



Preparation, structural characterization, and study on antibiofilm properties of quercetin-barium phosphate nanofibers

Khashayar Vojdanitalab¹, Manica Negahdaripour², Mohammad Reza Delnavazi³,
Mohammad Ali Faramarzi⁴, Somayeh Mojtabavi⁵

¹Pharm Phd, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ²Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. ³Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁴Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁵Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: The spread of drug resistance and limited effects of antibiotics on the pathogenic biofilms along with the increasing number of hospital infections have imposed heavy costs on the healthcare system. In the present study, quercetin-barium phosphate hybrid nanostructures were fabricated and characterized in order to improve their antibiofilm activity.

Materials and methods: To prepare hybrid nanostructures, barium sulfate was added to sodium phosphate buffer containing quercetin (0.1 mg mL⁻¹), the reaction mixture was sonicated for 10 min, and the obtained precipitate was collected. To obtain the hybrid nanostructures with the maximum immobilized quercetin, the concentrations of phosphate buffer and barium sulfate were examined in the range of 50–250 mM and 10–50 mM, respectively. The prepared hybrid nanostructures were characterized using scanning electron microscopy, infrared spectroscopy, and X-ray diffraction analysis, their effects were evaluated in preventing and destroying bacterial biofilms as well.

Results: The immobilization yield of quercetin within hybrid structures was 95%. The scanning electron microscope images showed fiber-like structures with smooth, knot-free, and uniform surfaces. Quercetin-barium phosphate hybrid nanofibers significantly inhibited the biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* by 100% and 80%. Also, in the presence of the immobilized quercetin (500 mg L⁻¹), biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* were destroyed by 75% and 70%.

Conclusion: Due to the notable antibiofilm properties of quercetin-barium phosphate hybrid nanofibers, they could be useful in medical devices, and therapeutic and environmental processes.

Keywords: Biofilm, Hybrid structure, Quercetin, Nanofiber.

Received: 9 December 2022

Revised: 11 March 2023

Accepted: 11 May 2023

Correspondence to: Somayeh Mojtabavi

Tel: +98 9151522504

E-mail: smojtabavi@sina.tums.ac.ir

Journal of Microbial World 2023, 16(1): 29 - 41

DOI:10.30495/jmw.2023.1975431.2046



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



تهیه، تعیین ویژگی‌های ساختاری و بررسی خاصیت ضدبیوفیلمی نانوالیاف‌های کوئرتستین - فسفات باریوم

خشیار وجدانی طلب^۱، مانیکا نگهداری پور^۲، محمدرضا دلنوازی^۳، محمدعلی فرامرزی^۴، سمیه مجتوبی^{۵*}

^۱دکترای داروسازی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ایران. ^۲استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، شیراز، ایران. ^۳استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ایران. ^۴استاد، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ایران. ^۵استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: گسترش مقاومت‌های دارویی و اثربخشی محدود آنتی‌بیوتیک‌ها بر بیوفیل‌ها حاصل از میکروارگانیسم‌های پاتوژن، در کنار افزایش روزافزون عفونت‌های بیمارستانی سبب تحمیل هزینه‌های سنگین بر سیستم بهداشت و درمان شده است. در مطالعه حاضر، نانوساختارهای هیبریدی کوئرتستین-فسفات باریوم به منظور بهبود اثرات ضدبیوفیلمی آن تهیه و مشخصه‌یابی گردید. **مواد و روش‌ها:** برای تهیه نانوساختارهای هیبریدی، پس از اضافه کردن سولفات باریوم به بافر فسفات حاوی کوئرتستین ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه سونیکه و رسوب حاصل جمع‌آوری شد. غلظت بافر فسفات و سولفات باریوم به ترتیب در محدوده ۲۵۰-۵۰ و ۵۰-۱۰ میلی‌مولار بررسی شد تا نانوساختارهای هیبریدی با بیشینه میزان کوئرتستین تثبیت شده به دست آید. نانوساختارهای هیبریدی حاصله با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره، طیف سنجی مادون قرمز و آنالیز پراش اشعه ایکس مشخصه‌یابی گردید و اثر آن بر جلوگیری از تشکیل و نیز تخریب بیوفیل‌های باکتریایی ارزیابی شد. **یافته‌ها:** بازده تثبیت کوئرتستین درون ساختارهای هیبریدی ۹۵٪ بود. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی نگاره، ساختارهایی الیاف مانند با سطحی صاف، بدون گره و یکنواخت را نشان داد. نانوالیاف‌های هیبریدی توانستند به‌طور معناداری میزان تشکیل بیوفیل‌ها (سودوموناس آئروژینوزا را ۱۰۰٪ و بیوفیل‌ها استافیلوکوکوس اورئوس را ۸۰٪ مهار نمایند. همچنین در حضور کوئرتستین تثبیت شده (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، بیوفیل‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۷۵٪ و باسیلوس سوبتیلیس ۷۰٪ تخریب شدند. **نتیجه‌گیری:** با توجه به اثرات ضدبیوفیلمی قابل توجه نانوالیاف‌های هیبریدی کوئرتستین-فسفات باریوم، استفاده از آن‌ها در تجهیزات پزشکی، فرآیندهای درمانی و محیط زیست می‌تواند ثمربخش باشد. **کلمات کلیدی:** بیوفیل‌ها، ساختار هیبریدی، کوئرتستین، نانوالیاف.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۲/۲۱

ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۹/۱۸

مقدمه

سبزیجات، گل‌ها، میوه‌ها و دانه‌های گیاهی وجود دارد (۱). کوئرتستین یا غذاهای غنی از آن دارای طیف وسیعی از اثرات مفید از جمله فعالیت‌های ضدانعقادی، ضدالتهابی، ضدنئوپلاستیکی، محافظت‌کننده عصبی و ضدحساسیت هستند (۲). نسبت دادن این خواص به کوئرتستین منجر به

کوئرتستین (۳،۳'،۵'،۷-پنتاهیدروکسی فلاون) یکی از انواع فلاونوئیدهای طبیعی است که بطور گسترده در بسیاری از

(* آدرس برای مکاتبه: گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران ایران. تلفن: ۰۹۱۵۱۵۲۲۵۰۴ پست الکترونیک: smojtabavi@sina.tums.ac.ir



نوع ساختارها نباید هیچ‌گونه اثر مهاری بر فعالیت جزء آلی مورد استفاده داشته باشد؛ بلکه حتی بهتر است مکمل و بهبود دهنده فعالیت آن محسوب شوند (۸ و ۷). اکثر محققین بر این باور هستند که تثبیت درون نانوساختارهای هیبریدی سبب افزایش و بهبود خصوصیات و عملکرد جزء آلی موجود در آن می‌گردد که این افزایش ناشی از اثر سینرژیسم جزء معدنی بر بخش آلی و افزایش سطح تماس ترکیب آلی با محیط واکنش است. به‌دام‌اندازی پروتین‌ها و ملکول‌های دارویی در ساختارهای هیبریدی درکنار افزایش پایداری، امکان رهش آهسته آن‌ها را نیز فراهم می‌آورد (۵).

فسفات باریوم، یک نوع نمک معدنی است که در صنایع شیمیایی و نوری در تولید شیشه و لیزرهای پالسی استفاده می‌شود. از ویژگی‌های منحصربفرد این نمک معدنی می‌توان به ضریب شکست بالا، ضریب انبساط حرارتی بالا و شفافیت در برابر نور ماوراء بنفش اشاره کرد. پایداری زیستی بالا، زیست سازگاری مناسب و سمیت پایین نمک‌های باریوم سبب استفاده از آن‌ها در تهیه سیستم‌های رهش کنترل شده دارو گردیده است (۹). علاوه بر این، نمک‌های باریوم اکثراً به عنوان ماده حاجب اشعه ایکس برای آزمایشات پرتونگاری و توموگرافی کامپیوتری عمل می‌کنند و در نتیجه امکان ردیابی فرآورده دارویی تثبیت شده روی این نوع از نمک‌ها امکان‌پذیر خواهد بود (۹).

هدف از انجام این پژوهش، تهیه ساختارهای هیبریدی کوئرتستین-فسفات باریوم و سپس بررسی ریخت‌شناسی، اندازه، درصد عناصر سازنده و محتوای شیمیایی آن‌ها است. در نهایت اثر کوئرتستین تثبیت شده در ساختارهای هیبریدی برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتریایی و نیز تخریب بیوفیلم‌های حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس و اشریشیا کلی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

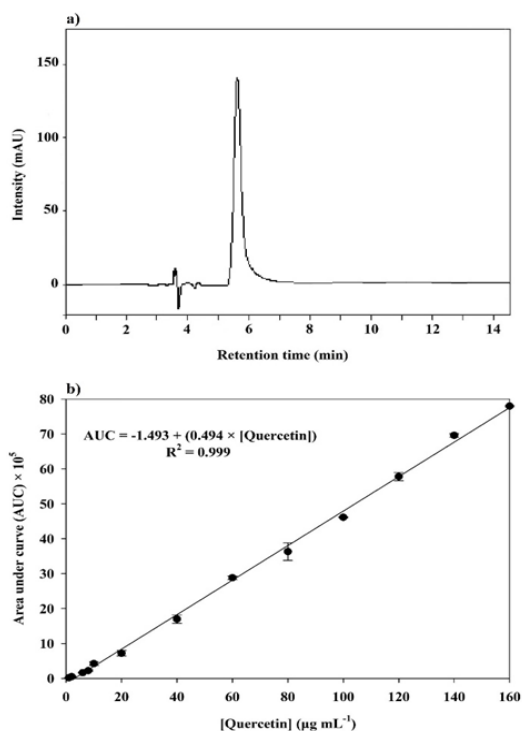
مواد و روش‌ها

الف) مواد مورد استفاده: کوئرتستین از شرکت سیگما-آلدریچ ایالات متحده خریداری و سولفات باریوم، فسفات مونوسدیم دی هیدروژن و فسفات دی سدیم هیدروژن از شرکت مرک

کاربرد گسترده آن در فرآورده‌های آرایشی و مکمل‌های غذایی شده است (۱). کوئرتستین می‌تواند منجر به ایجاد اختلال و آسیب در غشاء باکتری‌ها شده و به دنبال آن یک فعالیت ضد میکروبی قوی ایجاد گردد (۳). این فلاونوئید طبیعی با سرکوب دی-آلانین-دی-آلانین لیگاز به عنوان مهمترین عامل دخیل در سنتز پیش‌سازهای پپتیدوگلیکان مانع از سنتز دیواره سلولی باکتری‌ها می‌شود. تداخل با سیستم‌های ارتباطی بین سلولی، تغییر غشاء پلاسمایی، جلوگیری از سنتز اسیدهای نوکلئیک و مهار پمپ‌های افلاکس باکتریایی از اصلی‌ترین مکانیسم‌های ضدبیوفیلمی کوئرتستین می‌باشند (۳). در دنیای امروز که مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به پیدایش ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های پاتوژن میکروبی و حتی به صورت شایع سبب انتقال ژن‌های مقاومت از نسلی به نسل دیگر و از یک گونه میکروبی به گونه دیگر شده است، بهبود پتانسیل ضدبیوفیلمی ترکیبات طبیعی از جمله کوئرتستین امری با اهمیت و ضروری به نظر می‌رسد. بهترین و موفق‌ترین راه برای افزایش اثرات ضدبیوفیلمی استفاده از روش تثبیت، انکپسوله کردن و کاهش اندازه ذرات به مقیاس میکرو و یا نانو می‌باشد (۴). یک تثبیت کارآمد ضمن دستیابی به بیشترین سطح پایداری و فعالیت فرآورده باید از نظر اقتصادی مقرون بصرفه بوده و کمترین تبعات زیست محیطی را به‌مراه داشته باشد (۳ و ۴). امروزه فرآیند انکپسوله کردن و تثبیت مواد دارویی با حامل‌های مختلف و توسط روش‌های متنوع صورت می‌گیرد (۵ و ۶).

در حال حاضر، استفاده از نانوساختارهای هیبریدی آلی-معدنی بطور فزاینده‌ای در تحقیقات زیست فناوری، داروسازی و پزشکی رایج شده است. ساختارهای هیبریدی درحقیقت ذرات متشکل از یک یا چند جزء آلی و غیرآلی هستند که از طریق کوئوردیناسیون بین یون(های) فلزی و گروه‌های آمین یا هیدروکسیل موجود در بخش آلی شکل می‌گیرند. ترکیبات هیبریدی به دلیل ساختارهای متخلخلی که دارند وسیعی را برای تثبیت مولکول‌های دارویی فراهم می‌آورند (۷). باید در نظر داشت که نمک فلزی (جزء معدنی) انتخاب شده در این

د) تعیین مقدار کوئرستین: به منظور اندازه‌گیری مقدار کوئرستین از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. این دستگاه مجهز به دکتور فتودیود آرایه (PDA) ساخت شرکت کنور آلمان و ستون C18 با اندازه ذرات ۵ میکرومتر، طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر می‌باشد. شستشوی ستون با استفاده از متانول و آب با نسبت ۷۰:۳۰ و با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه انجام گرفت. آنالیز کیفی با استفاده از مقایسه زمان بازداری هر پیک با پیک کوئرستین استاندارد (شکل ۱ قسمت a؛ زمان بازداری = ۵/۸ دقیقه) انجام شد. برای تعیین مقدار این فلاونوئید ابتدا یک منحنی استاندارد (شکل ۱ قسمت b) در محدوده غلظتی صفر تا ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رسم گردید ($R^2 = 0.999$) برای اعتبارسنجی روش HPLC، مقادیر حد تشخیص (LOD) و حد کمیت (LOQ) به ترتیب بر اساس نسبت سیگنال به نویز ۳:۱ و ۱۰:۱ تعیین شدند (۱۱).



شکل ۱: (a) کروماتوگرام و (b) منحنی کالیبراسیون استاندارد کوئرستین در محدوده غلظتی ۰ تا ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر. اندازه‌گیری در هر نقطه سه بار تکرار و نتایج داده‌های کمی به صورت میانگین انحراف معیار نمایش داده شده است.

آلمان تهیه گردیدند. همچنین محیط کشت مولر هینتون براث و مواد لازم برای تهیه محیط کشت لوریه برتانی از جمله پیتون و عصاره مخمر هم از شرکت مرک آلمان فراهم گردید. سایر ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش دارای خلوص لازم برای انجام کارهای آزمایشگاهی بودند.

ب) تهیه نانوالیاف‌های هیبریدی کوئرستین-فسفات باریوم: به منظور تهیه نانوالیاف‌های هیبریدی، ابتدا ۱ میلی‌گرم کوئرستین در ۹ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (pH ۷/۵) حل شد و سپس ۱ میلی‌لیتر نمک سولفات باریوم به آن اضافه گردید. محلول حاضر به مدت ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسوند (۶۰ کیلوهرتز، ۱۳۸ وات) قرارگرفت. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 8000 g سانتریفیوژ شد و نانوالیاف‌های هیبریدی که به صورت رسوب زرد رنگ در ته لوله آزمایش باقی‌مانده بودند پس از چند بار شستشو با آب مقطر برای تست‌های بعدی مورد استفاده قرارگرفتند. این آزمایش با غلظت‌های ۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات (با گام‌های ۵۰ میلی‌مولاری) و غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌مولار نمک سولفات باریوم (با گام‌های ۱۰ میلی‌مولاری) انجام گرفت و در هر مورد بازده تثبیت کوئرستین ارزیابی گردید و غلظتی از بافر فسفات سدیم و نمک سولفات باریوم که در حضور آن بیشترین فلاونوئید در ساختارهای هیبریدی محصور شد به‌عنوان شرایط بهینه سنتز نانوالیاف‌ها انتخاب گردید (۱۰).

ج) تعیین بازده کوئرستین محصور شده در نانوالیاف‌های هیبریدی: برای اندازه‌گیری بازده تثبیت کوئرستین، غلظت آن در محلول بافر پیش از اضافه کردن نمک سولفات باریوم اندازه‌گیری شد. پس از اضافه کردن نمک به محلول کوئرستین و سانتریفیوژ نمونه، غلظت فلاونوئید مجدداً در محلول رویی تعیین گردید و سپس با استفاده از معادله (۱) بازده تثبیت محاسبه شد (۱۱).

معادله (۱):

$100 \times \left[\frac{\text{غلظت اولیه کوئرستین}}{\text{غلظت کوئرستین در محلول رویی}} - \text{غلظت اولیه کوئرستین} \right] = \text{بازده تثبیت}$

به سستی چسبیده بودند نیز در اثر شستشو با بافر فسفات جدا شدند و آن دسته از سلول‌های باکتریایی که تشکیل بیوفیلیم داده‌اند با رنگ‌آمیزی کریستال ویوله مشخص گردید (۱۲). به این ترتیب که به هر چاهک حدود ۲۰۰ میکرولیتر متانول اضافه شد تا سلول‌های چسبیده به مدت ۱۵ دقیقه ثابت شوند. سپس متانول خارج شده و ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله به هر چاهک اضافه شد و بعد از ۵ دقیقه رنگ اضافی هر پلیت با آب مقطر شسته شده و پلیت در معرض هوا خشک گردید. رنگ جذب شده به وسیله میکرواورگانایسم‌ها توسط ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد حجمی/حجمی حل و جذب هر چاهک در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. جذب محیط کشت فاقد کوئرستین به عنوان کنترل منفی گزارش گردید. درصد مهار تشکیل بیوفیلیم برای هر میکرواورگانایسم از معادله (۲) به دست آمد (۱۳).

معادله (۲):

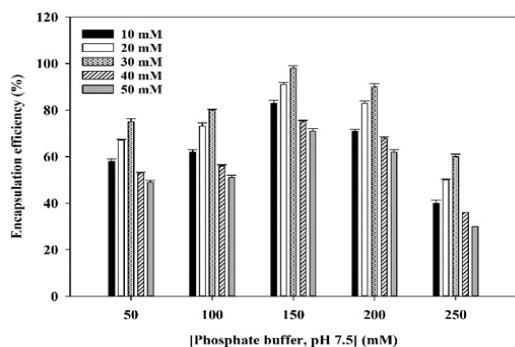
$$= 100 \times \left[\frac{\text{جذب کنترل}}{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}} \right] = \text{درصد مهار چسبندگی}$$

(ز) اندازه‌گیری میزان تخریب بیوفیلیم: در این مطالعه، همچنین توانایی کوئرستین آزاد و تثبیت شده در تخریب بیوفیلیم‌های حاصل از باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور از هر یک از میکرواورگانایسم‌ها، سوسپانسیون با غلظت ۱۰۷ کلنی بر میلی‌لیتر در محیط مایع لوریه برتانی حاوی ۲ درصد ساکارز وزنی/حجمی تهیه و به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه وارد شد. پلیت به گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس منتقل گردید و پس از گذشت ۲۴ ساعت و تشکیل بیوفیلیم، سلول‌های چسبیده نشده از چاهک‌ها خارج و در نهایت به هر خانه از پلیت مذکور، غلظت‌های مختلفی از نمونه‌های کوئرستین آزاد و یا تثبیت شده (غلظت ۷ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) وارد شد. مجدداً پلیت به گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس منتقل و پس از گذشت ۲۴ ساعت مشابه با روش ذکر شده در قسمت ۶-۲ میزان بیوفیلیم تشکیل شده در هر چاهک رنگ‌آمیزی و اندازه‌گیری گردید (۱۲ و ۱۳).

ه) تعیین ویژگی‌های ساختاری نانوالیاف‌های هیبریدی: به منظور تعیین ویژگی‌های ریخت‌شناسی نانو ساختارهای هیبریدی از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) با مشخصات Hithach-4300 ساخت کشور ژاپن استفاده گردید (۵). این میکروسکوپ الکترونی مجهز به آنالیز طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) بود که از آن برای تشخیص درصد عناصر تشکیل‌دهنده نمونه‌ها استفاده شد. همچنین برای تعیین فاز بلورین (کریستالی) نانوالیاف‌های هیبریدی از دستگاه الگوی پراش اشعه ایکس Philips (XRD) مدل PW1730 ساخت کشور هلند استفاده شد. طیف‌های مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) نمونه‌ها با دستگاه Shimadzu مدل Equinox 55 ساخت کشور ژاپن ثبت گردید. با استفاده از این روش ارتعاش پیوندها (که ناشی از تغییر طول پیوند و یا زاویه پیوند در مولکول‌ها است) بررسی شد. با کمک آنالیز گرماسنجی حرارتی (TGA) به دست آمده توسط دستگاه Perkin Elmer STA 6000 ساخت آمریکا و محاسبه تغییرات وزن نانو ساختارهای هیبریدی با افزایش دما از ۵۰ تا ۶۰۰ درجه سلسیوس، حضور کوئرستین در این نانو ساختارها اثبات گردید (۱۱، ۱۰).

و) بررسی مهار تشکیل بیوفیلیم‌های باکتریایی: به منظور ارزیابی توان کوئرستین آزاد و تثبیت شده در غلظت ۷ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلیم، دو باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کلی همچنین دو باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس به عنوان عوامل تشکیل‌دهنده بیوفیلیم انتخاب شدند. باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط مایع لوریه برتانی کشت داده شدند. سپس از هر یک از میکرواورگانایسم‌ها، سوسپانسیون با غلظت ۱۰۷ کلنی بر میلی‌لیتر در محیط مایع لوریه برتانی حاوی ۲ درصد ساکارز تهیه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون میکروبی به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کوئرستین تثبیت شده در داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته و پلیت به گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس منتقل شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌هایی که به کف پلیت نچسبیده‌اند خالی و سلول‌هایی که

کرده‌اند (۱۴). متعاقباً گروه‌های هیدروکسیل کوئرستین به یون‌های باریوم در کمپلکس‌های فسفات باریوم متصل گردیده تا زنجیره‌های افقی را در مرحله رشد تشکیل دهند و سپس زنجیره‌ها به یکدیگر چسبیده‌اند تا نانوساختارهای هیبریدی نهایی تولید شوند (۷). بازده میزان محصورسازی کوئرستین پارامتر مهمی در ارزیابی و پیدا کردن بهترین شرایط لازم برای آماده سازی نانوساختارهای هیبریدی است (۷). به این ترتیب، با استفاده از معادله حاصل از منحنی کالیبراسیون، مقدار کوئرستین تثبیت شده در حضور هر غلظت از بافر فسفات سدیم (pH ۷/۵) و نمک سولفات باریوم به دست آمد (شکل ۲). بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان بیان نمود که غلظت بافر و نمک، هر دو به عنوان عوامل تأثیرگذار در فرآیند تثبیت کوئرستین نقش دارند به طوری که با افزایش غلظت بافر از ۵۰ میلی‌مولار تا ۱۵۰ میلی‌مولار، میزان بازده تثبیت افزایش یافت؛ این درحالی است که هرگاه غلظت از ۱۵۰ میلی‌مولار افزایش پیدا کرد میزان بازده تثبیت کاهش یافت. همچنین زمانی که غلظت سولفات باریوم مورد استفاده در ساخت نانوالیاف هیبریدی ۳۰ میلی‌مولار بود فرآیند انکپسوله شدن موفق‌تر و دارای بازده بالاتری نسبت به سایر غلظت‌های نمک بود. بنابراین برای ادامه این مطالعه نانوساختارهای هیبریدی در حضور غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات و ۳۰ میلی‌مولار نمک سولفات باریوم تهیه شدند که بازده تثبیت ۹۵ درصد داشت.



شکل ۲: تأثیر غلظت بافر فسفات سدیم و نمک سولفات باریوم بر بازده محصورشدن کوئرستین در نانوالیاف‌های هیبریدی فسفات باریوم با میانگین حاصل از سه مرتبه تکرار هر آزمایش.

ح) تجزیه و تحلیل میکروسکوپی بیوفیلم‌های باکتریایی: به منظور اثبات اثر ضدبیوفیلمی الیاف‌های هیبریدی کوئرستین-فسفات باریوم، تصویربرداری از سطح بیوفیلم‌ها با استفاده از میکروسکوپ هم‌کانونی (کونفوکال) Nikon ساخت کشور ژاپن انجام گرفت. برای این منظور باکتری سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک مدل باکتری تشکیل دهنده بیوفیلم انتخاب شد و پس از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط مایع لوریه برتانی، سوسپانسیون میکروبی با غلظت ۱۰۷ کلنی بر میلی‌لیتر از این باکتری تهیه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نانوالیاف‌های هیبریدی حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کوئرستین به ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون اضافه گردید و نمونه به گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس منتقل شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، پلیت میکروبی از گرمخانه خارج شده و سلول باکتری که به پلیت نچسبیده‌اند در اثر شستشو با بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار حذف گردید. سپس رنگ رودامین بی با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر خانه از چاهک منتقل شد. پس از نگهداری پلیت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت تصاویری از سطح بیوفیلم تهیه و با نمونه تصاویر حاصل از بیوفیلم مجاورشده با کوئرستین آزاد مقایسه شد. به عنوان کنترل و اطمینان از صحت آزمایش انجام شده از نمونه‌های باکتری تیمار نشده نیز تصاویری تهیه گردید (۱۲).

ط) محاسبه آماری داده‌ها: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش‌های آماری تحلیل واریانس یک و دو طرفه (ANOVA)، آزمون تی وابسته و آزمون تعقیب توکی در سطح $p < 0/05$ استفاده شد. کلیه محاسبات آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار سیگما پلات نسخه ۱۴ انجام گرفت (۵).

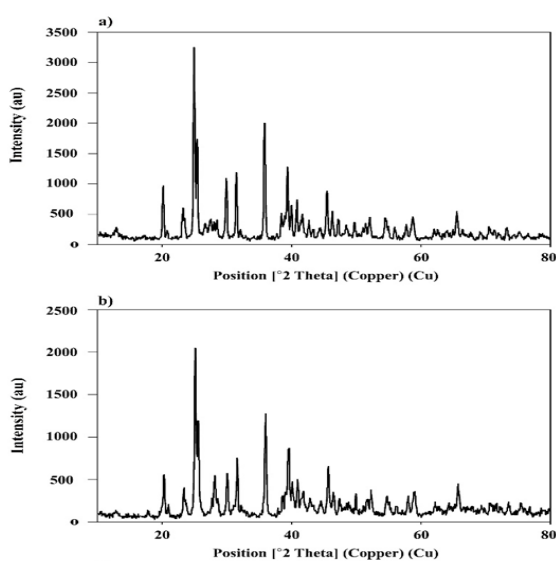
یافته‌ها

الف) تهیه نانوالیاف‌های هیبریدی کوئرستین-فسفات باریوم: در جریان ساخت نانوالیاف‌های هیبریدی، بنظر می‌رسد که طی روش هم‌رسوبی ابتداء یون‌های باریوم در مجاورت با یون‌های فسفات ایجاد کمپلکس اولیه فسفات باریوم کرده و کمپلکس‌های حاصل به عنوان مراکز اولیه هسته‌زایی عمل

جدول ۱: درصد عناصر تشکیل دهنده کریستالهای فسفات باریوم و نانوالیافهای هیبریدی کوئرتستین-فسفات باریوم بر طبق داده‌های به‌دست آمده از EDX.

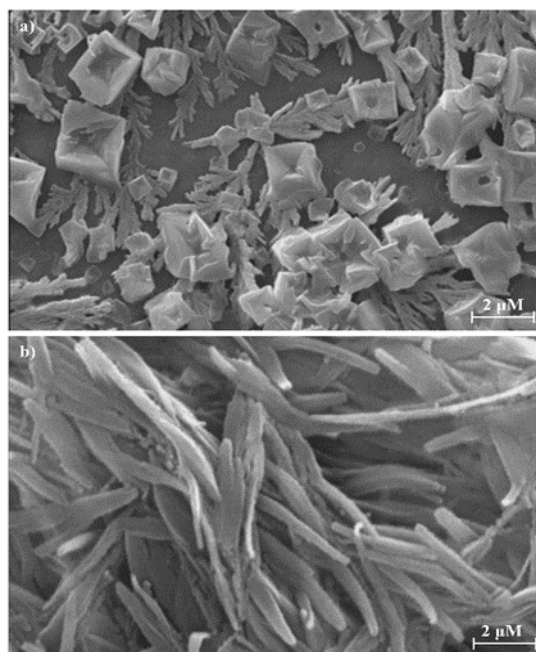
نام نمونه	سهم عناصر سازنده (درصد)					
	باریوم	فسفر	اکسیژن	کربن	گوگرد	نیتروژن
نانوساختارهای فسفات باریوم	۲۵	۳۲	۲۱	۱۶	۴	۲
نانوالیافهای هیبریدی کوئرتستین فسفات باریوم	۲۰	۲۵	۳۳	۱۸	۳	۱

آنالیز کریستالوگرافی نمک فسفات باریوم و نانوالیافهای هیبریدی کوئرتستین-فسفات باریوم در شکل ۴ به تصویر کشیده شده است. همانطور که نمایان است پراش پرتو ایکس بر سطح ذرات نمک فسفات باریوم ایجاد پیک‌های تیز، با پهنای کم و شدت بالا نموده است که نشان دهنده ساختار کریستالی و درصد بلورینگی بالای آن است. پس از اضافه شدن کوئرتستین به ساختار و ایجاد نانوالیافهای هیبریدی، طیف الگوی XRD تقریباً مشابه با پهن شدن شدگی جزئی داشت. به‌علاوه، برای هر دو نمونه حداکثر پراش‌ها در موقعیت ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۸ تتا واقع شده که بر طیف استاندارد فسفات باریوم (PDF# No. 25-0028) منطبق بودند (۱۸).



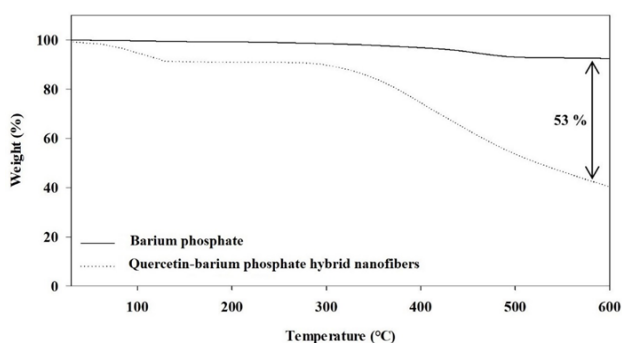
شکل ۴: الگوی پراش اشعه‌ی پرتو ایکس (XRD)، (a) نمک فسفات باریوم و (b) نانوساختارهای هیبریدی کوئرتستین-فسفات باریوم.

(ب) بررسی ویژگی‌های ساختاری نانوالیافهای هیبریدی: ویژگی‌های ریخت شناسی نانوساختارهای فسفات باریوم و کوئرتستین-فسفات باریوم با استفاده از SEM مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). همانطور که مشاهده می‌شود نمک فسفات باریوم دارای ساختار کریستالی مکعبی شکل و تقریباً یکنواخت است. با این حال، ذرات کوئرتستین-فسفات باریوم دارای ساختار الیافی شکل، سه بُعدی، صاف و یکنواختی را به نمایش گذاشته‌اند. بنابراین، کوئرتستین بین کوئرتستین و یون‌های باریوم سبب ایجاد ظاهر متفاوتی پس از فرآیند ساخت ذرات هیبریدی شده است. همچنین نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) نانوساختارهای فسفات باریوم و کوئرتستین-فسفات باریوم در جدول ۱ گزارش شده است. همانطور که مشاهده می‌شود ساختارهای فسفات باریوم و نانوالیافهای هیبریدی عمدتاً از عناصر باریوم، اکسیژن، فسفر و کربن تشکیل شده‌اند. با این حال، ساختارهای هیبریدی حاوی کوئرتستین بواسطه حضور گروه‌های عاملی غنی از اکسیژن از جمله کربونیل و فنل، محتوای بیشتری از این عنصر را داشتند.



شکل ۳: تصاویر به‌دست آمده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (a) نمک فسفات باریوم و (b) نانوساختارهای هیبریدی کوئرتستین-فسفات باریوم.

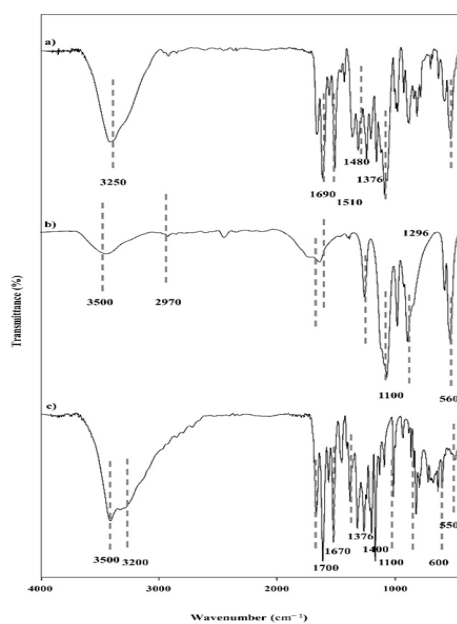
از نتایج آنالیز گرماسنج حرارتی برای تأیید و تعیین مقدار کوثرستین محصورشده در نانوساختارهای هیبریدی استفاده شد. براساس آنچه در شکل ۶ نشان داده شده در طول افزایش دما از ۵۰ تا ۶۰۰ درجه سلسیوس، کاهش ۵ درصدی وزن برای کریستالهای نمک سولفات باریوم مشاهده شد که ممکن است مربوط به از دست دادن فیزیکی یا شیمیایی آب جذب شده بر سطح نانوذرات نمک باشد. درحالی که منحنی گرماسنج حرارتی منسوب به نانوالیافهای هیبریدی در این محدوده دمایی دو مرحله کاهش از وزن را متحمل شده است. مرحله اول که در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس اتفاق افتاده و مربوط به از دست دادن محتوای آب ساختار بوده و مرحله دوم در نزدیکی ۳۰۰ درجه سلسیوس و به دلیل جدا شدن کوثرستین از ساختار الیافهای هیبریدی اتفاق افتاده است و کاهش وزنی معادل با ۵۳ درصد را در پی داشته است (۱۹).



شکل ۶: تجزیه و تحلیل حرارتی (TGA)، (a) نمک فسفات باریوم و (b) نانوساختارهای هیبریدی کوثرستین-فسفات باریوم در محدوده دمایی ۵۰ تا ۶۰۰ درجه سلسیوس.

ج) فعالیت ضدبیوفیلمی نانوالیافهای هیبریدی: پس از تثبیت کوثرستین بر سطح الیاف هیبریدی، فعالیت ضدبیوفیلمی این نانوساختارها شامل جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و توانایی تخریب آن اندازه‌گیری گردید و با کوثرستین آزاد مقایسه شد. طبق شکل ۷، با افزایش غلظت نانوالیافهای هیبریدی در محیط باکتری احتمال تشکیل بیوفیلم‌ها به شدت کاهش پیدا کرده به طوری که احتمال تشکیل بیوفیلم‌های باکتری سودوموناس آئروژینوزا در مجاورت با غلظت‌های مساوی و

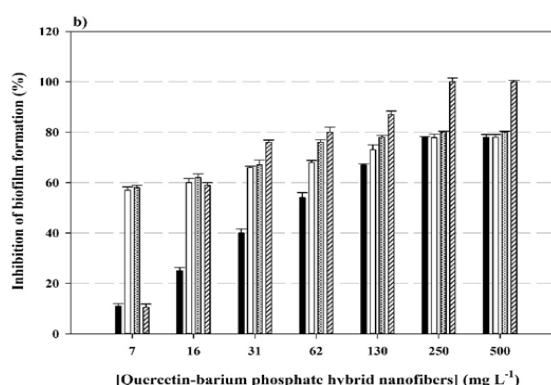
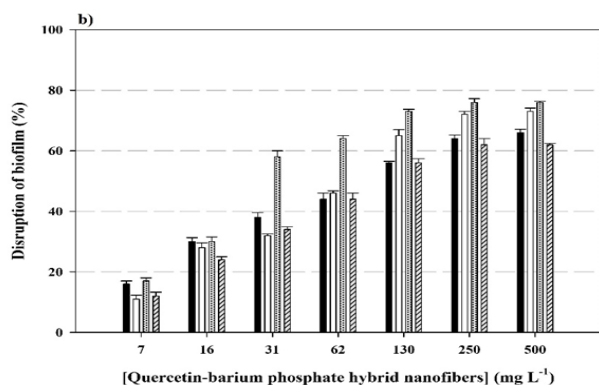
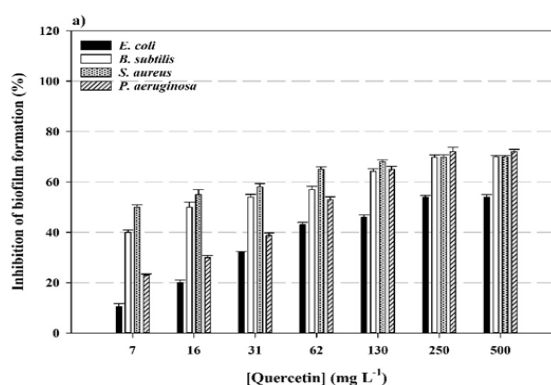
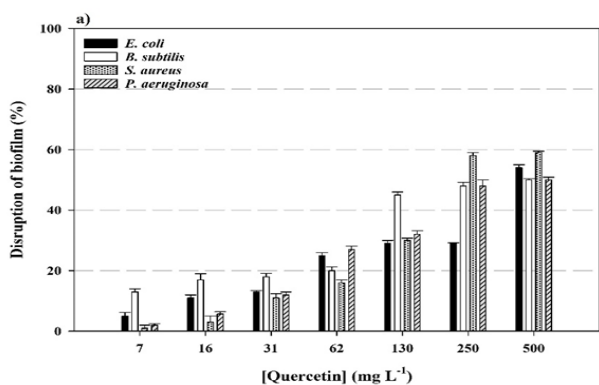
طیف‌سنجی مادون قرمز برای تعیین پیوندهای شیمیایی و گروه‌های عاملی موجود بر سطح نانوساختارهای باریوم فسفات و نانوفیبرهای هیبریدی کوثرستین-فسفات باریوم استفاده شد. همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است پیک موجود در موقعیت 3250 cm^{-1} و 3500 cm^{-1} به پیوند O-H کششی موجود در مولکول‌های آب و کوثرستین نسبت داده شده است. پیک‌های موجود در موقعیت‌های $550\text{--}560\text{ cm}^{-1}$ ، 600 cm^{-1} و 1100 cm^{-1} را می‌توان به گروه‌های فسفات موجود در ساختار باریوم فسفات و نانوفیبرهای هیبریدی کوثرستین-فسفات باریوم نسبت داد. وجود پیوند O-Ba با پیک‌های موجود در موقعیت $2970\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ مشخص گردیده است. در طیف مربوط به کوثرستین آزاد و تثبیت شده پیک‌هایی در موقعیت $1700\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ دیده شده است که می‌تواند به دلیل وجود باندهای C=C کششی باشد. همچنین ارتعاشات گروه کربونیل (C=O) پیک‌های محدوده $1600\text{ تا }1750$ را پوشش می‌دهد. پیوندهای موقعیت 1296 cm^{-1} ، 1376 cm^{-1} و 1480 cm^{-1} را می‌توان به پیوند C-H گروه آلکیل نسبت داد (۱۸).



شکل ۵: طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)، (a) کوثرستین، (b) نمک فسفات باریوم و (c) نانوساختارهای هیبریدی کوثرستین-فسفات باریوم در محدوده $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$.

توانایی ضعیفی در حذف بیوفیلم‌های تشکیل شده توسط انواع سویه‌های باکتریایی دارد. این درحالی است که کوئرستین تثبیت شده در غلظت ۱۳۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب قادر به تخریب ۷۵ و ۷۰ درصدی بیوفیلم‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس است که به صورت معناداری نسبت به کوئرستین آزاد بیشتر بوده است ($p < 0/05$). با توجه به داده‌های به دست آمده و با توجه به شکل ۸ توانایی کوئرستین آزاد و تثبیت شده در غلظت‌های بالای ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تقریباً ثابت مانده است.

بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از الیاف‌ها تا ۱۰۰ درصد کاهش یافت. در غلظت مشابه، این نانوساختارهای هیبریدی میزان تشکیل بیوفیلم ناشی از باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و اشریشیا کلی را تا حدود ۸۰ درصد مهار کردند. این درحالی است که در حضور کوئرستین آزاد با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و بیشتر از آن احتمال تشکیل بیوفیلم ناشی از باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سوبتیلیس به اندازه تقریباً ۷۰ درصد کاهش یافت. با توجه به نتایج مشاهده شده در شکل ۷ با افزایش غلظت هریک از کوئرستین‌های آزاد و تثبیت شده میزان مهار تشکیل بیوفیلم به مقدار ثابتی رسید.



شکل ۸: اثر غلظت‌های مختلف (a) کوئرستین آزاد و (b) تثبیت شده در تخریب بیوفیلم‌های حاصل از سویه‌های مختلف باکتریایی.

تصاویر میکروسکوپ کونفوکال برای تجسم اثر مهارتی کوئرستین آزاد و تثبیت شده در تشکیل ساختارهای بیوفیلمی حاصل از باکتری سودوموناس آئروژینوزا است. در این روش محتوای رنگ قرمز نشان دهنده بیوفیلم‌های تشکیل شده در

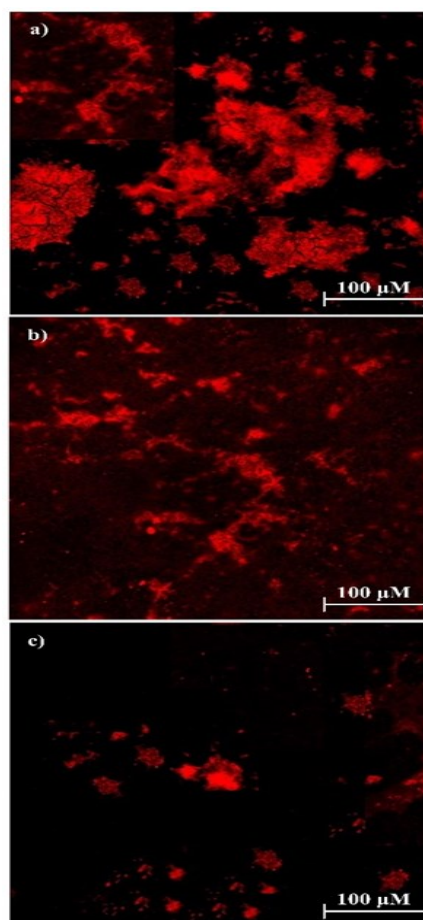
شکل ۷: بررسی اثر غلظت‌های مختلف (a) کوئرستین آزاد و (b) تثبیت شده در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم‌های باکتریایی.

اثر کوئرستین آزاد و نانوالیاف‌های هیبریدی کوئرستین-فسفات باریوم در تخریب بیوفیلم‌های باکتریایی در شکل ۸ نشان داده شده است. براساس نتایج، کوئرستین آزاد به‌ویژه در غلظت‌های ۱۳۰ میلی‌گرم بر لیتر و کمتر از آن

شد. هیبریدهای کوئرستین-فسفات باریوم دارای ساختارهای نانوالیافی، سه بعدی صاف و یکنواخت بودند که مقدار عنصر اکسیژن موجود در آن‌ها نسبت به نمک فسفات باریوم بسیار بالاتر بود. با نگاهی به مطالعات گذشته می‌توان اذعان نمود که مورفولوژی ساختارهای هیبریدی به شدت از بخش‌های آلی و معدنی آن‌ها تبعیت می‌کند؛ بطوری که تاکنون ساختارهایی با اشکال متفاوت از جمله گُل، میله، زنجیره، کروی و غیره تهیه شده‌اند (۷). با توجه به نتایج آنالیز گرماسنج حرارتی تغییر وزن ناشی از تثبیت کوئرستین به عنوان جزء آلی موجود در نانوساختارهای سنتز شده به صورت قابل ملاحظه‌ای بالاتر از مقادیر گزارش شده برای سایر نانوساختارهای هیبریدی است. بطور مثال، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۲ انجام شد (۱۱) پس از تثبیت آنزیم لاکاز بر سطح نانوساختارهای هیبریدی مغناطیسی تفاوت دمایی ۲۳ درجه سلسیوس گزارش شده است که مبین میزان تثبیت پایین‌تر جزء آلی نسبت به مطالعه حاضر است. بازده تثبیت کوئرستین در این مطالعه به صورت قابل توجهی بالاتر از مطالعات مشابه پیشین بود. بطور مثال، بازده تثبیت کوئرستین در نانوذرات لیپیدی، پروتئین ذرت و آب پنیر پوشش داده شده توسط آمیلوپکتین ریشه نیلوفر آبی به ترتیب ۶۲، ۸۶ و ۹۲ درصد بوده است (۱۷-۱۵).

نانوالیاف‌های هیبریدی ساخته شده توانایی بالایی در مهار تشکیل بیوفیلم‌های باکتریایی به‌ویژه در مورد *سودوموناس آئروژینوزا* دارد. به‌علاوه این نانوالیاف‌ها قادر به تخریب بیوفیلم‌های تشکیل شده باکتریایی به‌ویژه در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. برای غلظت‌های کمتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، فعالیت ضدبیوفیلمی کوئرستین آزاد و تثبیت شده وابسته به غلظت بود. با نگاهی به مطالعات مشابه اخیر، می‌توان گفت که تثبیت کوئرستین بر سطح پایه‌های مختلف به میزان مؤثری منجر به بهبود اثرات ضد میکروبی و ضدبیوفیلمی آن شده‌است. به‌طور مثال، این فلاونوئید پس از تثبیت بر سطح ساختارهای زیست تخریب‌پذیر پلی(اسیدلاکتیک-کو-اسیدگلیکولیک) قادر به مهار ۸۰ درصدی *استافیلوکوکوس اورئوس* و مهار ۹۶ درصدی *لیستریا مونوسیتوزنز*

سطح پلیت است. بر طبق آنچه در شکل ۹ نشان داده است میزان رنگ قرمز در نمونه‌های تیمار شده با نانوالیاف‌های هیبریدی به میزان قابل توجهی کمتر از نمونه‌های مجاور شده با کوئرستین آزاد بوده که اثباتی بر اثر ضدبیوفیلمی قوی‌تر فلاونوئید تثبیت شده است. بر طبق نتایج به‌دست آمده محصور سازی کوئرستین در ساختارهای هیبریدی سبب بروز فعالیت ضدبیوفیلمی بیشتر این فلاونوئید شده است؛ اما توصیف علت این اثر پیچیده است.



شکل ۹: تصاویر میکروسکوپی هم‌کانونی (کانفوکال) به‌دست آمده از بیوفیلم‌های حاصله از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (a) تیمار نشده به عنوان کنترل و پس از ۲۴ ساعت تیمار با (b) کوئرستین آزاد و (c) نانوالیاف هیبریدی کوئرستین-فسفات باریوم.

بحث

در این مطالعه نانوالیاف‌های هیبریدی با روش هم‌رسوبی یون باریوم و فسفات و کوئوردیناسیون این یون‌ها با کوئرستین تهیه

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد استفاده از نانوالیاف‌های هیبریدی کوئرستین-فسفات باریوم به عنوان یک ترکیب ارزان قیمت، در دسترس و موثر، آینده امیدبخش و روشنی در مصارف پزشکی و ضدعفونی کننده‌های محیطی داشته باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی کلیه نکات اخلاقی اعم از سرقت ادبی، عدم انتشار دوگانه و تحریف داده‌ها را رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاصل با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته است.

تعارض منافع

وجود ندارد.

شده است (۴). همچنین پس از تثبیت کوئرستین بر ساختار نانوالیاف‌های سازگار با سلول، میزان تشکیل بیوفیلیم‌های ناشی از *کاندیدا/آلبیکانسیس* به میزان چشم‌گیری کاهش یافته است (۲۰). براساس مطالعاتی که تاکنون درخصوص فعالیت ضدبیوفیلمی کوئرستین انجام شده این فلاونوئید قادر است با پروتئین‌های غشایی، لیپیدها و آنزیم‌های میکروبی تعامل داشته باشد و با تغییر در نفوذپذیری سلولی منجر به ازدست دادن یونها، پروتون‌ها یا ماکرومولکول‌ها و در نهایت ایجاد اختلال در یکپارچگی غشاء سلولی گردد (۲۲-۲۰). علاوه‌براین، کوئرستین با سرکوب مسیرهای پیام‌رسان بین سلولی، مهار سنتز اسیدهای نوکلئیک و ایجاد اختلال در چسبیدن سلول‌های باکتری بر لایه‌های زیرین باعث مهار تشکیل بیوفیلیم گردد. براساس نتایج مطالعه حاضر، بنظر می‌رسد تثبیت در نانوالیاف‌های هیبریدی منجر به افزایش اثر ضدبیوفیلمی آن شده است (۲۲-۲۰).

References

1. Wang Y, Tao B, Wan Y, Sun Y, Wang L, Sun J, Li C. Drug delivery based pharmacological enhancement and current insights of quercetin with therapeutic potential against oral diseases. *Biomed Pharmacother*. 2020; 128: 110372.
2. Salehi B, Machin L, Monzote L, Sharifi-Rad J, Ezzat SM, Salem MA, Merghany RM, El Mahdy NM, Kılıç CS, Sytar O, Sharifi-Rad M. Therapeutic potential of quercetin: New insights and perspectives for human health. *Acs Omega*. 2020; 5(20): 11849-72.
3. Liu Y, Ji X, He Z. Organic-inorganic nanoflowers: from design strategy to biomedical applications. *Nanoscale*. 2019; 11(37): 17179-94.
4. Arasoğlu T, Derman S, Mansuroğlu B, Uzunoğlu D, Koçyiğit BS, Gümüş B, Acar T, Tuncer B. Preparation, characterization, and enhanced antimicrobial activity: quercetin-loaded PLGA nanoparticles against foodborne pathogens. *Turk J Biol*. 2017; 41(1): 127-40.
5. Kiani M, Mojtavavi S, Jafari-Nodoushan H, Tabib SR, Hassannejad N, Faramarzi MA. Fast anisotropic growth of the biomineralized zinc phosphate nanocrystals for a facile and instant construction of laccase@ Zn₃(PO₄)₂ hybrid nanoflowers. *Int J Biol Macromol*. 2022; 204: 520-31.
6. Fathali Z, Rezaei S, Faramarzi MA, Habibi-Rezaei M. Catalytic phenol removal using entrapped cross-linked laccase aggregates. *Int J Biol Macromol*. 2019; 122: 359-66.

7. Jafari-Nodoushan H, Mojtabavi S, Faramarzi MA, Samadi N. Organic-inorganic hybrid nanoflowers: The known, the unknown, and the future. *Adv Colloid Interface Sci.* 2022; 102780.
8. Emami S, Foroumadi A, Faramarzi MA, Samadi N. Synthesis and antibacterial activity of quinolone-based compounds containing a coumarin moiety. *Arch Pharm.* 2008; 341(1): 42–8.
9. Machado IE, Prado L, Gomes L, Prison JM, Martinelli JR. Optical properties of manganese in barium phosphate glasses. *J Non-Cryst Solids.* 2004; 348: 113–7.
10. Shokri M, Mojtabavi S, Jafari-Nodoushan H, Vojdanitalab K, Golshani S, Jahandar H, Faramarzi MA. Laccase-loaded magnetic dialdehyde inulin nanoparticles as an efficient heterogeneous natural polymer-based biocatalyst for removal and detoxification of ofloxacin. *Biodegradation* 2022; 33(5): 489–508.
11. Rezayaraghi F, Jafari-Nodoushan H, Mojtabavi S, Golshani S, Jahandar H, Faramarzi MA. Hybridization of laccase with dendrimer-grafted silica-coated hercynite-copper phosphate magnetic hybrid nanoflowers and its application in bioremoval of gemifloxacin. *Environ Sci Pollut Res.* 2022; 29(59): 89255–72.
12. Mojtabavi S, Khoshayand MR, Torshabi M, Gilani K, Fazeli MR, Faramarzi MA, Samadi N. Formulation, characterization, and bioactivity assessments of a laccase-based mouthwash. *J Drug Delivery Sci Technol.* 2022; 69: 103128.
13. Mojtabavi S, Khoshayand MR, Fazeli MR, Faramarzi MA, Samadi N. Development of an enzyme-enhancer system to improve laccase biological activities. *Int J Biol Macromol.* 2021; 173: 99–108.
14. Vojdanitalab K, Jafari-Nodoushan H, Mojtabavi S, Shokri M, Jahandar H, Faramarzi MA. Instantaneous synthesis and full characterization of organic–inorganic laccase-cobalt phosphate hybrid nanoflowers. *Sci Rep.* 2022; 12(1): 1–6.
15. Khan MA, Zhou C, Zheng P, Zhao M, Liang L. Improving physicochemical stability of quercetin-loaded hollow zein particles with chitosan/pectin complex coating. *Antioxidants.* 2021; 10(9): 1476.
16. Hariri P, Jafari-Nodoushan H, Mojtabavi S, Hadizadeh N, Rezayaraghi F, Faramarzi MA. Magnetic casein aggregates as an innovative support platform for laccase immobilization and bioremoval of crystal violet. *Int J Biol Macromol.* 2022; 202: 150–60.
17. Scalia S, Mezzena M. Incorporation of quercetin in lipid microparticles: Effect on photo-and chemical-stability. *J Pharm Biomed Anal.* 2009; 49(1): 90–4.
18. Yu XN, Qian CX, Wang X. Bio-inspired synthesis of barium phosphates nanoparticles and its characterization. *Dig J Nanomater. Biostructures* 2015; 10: 199–205.

19. Barreto AC, Santiago VR, Mazzetto SE, Denardin JC, Lavín R, Mele G, Ribeiro ME, Vieira IG, Gonçalves T, Ricardo NM, Fachine PB. Magnetic nanoparticles for a new drug delivery system to control quercetin releasing for cancer chemotherapy. *J Nanopart Res.* 2011; 13(12): 6545–53.
20. Vashisth P, Nikhil K, Pemmaraju SC, Pruthi PA, Mallick V, Singh H, Patel A, Mishra NC, Singh RP, Pruthi V. Antibiofilm activity of quercetin-encapsulated cytocompatible nanofibers against *Candida albicans*. *J Bioact Compat Polym.* 2013; 28(6): 652–65.
21. Kim MK, Lee TG, Jung M, Park KH, Chong Y. In vitro synergism and anti-biofilm activity of quercetin–pivaloxymethyl conjugate against *Staphylococcus aureus* and Enterococcus Species. *Chem Pharm Bull.* 2018; 66(11): 1019–22.
22. Singh AK, Yadav S, Sharma K, Firdaus Z, Aditi P, Neogi K, Bansal M, Gupta MK, Shanker A, Singh RK, Prakash P. Quantum curcumin mediated inhibition of gingipains and mixed-biofilm of *Porphyromonas gingivalis* causing chronic periodontitis. *RSC Adv.* 2018; 8 (70): 40426–45.