Eco-phytochemical
Journal of Medicinal Plants
Print ISSN: 2322-3235
Online ISSN: 2783-4697
Islamic Azad University
Gorgan Branch
Iranian Society
of Medical Plants

Phytochemical, antimicrobial, anticancer and anti-Alzheimer investigation of the hydro-alcoholic leaf extract of *Eucalyptus globulus* L. in laboratory conditions

Morteza Karimpour[1], Amir Arasteh[1*]

[1] Department of biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran, Email: arasteh@iaurasht.ac.ir

Article type:
Research article

Article history
Received: 25-12-2022
Revised: 16-05-2023
Accepted: 17-05-2023

Keywords
Antioxidant
Alzheimer
Antibacterial
Eucalyptus
Phytochemistry

Abstract

This research evaluated the phytochemical, antimicrobial, anticancer and anti-Alzheimer properties of eucalyptus leaf extract (*Eucalyptus globulus* L.). The fresh leaves of the plant were collected from the suburbs of Rasht in the fall 2016. Extraction was done by maceration method and the composition of the extract was determined by GC-MS method. The antimicrobial effects of the extract were investigated on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* by agar well diffusion method and its MIC and MBC values were determined. The anticancer effect was determined by MTT test on the colon cancer cell line, the antioxidant effect was determined by DPPH method, and the inhibitory effect of the extract on the production of amyloid nano-fibrils was determined by Congored spectroscopy. Eucalyptol and Globulol were the most abundant in the extract. The diameter of the halo of non-growth of Eucalyptus hydro-alcoholic extract in the well diffusion method on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* were 12, 22, 26, and 15 mm, respectively. Also, the results of MIC and MBC in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were 0.625 and 1.25, respectively. These results in *Listeria monocytogenes* were 1.25 and 2.5; also, the results of MIC and MBC in *Salmonella Typhimurium* were 5 and 10 mg/ml, respectively. The highest anticancer activity, antioxidant effect, and inhibition of the production of amyloid nano-fibrils were observed at 100, 10, and 0.4 mg/ml of the extract, respectively. Due to its antimicrobial, antioxidant, and anti–amyloidogenic properties, eucalyptus extract can help treat infection and reduce the growth of cancer cells and the complications of Alzheimer's disease.

Cite this article as: Karimpour, M., Arasteh, A. (2023). Phytochemical, Antimicrobial, Anticancer and Anti-Alzheimer investigation of the hydro–alcoholic leaf extract of *Eucalyptus globulus* L. in laboratory conditions. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 11(1): 65-78.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch
Doi: 10.30495/ejmp.2023.1918213.1714
Dor: 20.1001.1.23223235.1402.11.1.5.6

اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی
شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۳۲۳۵
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۹۷
انجمن گیاهان دارویی ایران ثبت ۱۸۹۶۳
دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

بررسی فیتوشیمیایی، ضدمیکروبی، ضدسرطانی و ضدآلزایمری عصارهٔ هیدروالکلی برگ گیاه دارویی *Eucalyptus globulus* L. در شرایط آزمایشگاهی

مرتضی کریم‌پور[1]، امیر آراسته[1]*

[1] گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، رایانامه: arasteh@iaurasht.ac.ir

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۴
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۲/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۷

واژه‌های کلیدی:
آنتی اکسیدان
آلزایمر
آنتی باکتریال
اوکالیپتوس
فیتوشیمی

چکیده

این پژوهش به ارزیابی فیتوشیمیایی، ضدمیکروبی، ضدسرطانی و ضدآلزایمری عصارهٔ برگ گیاه اکالیپتوس (*Eucalyptus globulus* L.) پرداخته است. برگ‌های تازه گیاه در پاییز ۱۳۹۶ از حومه رشت جمع آوری گردید. عصاره گیری به روش خیساندن و ترکیبات عصاره با روش گازکروماتوگرافی جرمی تعیین گردید. اثر ضدمیکروبی عصاره علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*[1]، *اشریشیاکلی*[2]، *لیستریا مونوسیتوژنز*[3] و *سالمونلا تیفی موریوم*[4] با روش انتشار در آگار بررسی شد و مقادیر MIC و MBC آن تعیین گردید. اثر ضدسرطانی با آزمون MTT روی رده سلولی سرطان روده انجام شد و اثر آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH و اثر مهاری عصاره بر تولید نانورشته های آمیلوئیدی با طیف‌سنجی کنگورد تعیین گردید. ترکیبات اکالیپتول[5] و گلوبولول[6] بیشترین فراوانی را در عصاره داشتند. قطر هالهٔ عدم رشد عصارهٔ هیدروالکلی اکالیپتوس در روش چاهک روی باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا تیفی موریوم* به‌ترتیب ۱۲، ۲۲، ۲۶ و ۱۵ میلی‌متر و نتایج MIC و MBC در باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ترتیب ۰/۶۲۵ و ۱/۲۵ و در *لیستریا مونوسیتوژنز* به‌ترتیب ۱/۲۵ و ۲/۵ و در *سالمونلا تیفی موریوم* نیز به‌ترتیب ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. بیش‌ترین فعالیت ضدسرطانی در غلظت ۱۰۰ و بیش‌ترین اثر آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۱۰ و بیش‌ترین مهار تولید نانو رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره مشاهده شد. عصارهٔ اکالیپتوس به‌دلیل دارا بودن خاصیت ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آمیلوئیدی می‌تواند به درمان عفونت، کاهش رشد سلول‌های سرطانی و عوارض ناشی از بیماری آلزایمر کمک کند.

استناد: کریم‌پور، مرتضی؛ آراسته، امیر. (۱۴۰۲). بررسی فیتوشیمیایی، ضدمیکروبی، ضدسرطانی و ضدآلزایمری عصارهٔ هیدروالکلی برگ گیاه *Eucalyptus globulus* L. در شرایط آزمایشگاهی. *فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی*، ۱۱ (۱)، ۷۸-۶۵.

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.
Doi: 10.30495/ejmp.2023.1918213.1714
Dor: 20.1001.1.23223235.1402.11.1.5.6

1.Staphylococcus aureus
2. Escherichia coli
3. Listeria monocytogenes
4. Salmonella typhimurium
5. eucalyptol
6. globulol

مقدمه

یکی از شناخته شده ترین بیماری‌های آمیلوئیدی، آلزایمر است که یکی از دلایل مهم مرگ و میر در دنیا به‌شمار می‌رود. این بیماری با حضور پلاک غیرطبیعی پروتئین بتا آمیلوئید در مغز شناسایی می‌گردد (Scheltens et al., 2021). امروزه به سبب ناکارآمدی برخی داروهای شیمیایی و عوارض جانبی فراوان، توجهات مجدداً به گیاهان دارویی معطوف شده است.

اکالیپتوس[1] از درختان خانوادهٔ میرتاسه[2] و بومی استرالیاست (Zein et al., 2020). این گیاه نزدیک به یک قرن پیش وارد ایران شد و از آنجا که در هوای گرم و مرطوب بهتر رشد می‌کند، عمدتاً در نواحی شمالی و جنوبی کشت گردید. اکالیپتوس به‌دلیل داشتن خاصیت ضد توموری، در درمان سرطان نقش دارد (Abiri et al., 2021)، همچنین خاصیت ضدالتهابی و ضددرد دارد و یا دست‌کم می‌تواند سبب کاهش درد شود (Mondal et al., 2021). این گیاه دارای ترکیباتی است که آن را قادر می‌سازد تا به‌عنوان یک عامل ضدباکتری یا ضدعفونی‌کننده عمل کند (Yılmaz, 2021). همچنین خاصیت آنتی اکسیدانی آن سبب مهار رادیکال‌های آزاد می‌شود (Palma et al., 2021a).

در شرایط ناپایدار کننده، همه پروتئین‌ها از جمله آلبومین سرم گاوی به‌صورت رشته‌های آمیلوئیدی در می‌آیند که در آن زنجیره‌های بتا عمود بر محور تولید خود دیده می‌شوند. اگر ترکیبی بتواند از تولید این رشته‌ها ممانعت کند، می‌توان گفت که با مکانیزم مهار تولید رشته‌های آمیلوئیدی بر روند بیماری آلزایمر موثر است. آلبومین سرم گاوی، فراوان‌ترین پروتئین خون است که ۵۸۳ اسید آمینه دارد. این پروتئین ۶۰ درصد پروتئین‌های پلاسما را تشکیل می‌دهد (Martínez et al., 2022)، بنابراین به عنوان یک پروتئین ارزان و در دسترس برای تولید رشته‌های آمیلوئیدی مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق، عصاره هیدروالکلی *Eucalyptus globulus* L. مورد ارزیابی فیتوشیمیایی قرار گرفت و اثرات ضدمیکروبی آن بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* بررسی گردید. همچنین، اثرات آنتی اکسیدانی و مهاری آن بر رشد سلول‌های سرطانی و تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ عصارهٔ هیدروالکلی: برگ‌های تازه *Eucalyptus globulus* L. در پائیز ۱۳۹۶ از حومه رشت جمع‌آوری شد و در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت خشک و آسیاب گردید. در گام اول، ۱۰ گرم پودر خشک شدهٔ گیاه وزن و در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد حل شد. محلول به مدت ۷۲ الی ۹۶ ساعت روی شِیکر قرار گرفت و عصارهٔ آن از کاغذ صافی عبور داده شد. برای اطمینان از اینکه عصاره فاقد هر گونه آلودگی است، به مدت یک ساعت زیر نور UV قرار گرفت تا استریل شود. عصاره حاصله تا قبل از استفاده در یک ظرف دربسته و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد یخچال نگه‌داری شد (Sadatrasul et al., 2017).

بررسی فیتوشیمیایی عصارهٔ اکالیپتوس به روش گاز کروماتوگرافی جرمی (GC-MS): در این تحقیق از دستگاه Agilent 6890 با ستون DB-5 به طول ۳۰ متر، قطر داخلی۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. ابتدا ۱۰ میکرولیتر از عصاره در سرنگ GC-MS قرار داده شد. برنامهٔ دمایی آون از ۵۰ درجه آغاز شد و طی ۶۰ دقیقه، با نرخ ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه، تا دمای ۳۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد بالا رفت و سپس در این دما به‌مدت ۳ دقیقه باقی ماند. دمای محل تزریق ۲۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم

1. *Eucalyptus*
2. *Myrtaceae*

شد. از گاز هلیوم با سرعت ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان فاز متحرک استفاده شد. طیف نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت بود. ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از جمله زمان بازداری، اندیس کواتس و مقایسه این طیف‌ها با طیف‌های جرمی کتابخانه دستگاه GC/MS شناسایی شدند (Abbasi et al., 2020).

بررسی اثرات ضدمیکروبی عصارهٔ اکالیپتوس: روش انتشار در آگار با ایجاد چاهک برای باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکووس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا تیفی موریوم* در حضور عصارهٔ هیدروالکلی اکالیپتوس با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انجام شد و نتایج آن با نتایج آنتی‌بیوگرام آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و جنتامایسین، به‌عنوان نمونهٔ استاندارد، مقایسه گردید. آزمایش‌های MIC، MBC نیز برای هر چهار باکتری با سوسپانسیون میکروبی به کدورت نیم مک فارلند انجام شد و اثر عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس بر روی آن‌ها بررسی شد (Song et al., 2022).

بررسی اثر ضد سرطانی عصاره اوکالیپتوس روی رده سلولی سرطان روده با روش MTT: رده سلولی سرطان روده فریز شده از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه شد. ویال زیر هود روشن و در دمای آزمایشگاه به مدت ٦-٥ دقیقه ذوب شد و یک میلی لیتر از محیط کشت MEM داخل ویال ریخته شد. این محتویات در ۳ فلاسک کشت سلول ۲۵ میلی لیتری ریخته شد و برای یک هفته در انکوباتور CO_2 دار قرار گرفت. در طی این مدت میزان سطح سلولی تشکیل شده مورد بررسی قرار گرفت. پودر MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر فسفات مورداستفاده قرار گرفت.برای بررسی اثر ضد سرطانی از پلیت ۹٦ خانه استفاده شد. در ردیف اول ۵۰ میکرولیتر از سلول به همراه ۲۵ میکرولیتر از محیط کشت MEM حاوی ۲-۱ ٪ FBS ریخته شد. برای اطمینان و از بین بردن خطا، این کار در ۱۲ خانه از پلیت تکرار شد. در ردیف دوم برای هر خانه ۲۵ میکرولیتر سلول به همراه ۲۵ میکرولیتر از عصاره اکالیپتوس گلوبولوس با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به همراه ۲۵ میکرولیتر محیط کشت MEM اضافه شد و این هم در ۱۲ خانه تکرار شد. ردیف سوم خالی بود و در ردیف چهارم در هر خانه فقط ۵۰ میکرولیتر محیط کشت MEM به عنوان بلانک ریخته شد و ۱۲ بار تکرار شد. درب پلیت بسته شد و در شرایط استریل در انکوباتور CO_2 دار به مدت ٢٤ ساعت قرار گرفت. بعد از گذشت ٢٤ ساعت با سمپلر، مایعات موجود در بالای خانه های ردیف اول و دوم و چهارم از پلیت ۹٦ تایی برداشته شد و در هر خانه ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شد. سپس به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه و جای تاریک قرار داده شد. بعد از آن به همه خانه‌های ردیف اول و دوم و چهارم به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از DMSO اضافه گردید (Bhuyan et al., 2017). ترکیب DMSO حلال بلورهای فورمازان تولید شده در سلول زنده می باشد. پلیت برای یک ساعت دیگر در جای تاریک با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت و سپس با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ٦۳۰-۵۷۰ نانومتر، خوانده شد. میزان زنده ماندن سلولها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد زنده ماندن سلولها} = \frac{\text{میزان جذب در حضور عصاره}}{\text{میزان جذب سلولها به تنهایی}} \times ۱۰۰$$

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ اکالیپتوس به روش DPPH : ابتدا غلظت‌های مختلف شامل ۰/۰۱، ۰/۱ و همچنین ۱ تا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره اکالیپتوس در اتانول تهیه شد و سپس در گام بعدی،

آزمایش DPPH برای هر کدام از غلظت‌ها انجام شد. لوله‌ها به‌مدت ٦٠ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند تا رنگ آن‌ها از بنفش پررنگ به زرد تبدیل شود. دستگاه اسپکتروفوتومتر روی طول موج ٥١٨ نانومتر تنظیم شد و پس از صفر شدن دستگاه با محتویات لولهٔ بلانک (B)، میزان جذب لوله‌های C (Abs. C) و S (Abs. S) اندازه‌گیری شد. با استفاده از فرمول زیر درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی محاسبهٔ گردید (Diloksumpun et al., 2022).

$$\text{درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی} = 100 - \frac{\text{Abs. S}}{\text{Abs. C}} \times 100$$

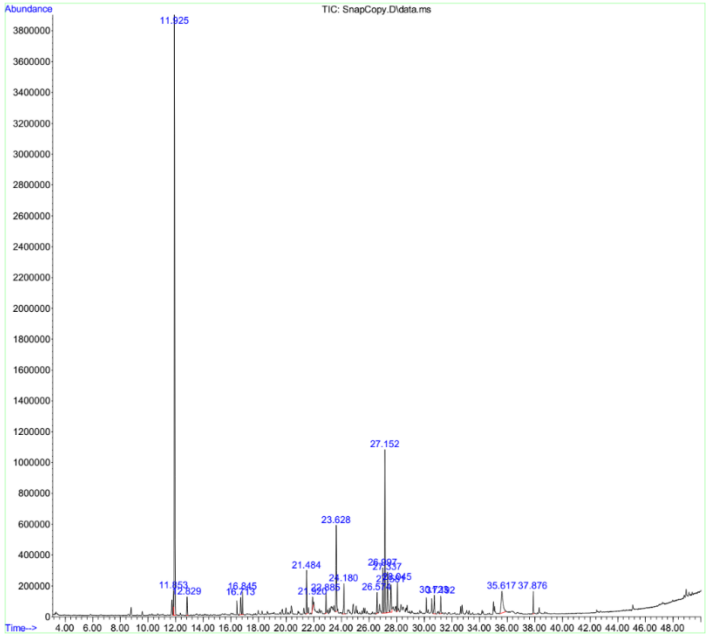
بررسی اثرات ضدآلزایمری عصاره اکالیپتوس به روش طیف‌سنجی مرئی: برای بررسی میزان مهار تولید رشته های آمیلوئیدی، فرایند تولید در حضور غلظت‌های مختلف از عصاره انجام شد و در هر مورد میزان تولید رشته‌ها با هم مقایسه گردید. برای این کار در شش میکروتیوپ هر کدام ٤٠٠ میکرولیتر از محلول آلبومین سرم گاوی با غلظت ٥ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ریخته شد و به‌ترتیب به آن‌ها مقادیر صفر، ٢٠، ٤٠، ٦٠، ٨٠ و ١٠٠ میکرولیتر از عصاره اوکالیپتوس اضافه شد. باقیمانده حجم تا ٥٠٠ میکرولیتر با بافر سیترات–فسفات پر شد. در هر یک از میکروتیوپ‌ها یک مگنت کوچک قرار گرفت و درب آنها با پارافیلم محکم بسته شد. میکروتیوپ ها برای مدت ٤٨ ساعت روی هیتر با دمای بین ٦٠ تا ٧٠ درجه سانتیگراد و دور ١٠٠ rpm به هم زده شدند. سپس میزان تولید رشته های آمیلوئیدی با روش طیف سنجی کنگورد اندازه گیری و ثبت شد. برای این کار ١٠٠ میلی لیتر از نمونه آمیلوئید به دست آمده (پس از ٤٨ ساعت) با ١٩٠٠ میلی لیتر از بافر کنگورد مخلوط شد و میزان جذب آن در محدوده ٤٠٠ تا ٦٠٠ نانومتر ثبت گردید (Arasteh et al., 2012).

نتایج

نتایج حاصل از روش گاز کروماتوگرافی جرمی (GC-MS): آنالیز عصاره هیدروالکلی برگ گیاه *Eucalyptus globulus* L. با روش گازکروماتوگرافی جرمی حضور هفده ترکیب مختلف را در عصاره ردیابی کرد که بیش‌ترین آنها ترکیب اکالیپتول بود. بر این اساس، در دقیقهٔ ١١/٩٢ مادهٔ اکالیپتول[1] به میزان ٤١/٢٨ درصد، در دقیقهٔ ٢١/٤٨ مادهٔ اوژنول[2] به میزان ٣/٠١ درصد، در دقیقهٔ ٢٣/٦٢ مادهٔ آروماندندرن[3] به میزان ٦/٩٨ درصد، در دقیقهٔ ٢٦/٩٩ ماده اسپاتولنول[4] به میزان ٣/٣٩ درصد، در دقیقه ٢٧/١٥ مادهٔ گلوبولول[5] به میزان ١١/٩٦ درصد، در دقیقه ٢٧/٣٣ ماده لدول (Ledol) به میزان ٤/١٢ و در دقیقه ٣٥/٦١ ترکیب نفتوکینون[6] به میزان ٦/٠٧ درصد در عصاره تأیید شد (جدول ١). نمودار کلی به دست‌آمده از روش کروماتوگرافی جرمی عصاره در شکل (١) قابل مشاهده است.

نتایج حاصل از بررسی اثرات ضدمیکروبی: اطلاعات مندرج در جدول (٢)، نتایج آزمون انتشار در آگار با ایجاد چاهک برای باکتری های *اشریشیاکلی*، *استافیلوکووس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا تیفی موریوم* در حضور عصارهٔ هیدروالکلی اکالیپتوس با غلظت ١٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. نتایج با آنتی‌بیوگرام آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و جنتامایسین، به‌عنوان نمونهٔ استاندارد، مقایسه گردید (شکل‌های ٢، ٣، ٤ و ٥).

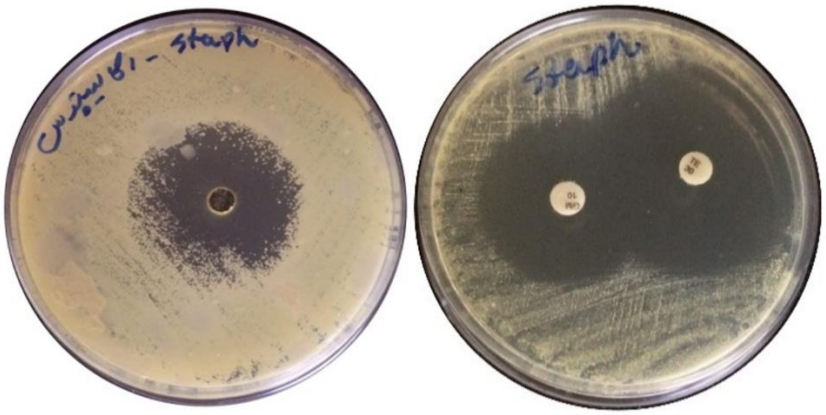
1. Eucalyptol
2. Eugenol
3. Aromandendrene
4. Spathulenol
5. Globulol
6. Naphthoquinone



شکل ۱: کروماتوگرام حاصل از آنالیز عصاره برگ *Eucalyptus globulus* L.

جدول ۱: کمیت و کیفیت فیتوشیمیایی عصاره برگ *Eucalyptus globulus* L. با روش گازکروماتوگرافی جرمی

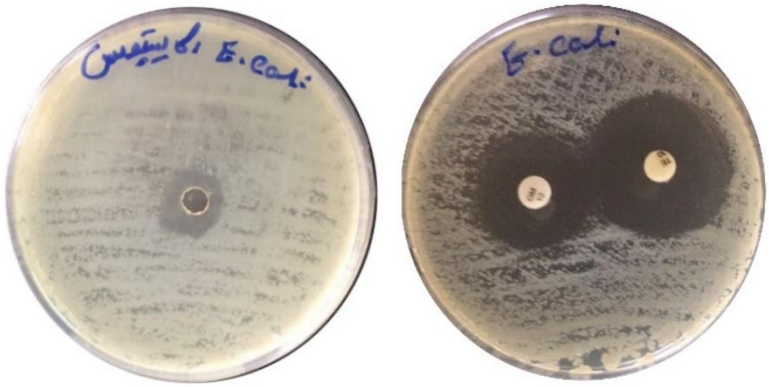
ردیف	ماده اصلی	زمان بازداری	احتمال حضور(درصد)	درصد حضور
۱	limonene	۱۱/۸۵	۹۱	۱/۷۸
۲	eucalyptol	۱۱/۹۲	۹۵	٤۱/۲۸
۳	γ-Terpinene	۱۲/۸۳	۹۳	۱/۳۲
٤	cryptone	۱٦/۷۱	۹٦	۱/٤۳
٥	α-Terpineol	۱٦/۸۲	۸٦	۱/٦۱
٦	eugenol	۲۱/٤۸	۹۸	۳/۰۱
۷	α-Gurjunene	۲۲/۸٥	۹۹	۱/٥۲
۸	aromandendrene	۲۳/٦۲	۹۹	٦/۹۸
۹	alloaromadendrene	۲٤/۱۷	۹۹	۲/٦٤
۱۰	epiglobulol	۲٦/٥۷	۹۹	۱/٥٤
۱۱	spathulenol	۲٦/۹۹	۹۰	۳/۳۹
۱۲	globulol	۲۷/۱٥	۹۹	۱۱/۹٦
۱۳	ledol	۲۷/۳۳	۹۳	٤/۱۲
۱٤	β-Eudesmol	۲۷/٥۸	۸٦	۳/۱۱
۱٥	sesquicineole	۳۰/۷۲	۷۲	۱/۷۹
۱٦	naphthoquinone	۳٥/٦۱	٦۲	٦/۰۷
۱۷	phytol	۳۷/۸۷	۹۱	۱/۷۹



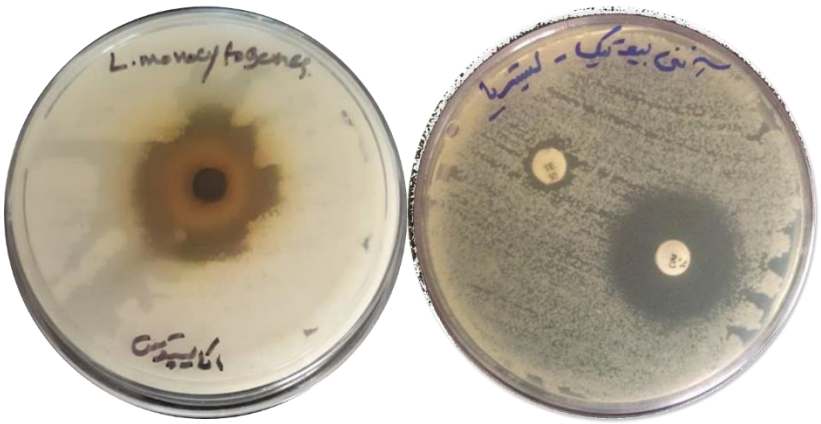
شکل ۲: تصاویر مربوط به قطر هاله‌عدم رشد عصارهٔ هیدروالکلی اکالیپتوس بر باکتری ***S. aureus***

جدول ۲: نتایج آنتی‌بیوگرام و روش انتشار در آگار با ایجاد چاهک از عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس

باکتری مورد بررسی	عصارهٔ اکالیپتوس ۱۰ mg/ml ۱۰ mg/ml(mm)	جنتامایسین (mm) ۱۰µg per Disk	تتراسایکلین (mm) ۳۰ µg per Disk
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۲	۳۵	٤۲
اشریشیا کلی	۱۲	۲۳	۳۰
لیستریا مونوسیتوژنز	۲٦	۹	۲۵
سالمونلا تیفی موریوم	۱۵ (با غلظت ۲۰ mg/ml)	۲۱	۳۰



شکل۳: تصاویر مربوط به قطر هاله‌عدم رشد عصارهٔ هیدروالکلی اکالیپتوس بر باکتری *E. Coli*



شکل٤: تصاویر مربوط به قطر هاله‌عدم رشد عصارهٔ هیدروالکلی اکالیپتوس بر باکتری *L .monocytogenes*

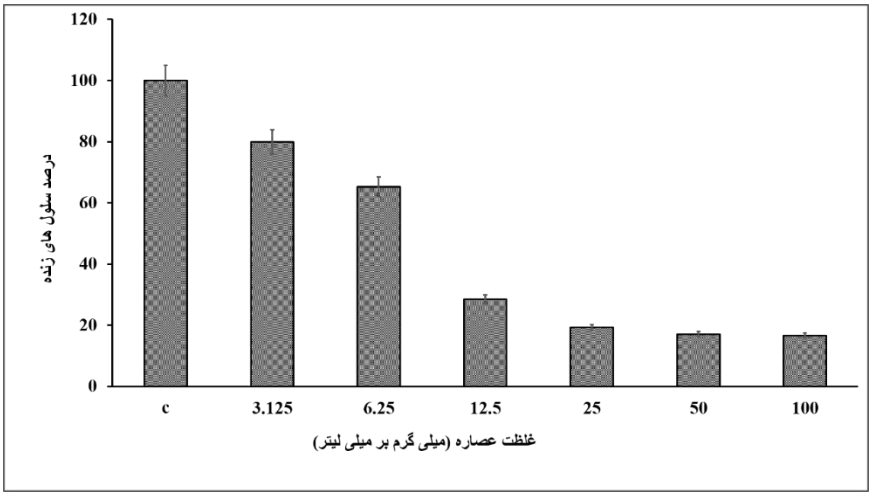
شکل۵: تصاویر مربوط به قطر هاله‌عدم رشد عصارهٔ هیدروالکلی اکالیپتوس بر باکتری *Salmonella typhi*

حداقل غلظت مهاری (MIC) عصارهٔ هیدروالکلی اکالیپتوس نسبت به باکتری *اشریشیاکلی* در لولهٔ شمارهٔ ٤ با رقّت ١:١٦ و غلظت ٠/٦٢٥ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. این مقدار نسبت به باکتری *استافیلوکوکوس اروئوس* هم به همین صورت بود. مقدار MIC باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در لولهٔ شمارهٔ ۳ با رقّت ۱:۸ و غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری *سالمونلا تیفی موریوم*، با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره در لوله شماره ۲ با رقت ١:٤ و غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر مشاهده شد. حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصارهٔ هیدروالکلی اکالیپتوس نسبت به باکتری *اشریشیاکلی*، ظرف شمارهٔ ۳ با رقّت ۱:۸ و غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر است که این مقدار نسبت به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز مشابه بود، اما نسبت به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* پلیت شمارهٔ ۲ با رقّت ١:٤ و غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و مقدار آن بر روی *سالمونلا تیفی موریوم* ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس

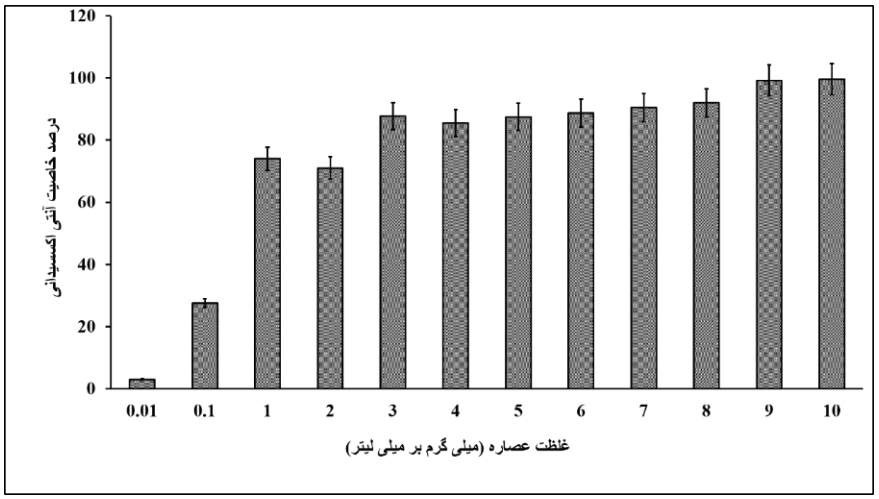
باکتری مورد بررسی	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
اشرشیا کلی	۰/٦٢٥	۱/۲۵
استافیلوکوکوس اورئوس	۰/٦٢٥	۱/۲۵
لیستریا مونوسیتوژنز	۱/۲۵	۲/۵
سالمونلا تیفی موریوم (با غلظت ۲۰ mg/ml)	۵	۱۰

نتایج حاصل از بررسی اثرات ضدسرطانی: همانطور که در شکل (٦) دیده می‌شود، با افزایش غلظت عصاره، درصد سلول های زنده نسبت به کنترل که فاقد عصاره اکالیپتوس است، کاهش می‌یابد و این نشان دهنده اثرات ضدسرطانی ترکیبات موجود در عصاره اکالیپتوس بر رده سلولی سرطان روده می‌باشد. میزان IC_{50} برای عصاره اکالیپتوس ۹/٤٥ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.



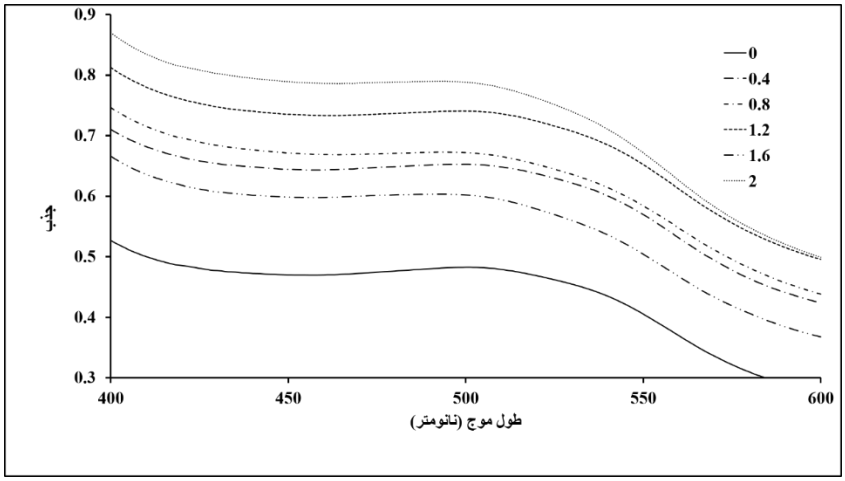
شکل ٦: اثرات ضدسرطانی عصاره برگ *Eucalyptus globulus* L. با آزمون MTT

نتایج حاصل از بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی: عصاره برگ گیاه اکالیپتوس دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است و همان‌طور که در شکل مشخص است، با افزایش غلظت عصاره، خاصیت آنتی‌اکسیدانی هم افزایش می‌یابد. بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (شکل ۷).



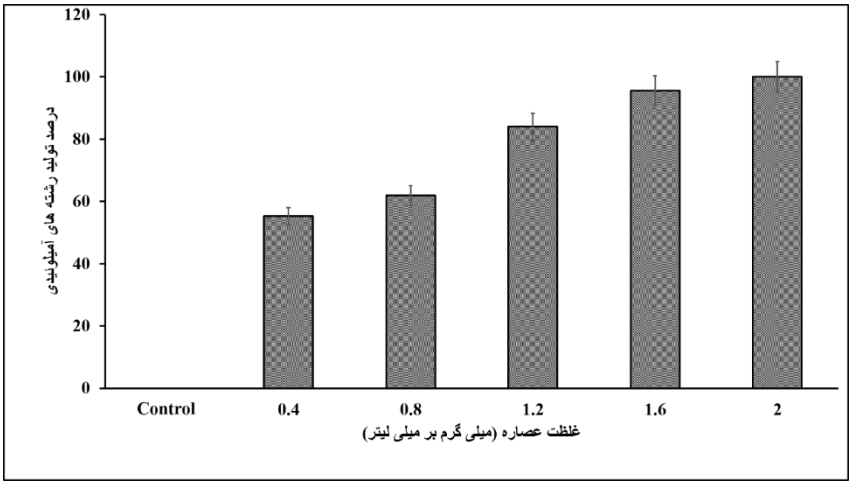
شکل۷: درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ *Eucalyptus globulus* L.

نتایج حاصل از بررسی اثرات مهاری بر تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی: بررسی اثر مهاری عصارهٔ هیدروالکلی اکالیپتوس بر تولید نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان یک پروتئین مدل که در غلظت‌های ۰/٤، ۰/۸، ۱/۲، ۱/٦ و ۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر از عصاره با روش طیف‌سنجی مرئی انجام شد، نشان داد که عصاره اکالیپتوس در غلظت‌های پائین دارای اثرات مهاری مناسبی بر تولید رشته‌های آمیلوئیدی است، به‌طوریکه بیش‌ترین اثر مهاری عصاره مربوط به غلظت ۰/٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (شکل ۸).



شکل ۸: تغییرات میزان جذب در برابر طول موج در غلظت‌های مختلف از عصاره برگ *Eucalyptus globulus* L.

با توجه به شکل (۸)، میزان جذب در طول موج ماکزیمم (۵۲۰ نانومتر) بیانگر میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی می باشد. بر این اساس، میزان رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت‌های مختلف از عصارهٔ اکالیپتوس نسبت به نمونه کنترل (فاقد عصاره)، محاسبه شد که در شکل (۹) نشان داده شده است.



شکل۹: درصد تولید رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت‌های مختلف از عصاره برگ *Eucalyptus globulus* L.

بحث

در مطالعه حاضر، ترکیبات شیمیایی عصاره هیدروالکلی *Eucalyptus globulus* L. مورد ارزیابی قرار گرفت و اثرات ضدمیکروبی آن بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* بررسی گردید. همچنین، اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهاری آن بر تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی و رشد سلول‌های سرطانی بررسی شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مادهٔ اکالیپتول با میزان ٤١/٢٨ درصد فراوان‌ترین مادهٔ موجود در عصارهٔ می‌باشد (جدول ۱). پالما و همکاران با تحقیق بر روی عصاره هیدروالکلی برگ گیاه اکالیپتوس به نتایجی مشابه دست یافتند. طبق نتایج به‌دست آمده از این تحقیق ماده اکالیپتول به

میزان ٦٧/٢٩ درصد بیش‌ترین ماده موثره موجود در عصاره گیاه می‌باشد (Palma et al., 2021b). سلیرو[1] و همکاران نیز در سال ۲۰۱۹، طی انجام تحقیقاتی بر روی برگ گیاه اکالیپتوس، پی بردند که بیش‌ترین ماده موثره در دو عصاره متانولی و کلروفرمی ماده اکالیپتول به میزان به‌ترتیب ٣١/٨٦ درصد و ٤٥/٩٤ درصد و در عصاره هگزانی ماده پالمیتیک اسید به میزان ٣١/٠٦ درصد می‌باشد (Celeiro et al., 2019). اکالیپول یک ترکیب آنتی باکتریال است (Bahadirli, 2022; Fayyazbakhsh et al., 2022) و در شش‌ها و سینوس‌ها خاصیت خلط آوری دارد. با استفاده از این ترکیب در بیماران مبتلا به آسم می‌توان کارکرد شش‌ها را بهبود بخشید و یا به روش بخور دادن موضعی از اثرات آن بهره برد (Al-Harrasi et al., 2022). اوکالیپتول یک داروی تاثیر گذار برای درمان سینوزیت است و در ترشحات مخاطی شدید یک کنترل‌کننده مفید راه‌های هوایی است (Kazak et al., 2022). اکالیپتول یک آنتی اکسیدان قوی است (Maral et al., 2023) و اثرات ضدسرطانی آن به اثبات رسیده است (Li et al., 2022). همچنین اثرات مهاری آن بر تولید رشته های بتا آمیلوئید موثر در ایجاد بیماری آلزایمر مشخص شده است (Kim et al., 2020a). آمر[2] و همکاران ۱۲۸ جزء از کل اسانس به دست آمده از اکالیپتوس را گزارش کردند. در بین این ترکیبات، اکالیپتول فراوان ترین جزء یافت شده بود و پس از آن آلفا پینن، پارا-سیمن و گلوبولول قرار گرفتند (Ameur et al., 2021).

در این پژوهش قطر هالهٔ عدم رشد به روش چاهک روی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* ۲۸ میلی‌متر است که بیش‌ترین هاله عدم رشد را ایجاد نمود (جدول ۲). همچنین، حداقل غلظت مهاری عصارهٔ هیدروالکلی اکالیپتوس نسبت به باکتری *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، در غلظت ٠/٦٢٥ و حداقل غلظت کشندگی آن نسبت به این دو باکتری، در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. حداقل غلظت مهاری این عصاره نسبت به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در غلظت ۱/۲۵ و حداقل غلظت کشندگی آن در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. حداقل غلظت مهاری عصاره نسبت به باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* در غلظت ۵ و حداقل غلظت کشندگی آن در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دیده شد (جدول ۳). آمر و همکاران در سال ۲۰۲۱ در تحقیق روی اثرات ضدمیکروبی هشت گونه از گیاه اکالیپتوس، قطر هاله عدم رشد برای باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را به ترتیب ۱۲/۳ و ۹/۳ میلی‌متر گزارش کردند. همچنین مقادیر MIC و MBC را برای *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آوردند (Ameur et al., 2021). سبئی[3] و همکاران در تحقیقی که روی خاصیت ضد لیستریایی اسانس برگ گیاه اکالیپتوس انجام دادند، مقدار هاله عدم رشد باکتری لیستریا در اسانس اکالیپتوس را ۲۸ را میلی متر گزارش دادند (Sebei et al., 2015). در تحقیق الانسری[4] و همکاران نیز مقدار MIC به ترتیب ۰/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای باکتری *باسیلوس سرئوس* و ۰/۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شد (Elansary et al., 2017).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیش‌ترین اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره اکالیپتوس، غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است (شکل ۷). داکاد و همکاران در مقاله مروری خود، به اثرات آنتی اکسیدانی قوی عصاره

1. Celeiro
2. Ameur
3. Sebei
4. Elansary

اکالیپتوس اشاره کرده‌اند(Dhakad et al., 2018). ژو و همکاران نیز در سال ۲۰۲۱، پتانسیل آنتی اکسیدانی، ضدمیکروبی و فیتوتوکسیک گیاه اکالیپتوس را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که ترکیبات این گیاه می‌تواند رادیکال‌های آزاد ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل را از بین ببرد (Zhou et al., 2021).

براساس نتایج این تحقیق، ترکیبات موجود در عصارهٔ اکالیپتوس منجر به کاهش یا مهار تولید رشته‌های آمیلوئیدی شد و بهترین اثرات مهاری در غلظت ۰/٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره به‌دست آمد (شکل ۸ و ۹). بنابراین می‌توان گیاه اکالیپتوس را به‌عنوان یک گیاه دارویی موثر در کاهش عوارض بیماری آلزایمر، از طریق مهار تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی، معرفی نمود. در مطالعه درون تنی که توسط کیم و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام شد، مشخص شد که اکالیپتول اتصالات محکم و عملکرد سد شبکیه را در سلول‌های اپیتلیال رنگدانه شبکیه انسانی در معرض گلوکز/آمیلوئید- β (Aβ) و در چشم‌های موش بهبود می‌بخشد. آنها نشان دادند که اکالیپتول القای Aβ را در سلول های RPE مملو از گلوکز و چشم‌های موش دیابتی مهار کرد (Kim et al., 2020b).

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، عصارهٔ اکالیپتوس با میزان بالای ترکیب اکالیپتول که در خود دارد، می‌تواند به عنوان یک مکمل گیاهی با خواص ضدالتهابی و ضدمیکروبی مورد توجه قرار گیرد. همچنین با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی اکالیپتول، عصاره این گیاه می تواند به‌عنوان یک عامل گیاهی موثر در کاهش عوارض جانبی بیماران مبتلا به سرطان مورد توجه قرار گیرد. اثرات مهاری این عصاره بر تولید نانورشته های آمیلوئیدی نیز، اثر بخشی آن را در کاهش عوارض ناشی از بیماری آلزایمر نمایان می-کند و می‌توان آن را، پس از انجام آزمایش های درون تنی تکمیلی، به عنوان یک جایگزین بالقوه برای داروهای ضد آلزایمر شیمیایی معرفی نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و سپاس خود را نسبت به تمام دوستان و همکارانی که در اجرای این پژوهش یاری نمودند، اعلام می‌دارند.

References

Abbasi, N., Khalighi, Z., Eftekhari, Z., Bahmani, M., 2020. Extraction and phytoanalysis of chemical compounds of *Eucalyptus globulus* leaf native to Dehloran, Ilam province, Iran by HS-SPME and GC-MS. Advances in Animal and Veterinary Sciences, 8: 647-652.

Abiri, R., Atabaki, N., Sanusi, R., Malik, S., Abiri, R., Safa, P., Shukor, N.A.A., Abdul-Hamid, H., 2021. New insights into the biological properties of eucalyptus-derived essential oil: A promising green anti-cancer drug. Food Reviews International, 1-36.

Al-Harrasi, A., Bhatia, S., Behl, T., Kaushik, D., 2022. Essential oils in the treatment of respiratory tract infections, role of essential oils in the management of covid-19. CRC Press, pp. 319-328.

Ameur, E., Sarra, M., Yosra, D., Mariem, K., Nabil, A., Lynen, F., Larbi, K.M., 2021. Chemical composition of essential oils of eight tunisian *Eucalyptus* species and their antibacterial activity against strains responsible for otitis. BMC Complement Med Ther 21, 209.

Arasteh, A., Habibi-Rezaei, M., Ebrahim-Habibi, A., Moosavi-Movahedi, A.A., 2012. Response surface methodology for optimizing the bovine serum albumin fibrillation. The protein journal, 31: 457-465.

Bahadirli, N.P., 2022. Comparison of chemical composition and antimicrobial activity of *Salvia fruticosa* mill. and *S. Aramiensis* rech. fill.(*Lamiaceae*). Journal of Essential Oil Bearing Plants, 25: 716-727.

Bhuyan, D.J., Sakoff, J., Bond, D.R., Predebon, M., Vuong, Q.V., Chalmers, A.C., van Altena, I.A., Bowyer, M.C., Scarlett, C.J., 2017. In vitro anticancer properties of selected *Eucalyptus* species. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 53: 604-615.

Celeiro, M., Lamas, J.P., Arcas, R., Lores, M., 2019. Antioxidants profiling of by-products from *Eucalyptus greenboards* manufacture. Antioxidants (Basel, Switzerland), 8.

Dhakad, A.K., Pandey, V.V., Beg, S., Rawat, J.M., Singh, A., 2018. Biological, medicinal and toxicological significance of eucalyptus leaf essential oil: a review. J Sci Food Agric, 98: 833-848.

Diloksumpun, S., Wongkattiya, N., Buaban, K., Saleepochn, T., Suttiarporn, P., Luangkamin, S., 2022. Variation in the antibacterial and antioxidant activities of essential oils of five new *Eucalyptus urophylla* st blake clones in thailand. Molecules, 27: 680.

Elansary, H.O., Salem, M.Z.M., Ashmawy, N.A., Yessoufou, K., El-Settawy, A.A.A., 2017. In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of *Eucalyptus* spp. leaf extracts related to phenolic composition. Nat Prod Res, 3: 2927-2930.

Fayyazbakhsh, A., Koutný, M., Kalendová ,A., Šašinková, D., Julinová, M., Kadlečková, M., 2022. Selected simple natural antimicrobial terpenoids as additives to control biodegradation of polyhydroxy butyrate. International Journal of Molecular Sciences, 23: 14079.

Kazak, F., 2022. A bioactive compound: eucalyptol. functional foods and nutraceuticals: bioactive compounds. Lyon, France: Livre de Lyon, 125-138.

Kim, D.Y., Kang, M.-K., Lee, E.-J., Kim, Y.-H., Oh, H., Kim, S.-I., Oh, S.Y., Na, W., Kang, Y.-H., 2020a. Eucalyptol inhibits amyloid-β-induced barrier dysfunction in glucose-exposed retinal pigment epithelial cells and diabetic eyes. Antioxidants, 9: 1000.

Kim, D.Y., Kang, M.K., Lee, E.J., Kim, Y.H., Oh, H., Kim, S.I., Oh, S.Y., Na, W., Kang, Y.H., 2020b. Eucalyptol inhibits amyloid-β-induced barrier dysfunction in glucose-exposed retinal pigment epithelial cells and diabetic eyes. Antioxidants (Basel, Switzerland), 9.

Li, D., Ilnytskyy, Y., Ghasemi Gojani, E., Kovalchuk, O., Kovalchuk, I., 2022. Analysis of anti-cancer and anti-inflammatory properties of 25 high-thc cannabis extracts. Molecules, 27: 6057.

Maral, H., 2023. Chemical and antioxidant diversity of essential oils of some *Salvia* species from turkey. Biochemical Systematics and Ecology, 106: 104575.

Martínez, V.R., Ferrer, E.G., Williams, P.A., 2022. Candesartan, losartan and valsartan Zn (II) complexes interactions with bovine serum albumin. Future Medicinal Chemistry, 14: 9-16.

Mondal, M., Quispe, C., Sarkar, C., Bepari, T.C., Alam, M.J., Saha, S., Ray, P., Rahim, M.A., Islam, M.T., Setzer, W.N., 2021. Analgesic and anti-inflammatory potential of essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaf: in vivo and in silico studies. Natural Product Communications 16, 1934578.

Palma, A., Díaz, M.J., Ruiz-Montoya, M., Morales, E., Giráldez, I., 2021a. Ultrasound extraction optimization for bioactive molecules from *Eucalyptus globulus* leaves through antioxidant activity. Ultrasonics sonochemistry, 76: 105654.

Palma, A., Díaz, M.J., Ruiz-Montoya, M., Morales, E., Giráldez, I., 2021b. Ultrasound extraction optimization for bioactive molecules from *Eucalyptus globulus* leaves through antioxidant activity. Ultrason Sonochem, 76: 105654.

Sadatrasul, M.S., Fiezi, N., Ghasemian, N., Shenagari, M., Esmaeili, S., Jazaeri, E.O., Abdoli, A., Jamali ,A., 2017. Oil-in-water emulsion formulated with *Eucalyptus* leaves extract inhibit influenza virus binding and replication in vitro. AIMS microbiology, 3: 899.

Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C.E., Cummings, J., van der Flier, W.M., 2021. Alzheimer's disease. The Lancet, 397: 1577-1590.

Sebei, K., Sakouhi, F., Herchi, W., Khouja, M.L., Boukhchina, S., 2015. Chemical composition and antibacterial activities of seven *Eucalyptus* species essential oils leaves. Biological research 48, 7.

Song, X., Li, R., Zhang, Q., He, S., Wang, Y., 2022. Antibacterial effect and possible mechanism of salicylic acid microcapsules against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 19: 12761.

Yılmaz, F., 2021. Investigating the usage of eucalyptus leaves in antibacterial finishing of textiles against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The Journal of The Textile Institute, 112: 341-345.

Zein, R., Alghoraibi, I., Soukkarieh, C., Salman, A., Alahmad, A., 2020. In-vitro anticancer activity against Caco-2 cell line of colloidal nano silver synthesized using aqueous extract of *Eucalyptus camaldulensis* leaves. Heliyon 6, e04594.

Zhou, L., Li, J., Kong, Q., Luo, S., Wang, J., Feng, S., Yuan, M., Chen, T., Yuan, S., Ding, C., 2021. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial, and phytotoxic potential of *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* leaves essential oils. Molecules, 26.