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;77(1):75-83.
23. Pencheva V, Margaritova E, Borinarova M, Slavkova M, Momekova D, Petrov PD. A novel approach for fabricating nanocomposite materials by embedding stabilized core-shell micelles into polysaccharide cryogel matrix. *Carbohydr Polym*. 2018;183:165-172.
24. de With K, Meyer E, Steib-Bauert M, Schwab F, Daschner FD, Kern WV. Antibiotic use in two cohorts of German intensive care units. *J Hosp Infect*. 2006;64(3):231-7.
25. Bonifácio BV, Silva PB, Ramos MA, Negri KM,