فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال دوازدهم، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۹ ص. ۴۶-۳۷

مقاله پژوهشی

سنتز، بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمایی و بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره گیاه درمنه (*آرتمیزیا دیفوزا*) محصور شده در نانوژل آلژینات

فرزانه شمسی[۱]، علی اصغر باقری[۲*]، امیر میرزایی[۲]

[۱] کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

[۲] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

[*] Email: Bagheri-ali@riau.ac.ir

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۹

چکیده

یکی از تکنولوژی‌های نوین در فناوری نانو، استفاده از نانوژل‌ها جهت رهایش بهتر دارو و افزایش اثرات ضدمیکروبی آن می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره گیاه درمنه [آرتمیزیا دیفوزا] محصور شده در نانوژل آلژینات علیه پاتوژن‌های میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس، اشریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. در این مطالعه ابتدا عصاره گیاه درمنه با روش ماسراسیون با استفاده از حلال آبی گرفته شد. به دنبال آن عصاره تهیه شده در نانوژل آلژینات محصور شده و نانوژل تهیه شده توسط روش‌های میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و DLS و FTIR مورد تایید قرار گرفت. هم چنین رهایش عصاره در زمان، دما و pH های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت اثرات ضد میکروبی نانوژل حاوی عصاره علیه پاتوژن‌های میکروبی از قبیل استافیلوکوکوس اورِئوس، انتروکوکوک فکالیس، اشریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا توسط روش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوژل سنتز شده دارای ساختار کروی و دارای میانگین اندازه ۸۵ نانومتر بود. هم چنین نتایج FTIR نشان دهنده محصور شدن عصاره داخل ساختار نانوژل بود. میزان رهایش عصاره از الگوی مناسبی برخوردار بود. نتایج ضد میکروبی نشان داد که نانوژل حاوی عصاره دارای MIC کمتری نسبت به عصاره بود. بر اساس یافته‌های این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که نانوژل آلژینات حاوی عصاره دارای اثرات ضد میکروبی معنادار بوده و در آینده با تحقیقات بیشتر می‌تواند در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار گیرد

کلیدواژه‌ها: آرتمیزیا دیفوزا، نانوژل آلژینات، اثرات ضد میکروبی .

مقدمه

امروزه پدیده مقاومت آنتی بیوتیکی و ظهور باکتری‌هایی با مقاومت دارویی یک مسئله نگران کننده و اساسی بهداشت جهانی برای پزشکان و صنعت داروسازی است که به‌عنوان یکی از عوامل اصلی شکست درمان بیماری‌های عفونی شده است [۲۲و۱۳]. یکی از چالش‌ها و نگرانی‌های عصرحاضر در زمینه بهداشت جهانی شیوع مقاومت‌های ضدمیکروبی است. در این پدیده که در نتیجه سومصرف آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد می‌شود، میکروارگانیسم‌ها دچار موتاسیون شده و یا ژن مقاومت را کسب می کنند، از این رو بسیاری از درمان های رایج کارآمد نیستند، در نتیجه نیاز به بافتن راهکارهای جدید درمانی می‌باشد [۱۶]. امروزه گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و درمان‌های گیاهی و به طور کلی فرآورده‌های طبیعی رو به افزایش بوده به‌طوری که داروهای گیاهی سهم بزرگی از فراورده‌های دارویی تجاری ساخته شده را به خود اختصاص داده‌اند [۲۶].

بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد که بیش از ۶۰ درصد درمان بیماری‌های میکروبی به وسیله گیاهان انجام می‌شود [۲۵و۱۲]. یکی از گیاهان دارویی، جنس آرتمیزیا می‌باشد که در ایران به درمنه معروف است. این جنس حاوی گونه های مختلف است و تا کنون بیش از ۵۰۰ گونه از این جنس شناسایی شده است. گیاهان جنس درمنه به عنوان يكي از عناصر اصلي و غالب اجتماعات گياهي در مناطق خشك و نيمه خشك كشور محسوب مي‌شود كه ارتفاع آن به ۳۰ تا ۵۰ سانتي‌متر مي‌رسد و به شكل كپه‌اي مي رويد [۱۶و۳]. این جنس، از خانوادهٔ Compositae هستند. این جنس در ایران ۳۴ گونه گیاهی علفی یکساله و چند ساله دارد که در سراسر ایران پراکنده شده‌اند. گونه‌های انحصاری آن در ایران عبارتند از *A. Sieberi*و*A.Kermanensis* که از از گیاهان مناطق بیابانی و نیمه‌بیابانی ایران است. گیاهان جنس درمنه مقوي، اشتها آور، بادشكن، رفع كننده دل پيچه و موثر در درمان زخم‌هاي عفوني است و از آن براي پانسمان ورم، سرمازدگي و تسكين دمل استفاده مي‌شود [۱و۷].

امروزه مطالعات انجام شده در این رابطه نشان می‌دهد که فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی با توجه به ویژگی هایی مانند فراریت و ناپایداربودن، حلالیت کم در آب و قابلیت اکسیداسیون تحت تاثیر قرار می‌گیرد و لازم است تکنیک‌های جدید براي افزايش فعاليت ضدميكروبي از قبیل استفاده از علوم نانو در فرموله کردن و دستکاری عصاره‌ها براي افزايش كيفيت اثر و طولانی شدن فعاليت-های بیولوژیکی است [۲۲]. كپسوله كردن فرايندي است كه در آن اجزاي جامد، مايع و گاز درون كپسول‌هاي كوچك يا نانوژل‌ها گنجانده ميشوند و ميتوان محتوياتشان را با سرعت كنترل شده رها كنند. نانو ذرات حمل کننده دارو از موادي همچون آلژينات، كيتوسان، آلبومين، پلي‌لاكتيك كوگليكوليک اسيد و پلي‌اتيلن گاليكول ساخته مي‌شوند [۲۱]. بطور کلی نانوژل‌ها ذرات نانومتری هستند که به شکل فیزیکی و شیمیایی شبکه‌ای شده و به خاطر ویژگی‌های قابل توجه آنها، ابزارهای مناسبی برای دارو رسانی به شمار می‌روند. نانوژل‌ها مانند نانوذرات، قابلیت تزریق به خون را دارند. آن‌ها این قابلیت را دارند که به شرایط محیطی مانند قدرت یونی،pH و دما پاسخ دهند. پایداری داروی بارگذاری شده در نانو حامل‌ها مسئله مهمی در دارو رسانی هدفمند است. مولکول‌های دارو به‌طور تصادفی به بافت سالم نشت می‌کنند که دراین حالت نانو حامل بدون دارو به بافت هدف می‌رسد. برای حل این مشکل از نانوحامل‌های با اتصالات عرضی یعنی نانوژل‌ها استفاده می‌شود [۲۶و۱۵].

یکی از نانوژل‌ها، واحدهای تکراری آلژینات می‌باشد. نانو ژل آلژینات یک پلیمر مرکب از واحدهای تکراری دی ساکاریدی 1-4-D-glucuronic acid و 1-3-N-acetyl-D-glucosamine است که یکی از اجزای اصلی ماتریکس درون سلولی و برون سلولی است [۱۷]. به دلیل خصوصیات سازگاری با محیط زیست، زیست تجزیه پذیر بودن، غیرایمونوژن بودن و عدم حساسیت برای کاربردهای زیست پزشکی به عنوان حامل دارو استفاده می‌شود [۱۴]. مطالعات مختلفی در زمینه انکپسوله کردن عصاره‌های مختلف درون نانوژل انجام شده است. در سال ۲۰۱۴ مینا

بیکی و همکاران میزان تاثیر نانوژل دارای عصاره نعناع فلفلی بر عدم رشد آسپرژیلوس فلاووس را بررسی کردند که در این پژوهش عصاره نعناع فلفلی با دستگاه اولتراسونیکیت درون نانوژل کایتوسان – سینامیک اسید انکپسوله شد و حداقل غلظت بازدارندگی عصاره در ۲۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد و مشخص گردید عصاره انکپسوله شده در ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس جلوگیری می‌کند. [۱۰]. در این مطالعه ما برای اولین بار اثرات ضدمیکروبی نانوژل آلژینات انکپسوله شده با عصاره گیاه آرتمیزیا دیفوزا را علیه پاتوژن‌های میکروبی مورد مطالعه قرار دادیم.

مواد و روش کار

۱- عصاره‌گیری و ساخت نانوژل آلژینات

برای ساخت عصاره گیاهي (روش ماسراسیون) ابتدا مقدار ۶۰ گرم پودر گیاه آرتمیزیا دیفوزا از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی تهیه شد. سپس مقدار ۵۰ گرم پودر گیاه از ماده آسیاب شده به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر الکل ۸۰ درجه اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاه خیسانده می شود. مایع رویی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ و مجدداً مایع رویی جداسازی و در دستگاه تقطیر در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا الکل اضافی جدا شود. عصاره باقی مانده با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به عنوان محلول ذخیره تهیه و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه در ظروف تیره نگهداری شد. در ابتدا آلژینات را در آب مقطر حل کرده و با ای دی سی (EDC) و ان اچ اس (NHS) گروه‌های کربوکسیل آن را فعال می‌کنیم. سپس پروپیل آمین را به آن افزوده و به مدت ۲ ساعت انکوبه می کنیم. سپس با اتانول و آب مقطر ژل حاصل را شستشو داده و به مدت ۱۵ دقیقه سونیکه می‌کنیم و با استفاده از اولتراسونیک عصاره را داخل نانوژل لود می‌کنیم. ریخت‌شناسی و اندازه نانوحامل آلژینات سنتز شده، به روش زیستی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. نمودار سایز نانو ذرات توسط طیف نگاری (DLS) در شرکت دی پترونیک انجام گردید.

۲- بررسی الگوی رهایش عصاره *آرتمیزیا دیفوزا*

رهایش عصاره از نانوژل آلژینات بر اساس روش دیالیز انجام شد. ۲۵ میلی لیتر ز محلول نانوژل آلژینات بارگذاری شده با عصاره را داخل کیسه دیالیز تزریق و تاثیرات زمان، دما و pH بر رهایش دارو بررسی شد. در تمام موارد بافر دیالیز بوسیله مگنتیک استایرر با سرعت پایین و مشابه سایرنمونه ها همزده زده شد. مکانیسم ارزیابی رهایش اگزالی‌پلاتین بدین گونه است که دارو در شرایط مختلف فیزیکی از نانوژل خارج شده و از کیسه دیالیز عبور کرده و وارد بافر دیالیز می شود. توسط محاسبه تفاضل محتوای تام دارو درون کیسه دیالیز و محتوای تام دارو در هنگام لود دارو، میزان درصد عصاره رها شده محاسبه شد. بررسی رهایش دارو از طریق سه متغیر زمان، pHو دما انجام شد.

بررسی الگوی رهایش عصاره آرتمیزیا دیفوزا از نانوژل آلژینات در زمان‌های مختلف :برای بررسی الگوی رهایش عصاره در زمان‌های مختلف، کیسه دیالیز داخل بافر فسفات ۱۵۰mM و PH=7 قرار داده شد. به مدت هفت روز از محلول نانوژل آلژینات بارگذاری شده با عصاره داخل کیسه دیالیز نمونه برداری کرده و در یخچال نگهداری شد.

بررسی الگوی رهایش عصاره از نانوژل آلژینات در دمای مختلف: برای بررسی الگوی رهایش عصاره در دمای مختلف به تعداد دماها از کیسه دیالیز استفاده شد و داخل کیسه‌های دیالیز محلول نانوژل آلژینات بارگذاری شده با عصاره تزریق شد و داخل بافر فسفاتmM ۱۵۰ میلی‌مولار با PH=7 قرار داده شد و هر کدام از نمونه‌ها را در دمای مورد نظر نگهداری نموده و پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای مورد نظر، عصاره باقیمانده در محلول نانوژل آلژینات بارگذاری شده با عصاره مورد ارزیابی قرار گرفت.

۳- بررسی اثرات ضدمیکروبی نانوژل آلژینات حاوی عصاره

در این مطالعه فعالیت ضدمیکروبی نانوحامل حاوی عصاره با استفاده از روش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) بر روی باکتری‌های پاتوژن استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923- انتروکوکوس فکالیس ATCC 29212 - اشرشیا کلی ATCC 25922

و سودوموناس آئروژینوزا ATCC 15442 انجام گرفت. در مورد میکروارگانیسم‌های استاندارد در محیط کشت‌های اختصاصی، کشت شبانه انجام شد و سپس چند کلنی از هر یک وارد محیط‌کشت Mueller Hinton broth (MHB) شد و در دمای ۳۷ به صورت شبانه کشت داده شد. سوسپانسیونی معادل استاندارد 0.5 McFarland از هریک از سویه‌های باکتریایی تهیه و سپس با رقیق‌سازی در محیط‌کشت مایع تا میزان 1×10^6 CFU/ml بدست آمد.

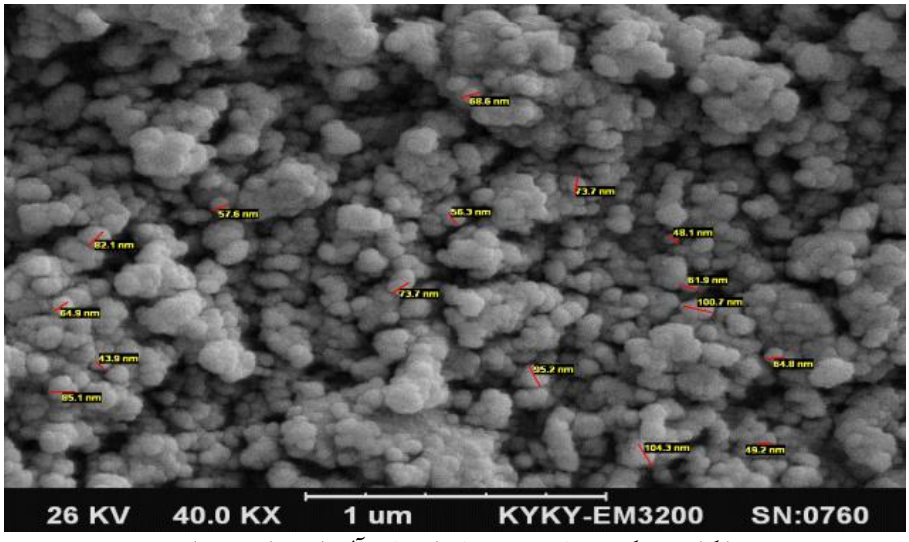
اثرات ضد باکتریایی نمونه‌های عصاره و نانوحامل با بررسی MIC به صورت broth Microdilution در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای انجام شد. فرمولاسیون‌های دارویی به صورت سریالی با محیط‌کشت Muller Hinton Broth رقیق‌سازی شد و غلظت‌های ۱۰۰-۶/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و از هر غلظت با تکرارهای سه تایی صد میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شد. از سوسپانسیون باکتریایی نیز ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها وارد شد. کنترل مثبت حاوی سوسپاسیون باکتریایی و فاقد دارو و کنترل منفی شامل بالاترین غلظت دارویی فاقد میکروارگانیسم و محیط‌کشت MHB در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد MIC به عنوان کمترین غلظتی از ماده که قادر به مهار رشد می‌شود در نظر گرفته می‌شود. تعیین غلظت MBC به این صورت انجام شد که ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک MIC و غلظت بعد از آن در محیط Muller Hinton agar کشت داده شده و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.MBC کمترین غلظتی از ماده است که در آن هیچ گونه رشدی وجود ندارد(۱۵).

۴- آنالیز آماری

محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام گردید و اطلاعات به صورت (mean±standard SD(deviation نمایش داده شده‌اند و P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل و نتایج

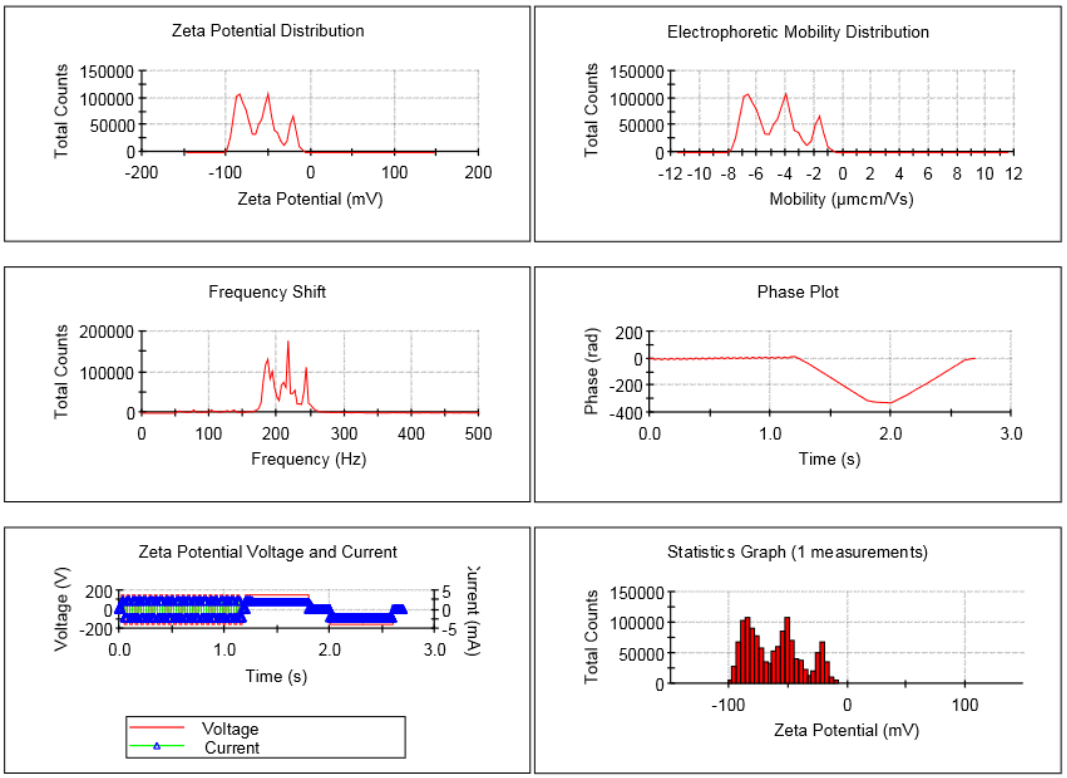
شناسایی نانوژل آلژینات بارگذاری شده با عصاره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM) عکس‌برداری از نانوژل آلژینات بارگذاری شده با عصاره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی رویشی توسط دستگاه KYKY-EM3200 انجام گردید. با توجه به تصویر SEM مورفولوژی مناسب ویکنواخت نانو ذرات سنتز شده نشان داده شد. با توجه به نتایج حاصل از عکسبرداری میکروسکوپ SEM اندازه نانوذرات سنتز شده در محدوده بین ۴۴ nm تا ۱۰۵ nm تخمین زده شد (شکل ۱).



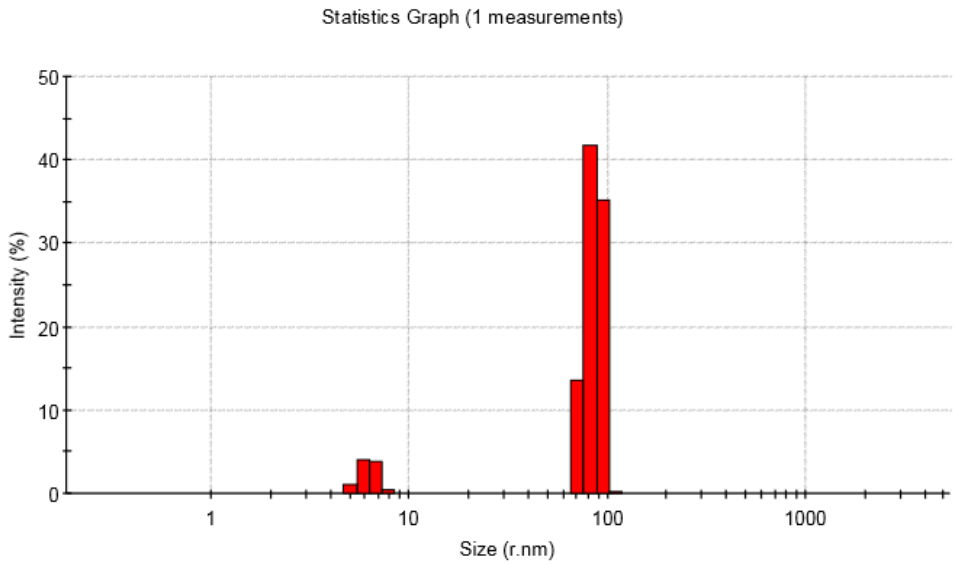
شکل۲ - عکس برداری SEM از نانوذرات آلژینات حاوی عصاره

۱ - آنالیز پتانسیل زتا و پراکنش دینامیکی نور DLS

در این مرحله پس از تهیه نانوژل آلژینات بارگذاری شده با عصاره، برای بررسی پایداری نانوژل تهیه شده از نمونه‌های مورد نظر DLS گرفته شد. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است نانوژل سنتز شده دارای بار سطحی منفی بوده است. پتانسیل زتای نانوژل آلژینات باگذاری شده با عصار برابر ۶۰/۶- بوده است. همچنین همانطور که در نمودار نشان داده شده، نتایج آنالیز DLS، اندازه قطر نانوژل آلژینات را حدودا ۸۵ nm نشان داده است (شکل ۴).



شکل ۳- منحنی پتانسیل زتا نانوژل آلژینات بارگذاری شده با عصاره.



شکل ۴- نمودار DLS نانوژل آلژینات بارگذاری شده با عصاره.

۲- شناسایی نانوژل آلژینات با استفاده از طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR)

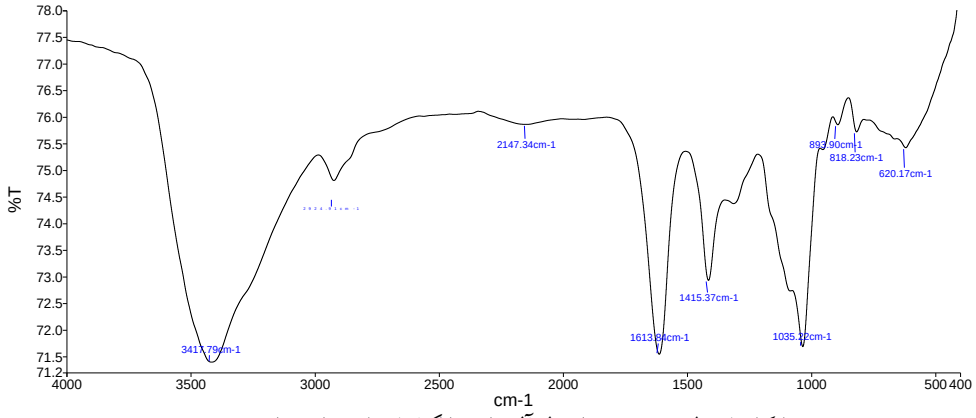
در طیف حاصل از نانوژل آلژینات ، نوار جذبی واقع در ناحیه‌ی ۳۴۱۷ cm-1 مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های هیدروکسیل در ساختار پلیمر مشاهده می‌شود. نوارهای جذبی قابل مشاهده در ناحیه‌ی ۱۴۱۵ cm-1 و cm-1 ۱۶۱۳ به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های کربوکسیل coo- متقارن و نامتقارن در ساختار پلیمر آلژینات می‌باشد. همچنین پیک در ناحیه‌ی ۱۰۳۵cm-1 حضور پیوند o- گلیکوزیدی بین مونومرهای d-B- مانورونیک و a-۱-گلورونیک‌اسید در ساختار پلیمر خطی آلژینات را تایید می‌کند (شکل ۵).

۳- رهایش عصاره در زمان، دما و pH های مختلف

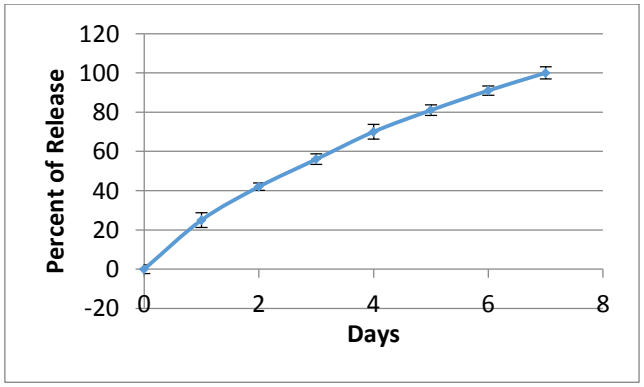
الگوی رهایش دارو با گذشت زمان با شیب با دامنه تند افزایش یافت. به طوری که بیشترین میزان رهایش دارو در روز هفتم بوده است به میزان ۱۰۰% رسید. با گذشت ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب میزان حدود ۲۵% ، ۴۲% و ۵۵% از رهایش دارو انجام شده است (شکل ۵).

رهایش عصاره در (pH = ۷) در دماهای مختلف بررسی شد. نتایج حاصل از روی نمودار بدست آمده نشان داد که دردماهای اولیه یعنی حدود ۱۰°C، ۲۰% از دارو در این pH آزاد شده است. در دمای ۲۵°C، ۵۰% از عصاره آزاد شده است و پس از آن، نمودار رهایش عصاره صعودی بوده و در دمای حدود ۳۷°C که دمای بدن می‌باشد، میزان رهایش عصاره حدود ۸۰% نشان داده شده و در نهایت در دمای حدود ۴۵°C، بیشترین میزان رهایش این عصاره یعنی حدود ۸۵ % صورت گرفت. سپس نمودار به ناحیه پلاتو رسید (شکل ۶).

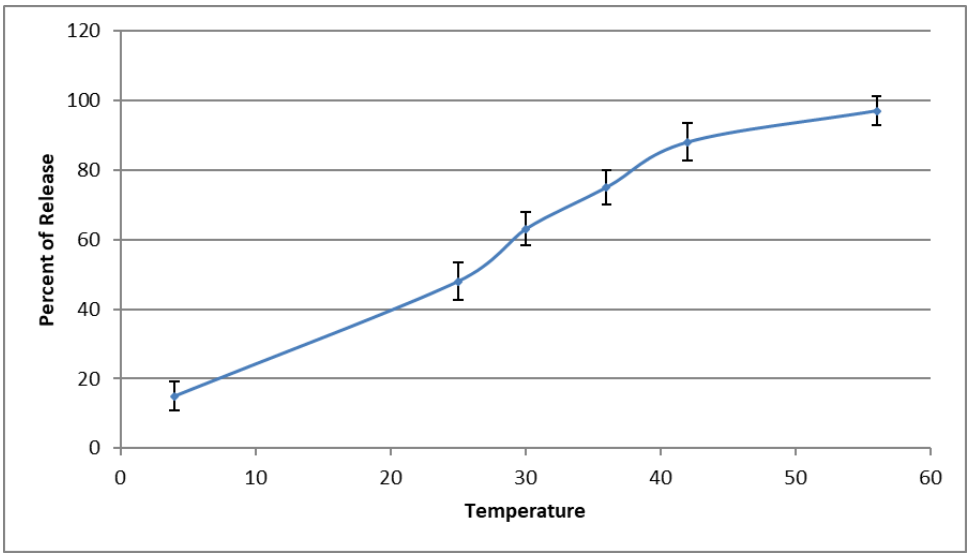
بررسی الگوی رهایش عصاره در pH های مختلف بیشترین میزان رهایش عصاره را در pH= ۱۰ به میزان 90% نشان می‌دهد. همچنین میزان رهایش دارو در pH= ۷ حدود ۷۵% بوده است (شکل ۷).



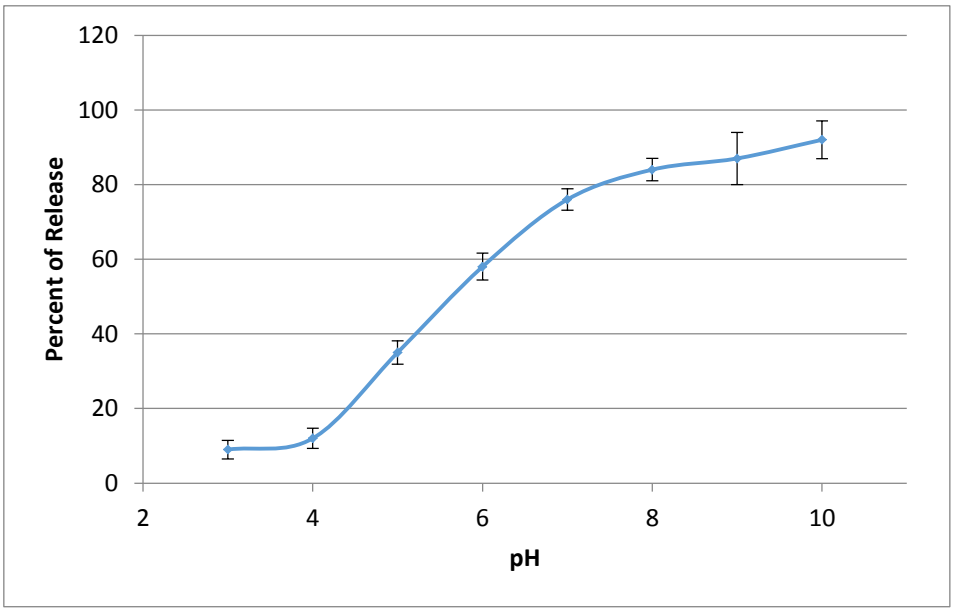
شکل ۵- طیف FTIR نانوژل آلژینات بارگزارش شده با عصاره.



شکل ۵- نمودار رهایش عصاره از نانوذرات آلژینات در زمان‌های مختلف.



شکل ۶- رهایش عصاره از نانوذرات آلژینات در دماهای مختلف.



شکل ۷- رهایش دارو از نانوذرات آلژینات در pH های مختلف.

۴- بررسی اثرات ضدمیکروبی

در این مطالعه، به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوژل آلژینات حاوی عصاره از روش MIC و MBC استفاده شد. در روش MIC سویه‌های باکتریایی استاندارد تحت غلظت‌های ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نانوژل آلژینات در کمترین غلظت ۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و بیشترین غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی ایزوله‌ها تاثیرگذار بودند (جدول ۱).

بحث

امروزه روش‌های نوین درمان و کاربردهای گیاهان دارویی در درمان عفونت‌های میکروبی به دلیل افزایش مقاومت‌های دارویی ضروري به‌نظر می‌رسد [۲۱]. عصاره‌های گیاهی از جمله مهمترین ترکیبات گیاهی هستند که داراي خواص ضدمیکروبی شناخته شده می‌باشند. ولی این ترکیبات بسیار فرار هستند که این مساله اثرات مثبت آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۸]. یکی از مهمترین روش‌های نانوبیوتکنولوژی، استفاده از علوم نانو برای فرموله کردن و

دستکاري اسانس‌ها براي افزايش كيفيت و اثر و طولانی شدن فعالیت‌های بیولوژیکی است [۱۹]. کپسوله شدن مواد دارویی از جمله اسانس‌ها در نانوذرات پليمري ميتواند اثرات درمانی چنین ترکیباتی را بهبود دهد و نانوژل آلژینات به عنوان نانوپلیمر زیست تخریب‌پذیر به دلیل کپسوله کردن بهتر، رهاسازی کنترل شده و سمیت پایین در این زمینه بسیار مورد توجه است [۲۴]. تثبیت نمودن عصاره‌های گیاهی در نانو ذرات پلیمری منجر به افزایش پایداری آن‌ها در مقابل حرارت، pH، پروتئازها و سایر عوامل تخریب کننده ساختمان آن‌ها می‌گردد [۹]. در این مطالعه از عصاره گیاه بومی آرتمیزیا دیفوزا که از خانواده Asteraceae است، به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی مورد استفاده قرار دادیم. یکی از اهداف این مطالعه سنتز نانوژل آلژینات حاوی عصاره گیاه آرتمیزیا دیفوزا بود. نتایج میکروسکوپ الکترونی و DLS نشان داد که نانوژل‌های سنتز شده دارای اندازه زیر ۱۰۰ نانومتر بودند که یکی از ویژگی‌های نانوذرات سنتز شده سایز کوچک آنها می‌باشد. مطالعات رابطه مستقیمی بین سایز نانوذره و میزان سمیت سلولی نشان داده‌اند. در واقع هر چه سایز نانوذره کوچک تر باشد میزان نفوذ آن به داخل سلول بیشتر است و سمیت وابسته به دوز ایجاد می‌شود [۱۹].

یکی از نکات مهم در بحث رسانش‌دارو در داروشناسی، رهایش آهسته دارو می باشد که این مساله دارای مزیت است [۱۱]. رسانش آهسته دارو از درون نانوساختارها سمیت آن‌ها را کمتر می‌کند و باعث می شود دوزهای مناسب از دارو به بافت هدف منتقل شود [۱۸]. در این مطالعه عصاره گیاه محصور شده در نانوژل آلژینات با افزایش زمان و افزایش pH میزان رهایش آن بیشتر می‌شود، بطوری که میزان رهایش عصاره را در pH= ۱۰ به میزان ۹۰٪ می‌رسد و همچنین میزان رهایش دارو در pH= ۷ حدود ۷۵% بوده است. هم چنین نمودار رهایش عصاره در دمای حدود ۳۷°C که دمای بدن می‌باشد، میزان رهایش عصاره حدود ۸۰% نشان داده شده است که درصد آزادسازی قابل توجهی می‌باشد.

یکی دیگر از اهداف مطالعه، بررسی اثرات ضدمیکروبی نانوژل آلژینات حاوی عصاره بود. همانطور که نتایج نشان می‌دهد که میزان MIC نانوژل آلژینات حای عصاره ۲ تا ۴ برابر کمتر از عصاره تنها می‌باشد که نشان دهنده افزایش چشمگیر اثرات ضدمیکروبی می‌باشد. یکی از مکانیسم‌های احتمالی اتصال و فیوژ نانوژل آلژینات با دیواره سلولی باکتری و رهایش بهتر عصاره به درون سلول باکتری و در نهایت مرگ سلول باکتری می‌باشد [۲۳]. مطالعات مختلفی در زمینه انکپسوله کردن عصاره و اسانس‌های گیاهی درون نانوژل‌ها و بررسی اثرات ضدمیکروبی به انجام رسیده است. در سال ۲۰۱۷ الناز نعمتیان کرمانشاهی و همکاران تاثیر نانوژل‌های حاوی اسانس نعناع را بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی کردند. نتایج نشان داد که اسانس کپسوله شده در مقایسه با اسانس آزاد اثر ضد باکتریایی بیشتری بر علیه باکتری‌های مطالعه شده دارد [۵]. یافته‌های تحقیق ما می‌تواند به درمان با گیاهان دارویی به منظور دستیابی به عملکرد بهتر عصاره ها، منجر شود. با توجه به فراریت اسانس‌ها به نظر می‌رسد می‌توان با کپسوله کردن این ترکیبات نیمه عمر آنها را افزایش داد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که نانوژل آلژینات حاوی عصاره دارای سایز کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر بوده و آهسته رهش است و بصورت کنترل شده آزاد می‌شود. هم چنین نتایج ضدمیکروبی نشان می‌دهد که نانوژل آلژینات حاوی عصاره دارای اثرات ضدمیکروبی معناداری می‌باشد. بنابراین با مطالعات بیشتر می‌توان از این نانوژل جهت اهداف درمانی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از تمامی کارشناسان و افرادی که در انجام این پروژه تحقیقاتی کمک کرده‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

[1] Abasalizadeh F., Vaghefi M. S., Alizadeh E., akbari E., Kashani E., Bagher Fazljou S.M., Torbati M., Akbarzadeh A. 2020, Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. Journal of Biological Engineering, 14(8): 1-22

[2] Allen TM., Cullis P. R. 2004, Drug delivery systems: entering the mainstream. Science, 303: 1818-1822.

[3] AL-Sabagh AM., Maysour NE., El-Din M.R.N. 2007, Investigate the demulsification efficiency of some novel demulsifiers in relation to their surface active properties. J Dispers Sci Technol, 28: 547-555.

[4] Al-Snafi A.E. 2015, The pharmacological importance of Artemisia campestris—A review. Asian J. Pharm. Res, 5: 88-92.

[5] Alvarez-Román R., Naik A., Kalia Y.N., Guy R.H., Fessi H. 2004, Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. J Control Release, 99: 53-62.

[6] Blecher K., Nasir A., Friedman A. 2011, The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. Virulence, 2 (5): 395-401.

[7] Chu S.S., Liu Z.L., Du S.S., Deng Z.W. 2012, Chemical composition and insecticidal activity against Sitophilus zeamais of the essential oils derived from Artemisia giraldii and Artemisia subdigitata. Molecules, 17: 7255-7265.

[8] Ghobril C., Grinstaff M.W. 2015, The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial. Chem Soc Rev, 44(7): 1820-1835.

[9] Hemeg H.A. 2017, Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. Int J Nanomedicine, 12: 8211-8225

[10] Hetrick EM., Schoenfisch MH. 2006, Reducing implant-related infections: active release strategies. Chem Soc Rev, 35(9): 780-789. [PubMed] [Google Scholar]

[11] Hu R., Li G., Jiang Y. 2013, Silver-zwitterion organic-inorganic nanocomposite with

[12] antimicrobial and antiadhesive capabilities. Langmuir, 29(11): 3773-3779.

[13] Hu W, et al. 2019, Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels.Biomater Sci, 7(3): 843-55.

[14] Marshall B.M., Levy S.B. 2011, Food animals and antimicrobials: impacts on human health. Clin Microbiol Rev, 24(4): 718-733.

[15] Meyer K., Palmer J.W. 1934, The polysaccharide of the vitreous humor. J Biol Chem, 107: 629-634.

[16] Mirrahimi M, et al. 2019, A thermo-responsive alginate nanogel platform co-loaded with gold nanoparticles and cisplatin for combined cancer chemo-photothermal therapy. Pharmacol Res, 143:178-85.

[17] Nathan C., Cars O. 2014, Antibiotic resistance-problems, progress, and prospects. N Engl J Med, 371(19): 1761-1763.

[18] Park J. H., Lee S., Kim J. H., Park K., Kim K., Kwon I. C. 2008, Polymeric nanomedicine for cancer therapy. Prog Polym Sci, 33: 113-137.

[19] Pelgrift R.Y., Friedman A.J. 2013, Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. Adv Drug Deliv Rev, 65(13-14): 1803-1815.

[20] Sahiner N., Sagbas S., Sahiner M., Silan C., Aktas N., Turk M. 2016, Biocompatible and biodegradable poly[Tannic Acid] hydrogel with antimicrobial and antioxidant properties. Int J Biol Macromol, 82: 150-159.

[21] Sahiner N. 2013, Soft and flexible hydrogel templates of different sizes and various functionalities for metal nanoparticle preparation and their use in catalysis. Prog Polym Sci, 38(9): 1329-1356.

[22] Shea L.D., Woodruff T.K., Shikanov A. 2014, Bioengineering the ovarian follicle microenvironment. Annu Rev Biomed Eng, 16: 29-52.

[23] Singer AC., Shaw H., Rhodes V., Hart A. 2016, Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. Front Microbiol, 7: 1728.

[24] Skladanowski M., Golinska P. 2016, Evaluation of cytotoxicity, immune compatibility and antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles. Med Microbiol Immunol, 205(6): 603-613.

[25] Tsao C.T., Chang C.H., Lin Y.Y. 2010, Antibacterial activity and biocompatibility of a chitosan-gamma-poly (glutamic acid)

polyelectrolyte complex hydrogel. Carbohydr Res, 345(12): 1774-1780.

[26] Tucakov J. 1971, Healing with plants - phytotherapy. Beograd: Culture, pp. 180-90.

[27] Wiart C. 2006, Etnopharmacology of medicinal plants. New Jersey: Humana Press, pp. 1-50.

Synthesis, physico-chemical properties and anti-bacterial activity of Alginate nanogel encapsulated *Artemisia diffusa* extract

Shamsi F.[1], Bagheri Kashtali A. [2*], Mirzaie A.[2]

[1] Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

* Email: Bagheri-ali@riau.ac.ir

Received: September 2020 Accepted: October 2020

Abstract

One of the new fields in nanotechnology is the use of nanogels to improve the release of drug and increase its antimicrobial effects. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effects of *Artemisia diffusa* extract encapsulated in Alginate nanogel against the pathogenic bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. In this study, *A. diffusa* extract was first obtained by maceration method using aqueous solvent. The extract was then encapsulated in Alginate nanogel and the nanogels prepared were confirmed by scanning electron microscopy (SEM), Dynamic light scattering (DLS) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) methods. The release of the extract was also investigated at different times, temperatures and pHs. Finally, the antimicrobial effects of nanogels encapsulated extract and free extract against the pathogenic bacteria were investigated by the lowest inhibitory concentration (MIC) method. The results showed that the synthesized nanogels had a spherical structure and an average size of 85 nm. FTIR results also showed that the extract was trapped within the nanogel structure. The release rate of the extract had a good pattern. Antimicrobial results showed that the nanogels encapsulated extract had lower MIC than the extract. Based on the findings of this study, it can be concluded that Alginate nanogel encapsulated extract have significant antimicrobial effects and it can be used in the pharmaceutical industry in the future with more studies.

Keywords: *Artemisia diffusa*, Alginate nanogel, Antimicrobial activity.