مقاله تحقیقی

مطالعه فعالیت ضد باکتریایی اسانس نعناع (*Mentha spicata*) کپسوله شده در نانوژل های کیتوسان- اسید کافئیک بر علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی

الناز نعمتیان کرمانشاهی، معصومه مهدوی اورتاکند*، راحله صفایی جوان

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

***مسئول مکاتبات:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران
masumehmahdavi@gmail.com

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۱- شماره ۴- زمستان ۱۳۹۵

چکیده

درمان با آنتی بیوتیک برای درمان عفونت های باکتریایی با مشکلات مختلفی مواجه است که درمان آنتی بیوتیک را محدود می کند. بنابراین، منابع گیاهی به دلیل عوارض جانبی پایین تر و در بعضی موارد اثرات بهتر و سریعتر توجه بیشتری را جلب می کنند. کپسوله شدن مواد دارویی در نانو ذرات پلیمری می تواند اثرات درمانی چنین ترکیباتی که عموما فرار هستند را بهبود دهد. کیتوسان به عنوان نانوپلیمر زیست تخریب پذیر به دلیل کپسوله کردن بهتر، رهاسازی کنترل شده و سمیت پایین در انتقال دارو بسیار مورد توجه می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس *Mentha spicata* کپسوله شده در نانوژل های کیتوسان- اسید کافئیک در مقایسه با اسانس آزاد بر روی باکتری های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری های گرم منفی اشریشیاکلی و سالمونلا انتریکا می باشد. ابتدا نانوژل ها، به روش خود تجمعی از پلیمر کیتوزان و اسید کافییک سنتز شدند و پس از بررسی شکل و اندازه آنها با روش های اسپکترومتری (FTIR)، میکروسکوپی الکترونی نگاره (SEM) و زتاسایزر، از آن به منظور انکپسوله کردن اسانس نعناع استفاده شده است. سپس اثر ضدباکتریایی اسانس کپسوله شده و اسانس آزاد با روش دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث بررسی شد. نتایج نشان داد که اسانس کپسوله شده در مقایسه با اسانس آزاد اثر ضد باکتریایی بیشتری بر علیه باکتری‌های مطالعه شده دارد. یافته های این تحقیق می‌تواند به درمان با گیاهان دارویی به منظور دستیابی به عملکرد بهتر اسانس ها، منجر شود. با توجه به فراریت اسانس ها به نظر می رسد می‌توان با کپسوله کردن این ترکیبات نیمه عمر آنها را افزایش داد.

واژه های کلیدی: اسانس کپسوله، کیتوسان، اسانس نعناع *Mentha spicata*، اثر ضد میکروبی

مقدمه

با توجه به مقاومت های دارویی باکتری ها به آنتی بیوتیک ها، ساخت و بهینه سازی نانوسامانه‌های جهت انتقال دهنده دارو به بافت های هدف مورد توجه قرار گرفته است. امروزه بیوتکنولوژی دست به تولید گروه نوینی از داروهای بیولوژیک زده است و روشی کاملا نو را در طراحی داروها ارائه می‌کند، به طوری که گرایش فزاینده‌ای برای استفاده از این فرآورده ها در درمان بیماری ها مشاهده می گردد (۱). بنابراین از فناوری نانو جهت افزایش پایداری و حل پذیر نمودن آن در آب بهره گیری شده است. کپسوله کردن فرایندی است که در آن اجزای جامد، مایع و گاز درون کپسول‌های کوچک گنجانده می‌شوند و می‌توان محتویاتشان را با سرعت کنترل شده رها کنند. نانو ذرات حمل کننده دارو از

گنجانده می‌شوند و می‌توان محتویاتشان را با سرعت کنترل شده رها کنند. نانو ذرات حمل کننده دارو از موادی همچون؛ کیتوسان، آلبومین، پلی الکتیک کوگلی کولیک اسید و پلی اتیلن گالیکول ساخته می‌شوند (۲). کیتوسان فرم استیل زدایی شده کیتین که پلی ساکارید موجود در پوسته سخت پوستان است، می باشد. خصلت آب دوستی کیتوسان ویژگی مهمی برای تشکیل نانوذرات خود تجمع است و به طور ذاتی برای کاربردهای دارورسانی مناسب است. حفره های آبگریز می توانند به عنوان انبار یا میکرو محفظه برای مواد زیست فعال گوناگون عمل کنند. این نانوذرات به دلیل ابعاد کوچکشان می توانند از طریق تزریق های درون وریدی برای دارورسانی هدفمند بکار گرفته شوند. اتصال اجزاء هدفدار به سطح نانوذرات بارگیری شده با دارو، می تواند بازده درمانی دارو را بهبود بخشد. علاوه بر این خصوصیات، زیست سازگاری و سمیت کم کیتوسان باعث شده است تا از آن برای انتقال ترکیبات درشت ملکول بهره برداری شود (۳،۴). کپسوله شدن مواد دارویی در نانوذرات پلیمری می‌تواند اثرات درمانی چنین ترکیباتی را بهبود دهد و کیتوسان به عنوان نانوپلیمر زیست تخریب پذیر به دلیل کپسوله کردن بهتر، رهاسازی کنترل شده و سمیت پایین در انتقال دارو بسیار مورد توجه می باشد (۵). با توجه به فراریت اسانس و ناپایداری آن در برابر عوامل محیطی کپسوله کردن آن، می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای نیمه عمر اسانس را افزایش داده و بنابراین استفاده از خاصیت ضد باکتریایی اسانس را به مدت طولانی تر، امکان پذیر می نماید (۶). نعناع از جمله گیاهانی است که بـــه علت اهمیت اقتصادی و دارویی توجه بیشتر محققان را به خود جلب نموده است. نعناع خوراکی *Mentha spicata* متعلق به خانواده Lamiaceae گیاهی است چند ساله، علفی، پایا، با ساقه‌های چهار گـوش و بـرگهای متقابل و دندانه‌دارکه پوشیده از کرک و بدون دمبرگ هستند. گل‌ها به صورت سنبله‌هـای باریک و نوکدار، سیسـتم ریشه‌ای خزنده است و تکثیر گیاه معمـولا از طریـق سـاقه‌هـای زیـر زمینی یا ریزومها صورت می‌گیرد. قسمت اعظم اسانس گیاه نعناع سبز را ترکیبات مونوترپنی تشـکیل مـی‌دهند و سزکوئی‌ترپن‌هـا درصد کمتری از مـواد موجـود در اسـانس را بـه خـود اختصـاص می‌دهند که اثرات ضدمیکروبی آن تایید شده است (۷). هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس نعناع کپسوله شده در نانوژل های کیتوسان در مقایسه با اسانس آزاد بر روی باکتری های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری های گرم منفی اشریشیاکلی و سالمونلا انتریکا می باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج اسانس نعناع و آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده آن

به منظور تهیه اسانس اندام های هوایی، گیاه نعناع *Mentha spicata* به وسیله آسیاب برقی خرد شده و سپس ۲۰۰ گرم از پودر گیاه خشک پس از توزین با دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت اسانس گیری شد. در ادامه، اسانس با سولفات سدیم بدون آب، آبگیری و در ظرف درب بسته تیره رنگ، دور از نور و در یخچال نگهداری شد. نمونه آماده شده توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی (GC-MS) تزریق گردید از آنجایی که ترکیبات موجود در اسانس ها به لحاظ وزن مولکولی و قطبیت بعنوان مواد فرار شناخته می شوند از این رو عمل جداسازی و شناسایی ترکیبات متشکله اسانس بدست آمده توسط روش کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی انجام گردید. مشخصات و شرایط دستگاه GC: 7890A شرکت Agilent Technologies، نوع ستون HP-5MS بـا قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میلی متر، ضخامت فیلم ۰/۳۲ میکرومتر و طول ستون ۳۰ متر، گاز حامل هلیوم با سرعت ۱ میلی متر در دقیقه بود. مشخصات و شرایط دستگاه MS: مدل 5975C شرکت Agilent Technologies، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای یونیزاسیون ۲۴۰ درجه سانتی گراد بود. طیف های جرمی بدست آمده از دستگاه GC-MS با طیف های جرمی استاندارد موجود در منابع مقایسه گردید (۸). برای تایید شناسایی های انجام شده توسط طیف های جرمی، از شاخص بازداری کواتس مطابق GC-MS استفاده ش

سنتز نانوژل

در این تحقیق نانوژل‌ها به روش خودتجمعی از کیتوزان با وزن مولکولی بالا (سیگما آلدریچ) و اسید کافئیک سنتز می شوند. برای این کار ابتدا ۰/۵ گرم کیتوزان در ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک ۰/۱ درصد حل گردید، سپس در دمای اتاق ۲۵۰ rpm به مدت یک ساعت روی شیکر قرار داده شد. سپس ۸۵ میلی لیتر متانول به محلول اضافه شد و در دمای اتاق ۲۵۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه شیک گردید. سپس اسید کافئیک به میزان ۲۲۱ میلی گرم با ۶۶۸ میکرولیتر اتیلن دی کلراید داخل یک میکروتیوپ حل شد و به آرامی با سمپلر به محلول اولیه اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه سونیکیت گردید. سپس این محلول در دمای اتاق، ۲۵۰ rpm به مدت ۵ ساعت شیک گردید و PH آن با سود ۱ مولار روی ۸,۵ تا ۹ تنظیم شد و در انتها روی ۹۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ گردیده و محلول رویی را خالی کرده و رسوب را یک بار با الکل شستشو داده و ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و مرتبه بعدی با آب مقطر شسته شد و ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیده، سپس رسوب در دمای منفی ۸۰ فریز گردیده و به وسیله دستگاه فریز درای خشک می گردد. در نهایت شکل، اندازه و ساختار نانوژل سنتز شده توسط طیف سنجی FT- IR (Nicolet IR100)، زتاسایزر (Malvern3600 Instruments Ltd., Malvern,UK) و میکروسکوپ الکترونی نگاره SEM KYKY (EM3200) در دانشگاه تهران مورد بررسی قرار گرفت.

کپسوله کردن اسانس نعناع

در این مرحله اسانس نعناع توسط نانو ژل بدست آمده کپسوله می شود، برای این کار ابتدا ۱۷۰ میلی گرم اسانس نعناع وزن گردید و به آن ۱۷۰ میلی گرم اتانول اضافه شد، جذب این محلول توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در ۳۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر خوانده شد. ۱۷۰ میلی گرم از نانو ژل به آن اضافه شد سپس به حجم ۳۵ میلی‌لیتر با آب مقطر رساند شد. سپس به مدت ۵ دقیقه سونیکیت با قدرت ۷۰ هرتز گردید. سپس یک ساعت روی شیکر قرار داده شد. در آخر ۱۵ دقیقه سانتریفوژ ۱۰۰۰۰ rpm برای جداسازی ذرات انجام شد و رسوب حاصل را جدا کرده و جذب مایع رویی رسوب را نیز خوانده شد و در رابطه ۱ قرار گرفت و ظرفیت بارگذاری عصاره محاسبه شد (۹).

رابطه ۱)

$$Loading\ Efficiency\ \% = \left[\frac{OD_i - OD_s}{OD_i}\right] \times 100$$

تهیه سویه های باکتری استاندارد مورد مطالعه

باکتری های مورد مطالعه، باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* (ATCC 25922) و *Salmonella enterica* (ATCC 1231) و باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) و *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) بود که به صورت لیوفریزه از کلکسیون میکروبی ایران در انستیتیو پاستور خریداری شد.

بررسی اثر ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن[1]

ابتدا باکتری‌ها از حالت لیوفریزه خارج شد و برای به دست آوردن تک کلونی کشت داده شد. سپس سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه شد و باکتری ها روی محیط کشت مولر هینتون آگار به وسیله سوآپ به صورت چمنی کشت داده شدند. دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) و دیسک بلنک از شرکت پادتن طب تهیه شد. دیسک‌های بلنک با ۱۰ میکرولیتر از اسانس آزاد نعناع یا نانو اسانس با رقت‌های تهیه شده در ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ µg/ml آغشته شد. دیسک آنتی بیوتیک جنتامایسین (به عنوان کنترل مثبت) و یک دیسک بلاک حاوی ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل (به عنوان کنترل منفی) هم قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرارداده شد. برای هر نمونه باکتری این آزمایش سه بار تکرار شد. پس از آن قطرهاله عدم رشد باکتری به وسیله خط کش میلیمتری، اندازه گرفته شد و عدد میانگین هر سه پلیت محاسبه شد.

[1] Disk diffusion

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC[2]) به روش میکرودایلوشن براث

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، ابتدا اسانس نعناع ابتدا توسط محلول ۵ درصد DMSO رقیق شد. ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۴۰۰ تا ۰/۱۹ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از اسانس نعناع براساس روش سریال دایلوشن به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی افزوده شد. سوسپانسیون میکروبی که با نیم مک فارلند برابر شده بود به وسیله محیط کشت مولر هینتون براث به میزان ۱/۱۰۰، جهت به دست آوردن تعداد 10^6 CFU/ml × ۰/۵ رقیق شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌ها افزوده شد. در این آزمون به منظور کنترل محیط کشت، از محیط کشت خالی (بدون اسانس نعناع و سوسپانسیون میکروبی) استفاده گردید. به منظور کنترل زمینه از اسانس نعناع و محیط کشت (بدون سوسپانسیون میکروبی) استفاده شد. سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت بدون اسانس نعناع به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. در نهایت میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، انکوبه شد. پایین‌ترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشد و فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بود به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. این آزمایش برای هر باکتری سه بار تکرار گردید.

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس کپسوله شده هم ابتدا استوک ذخیره نانواسانس را تهیه شد. به این منظور، از رسوب نانواسانس، به میزان ۱۰۰ میلی گرم برداشته و با آب مقطر استریل به حجم ۱ میلی لیتر رسانده و به مدت ۲۰ دقیقه سونیکیت گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های ۵۰۰۰ تا ۲/۴ میکروگرم بر میلی لیتر از نانو اسانس براساس روش سریال دایلوشن به یک ردیف از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی افزوده شد. بقیه مراحل مانند روش ذکر شده در بالا انجام گرفت و MIC نانواسانس بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری تعیین گردید.

بررسی حداقل غلظت کشنده (MBC[3])

از رقت MIC و چند رقت بالاتر از آن (پس از شیک نمودن میکروپلیت)، به میزان ۲۰ میکرولیتر در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباتورگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیت‌ها از نظر رشد باکتری بررسی گردیده و اولین رقت که در آن رشدی روی محیط کشت دیده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی(MBC) باکتری ها گزارش گردید. این مرحله نیز برای هر باکتری سه بار تکرار شد.

نتایج

نتایج آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس نعناع

اسانس استخراج شده از گیاه به آزمایشگاه تخصصی منتقل شد و در آنجا حجم ۱ میکرولیتر از آن به دستگاه GC-MS تزریق شد. با توجه به الگوی خروج آلکان های نرمال، شاخص بازداری و اندیس کواتس و تطبیق آنها با الگوهای کتابخانه ای، طیف ها ی مربوط به هر ترکیب تفسیر و ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس شناسایی شدند. مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده عبارت بودند از کاروون ۵۵/۷۷ درصد، لیمونن ۲۲/۷۱ درصد، منتول ۴/۴۷ درصد، پولگون ۲/۵۴ درصد. شکل ۱ کروماتوگرام حاصل از آنالیز اسانس گیاه نعناع و مقدار آنها را نشان می دهد.

نتایج سنتز نانوژل

نانوژل سنتز شده از نظر شکل و اندازه با روش های طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) و میکروسکوپ الکترونی (SEM) و همچنین زتاسایزر مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج اسپکترومتری (FTIR)

ساختار شیمیایی و نوع گروه‌های عاملی کیتوزان، اسیدکافئیک و نانوژل (کیتوان و اسید کافئیک) سنتز شده با استفاده از طیف تبدیل فوریه‌ی زیر قرمز (FTIR) شناسایی شد (شکل ۲). با توجه به این که هر پیک نشان دهنده میزان جذب در عدد موجی متناظر با آن می باشد

[2] minimum inhibitory concentration

[3] minimum bactericidal concentration

و توسط یک پیوند شیمیایی مشخص ایجاد می شوند، در نتیجه عدد موجی هر پیک نشان دهنده حضور یک گروه عاملی خاص در نمونه خواهد بود. پیک مشاهده شده در عدد موج cm^{-1} ۳۴۲۹/۴۰ مربوط به گروه‌های عاملی الکل‌ها و فنل‌ها، آمین‌های نوع اول و دوم و همچنین آمیدها است. پیک مشاهده شده در cm^{-1} ۲۸۷۶/۳۱ مربوط به گروه‌های کربوکسیل و همچنین آلکانهایی مثل متان است. پیک مشاهده شده در cm^{-1} ۲۲۰۲/۱۴ مربوط به نیتریل‌ها می‌باشد. آلکین ها نیز در این محدوده پیک ایجاد می کنند. پیک مشاهده شده در cm^{-1} ۱۵۸۸/۴۰ و cm^{-1} ۱۶۶۰/۱۱ مربوط به گروه‌های عاملی آمین‌های نوع اول و آمیدها است. پیک مشاهده شده در cm^{-1} ۱۴۲۱/۶۱ مربوط به ترکیبات دارای گروه های نیترومتان و برخی کشیدگی های غیرسیمتریک است. پیک مشاهده شده در cm^{-1} ۱۰۸۱/۴۷ مربوط به گروه‌های عاملی کربوکسیل، الکل‌ها، آمین های آلیفاتیک، استرها و اترهای با پیوند یگانه می‌باشد. پیک مشاهده شده در cm^{-1} ۶۵۶/۹۹ مربوط به ترکیبات آلکین است. بر این اساس، طیف FTIR نشان دهنده وجود پیوندهای کووالانسی بین کیتوزان و اسید کافئیک در ساختار نانوژل بود.

نتایج پارتیکل سایز آنالایزر

توزیع اندازه نانوژل توسط دستگاه زتاسایزر مشاهده شد. نتایج نشان داد که تمامی ذرات قطر ۱۹/۴ نانومتر داشتند. توزیع باریک و تک سایز بودن نانوذرات تولید شده آنها را گزینه مناسبی جهت استفاده در مطالعات داروسازی می نماید (شکل ۳).

نتایج میکروسکوپ الکترونی SEM

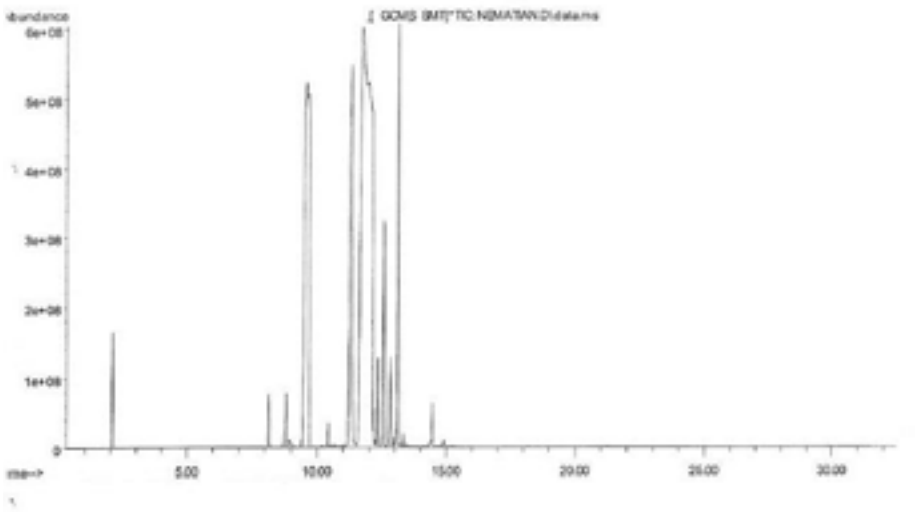
مورفولوژی نانوذره را از طریق میکروسکوپ الکترونی نیز بررسی گردید و مشاهده شد که ساختار نانوذرات کروی با سطحی صاف هستند (شکل ۴).

نتایج بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس آزاد و کپسوله شده به روش دیسک دیفیوژن

بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری اندازه گرفته شد و عدد میانگین هر سه پلیت (بر حسب میلیمتر) محاسبه شد. در بررسی اثرات دیسک‌های حاوی اسانس کپسوله شده، برای هر چهار باکتری، هیچ‌هاله‌ی مشاهده نشد.

نتایج بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس نعناع به روش میکرودایلوشن

نتایج MIC اسانس نعناع و اسانس کپسوله شده برای چهار باکتری مورد بررسی در جدول۱ مشاهده می‌شود. بر طبق این نتایج اسانس آزاد نعناع بیشترین تاثیر ضدباکتریایی روی باکتری اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس داشت و حداقل غلظت مهارکنندگی برای این باکتری ها µg/ml ۱۶ بدست آمد. برای مهار باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نیاز به مقادیر بیشتری از اسانس نعناع بود و MIC آن µg/ml ۶۴ و بیشتر از سه باکتری دیگر بود. همچنین حداقل غلظت مهار کننده و کشنده در دو باکتری سالمونلا انتریکا µg/ml ۳۲ و باسیلوس سوبتیلیس µg/ml ۱۶ بود. نتایج بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس کپسوله شده روی باکتری‌های مورد مطالعه نشان داد که باکتری اشریشیاکلی همچنان حساس ترین باکتری به اسانس کپسوله بود و MIC آن µg/ml ۴/۸ به دست آمد. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس هم مقاوم ترین باکتری و MIC آن µg/ml ۳۹ به دست آمد.

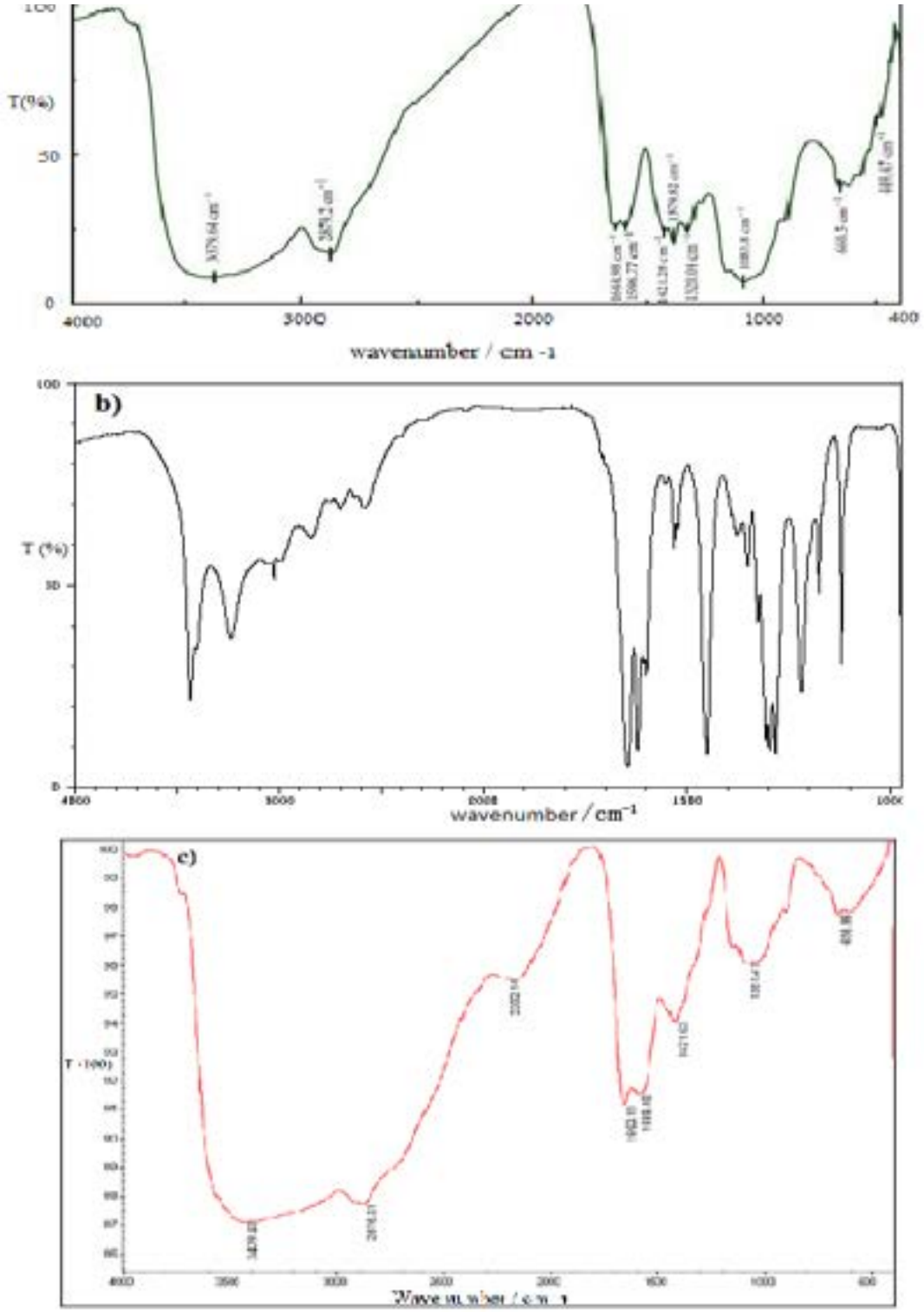


شکل ۱ - کروماتوگرام اسانس گیاه نعناع بدست آمده از دستگاه GC-MS.

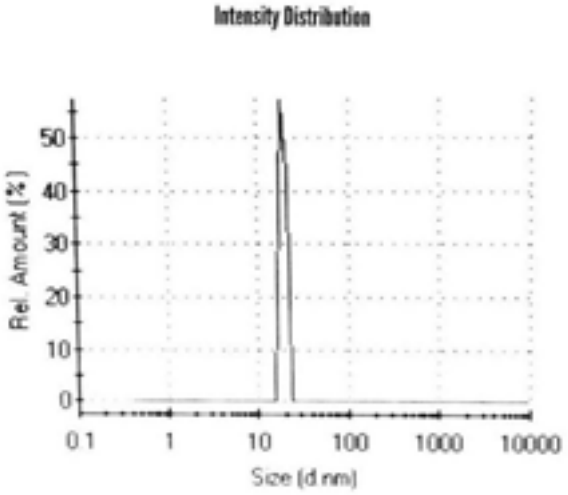
بحث و نتیجه گیری

در حال حاضر، درمان با آنتی بیوتیک برای درمان عفونت های باکتریایی با مشکلات مختلفی مواجه است که درمان آنتی بیوتیک را محدود می کند. بنابراین، منابع گیاهی به دلیل عوارض جانبی پایین تر و در بعضی موارد اثرات بهتر و سریعتر توجه بیشتری را جلب می کنند. مطالعات انجام شده در این رابطه نشان می دهد که فعالیت های ضد میکروبی اسانس های گیاهی با توجه به ویژگی هایی مانند فرار و ناپایداربودن، حلالیت کم در آب و قابلیت اکسیداسیون اسانس ها، لازم است تکنیک های جدید برای افزایش فعالیت ضد میکروبی قبل از استفاده از آنها برای درمان کشف شود. یکی از مهمترین روش ها، استفاده از علوم نانو برای فرموله کردن و دستکاری اسانس ها برای افزایش کیفیت و اثر و طولانی شدن فعالیت های بیولوژیکی است. کپسوله شدن مواد دارویی از جمله اسانس ها در نانوذرات پلیمری می‌تواند اثرات درمانی چنین ترکیباتی را بهبود دهد و کیتوسان به عنوان نانوپلیمر زیست تخریب پذیر به دلیل کپسوله کردن بهتر، رهاسازی کنترل شده و سمیت پایین در این زمینه بسیار مورد توجه است (۱۰و ۱۱).

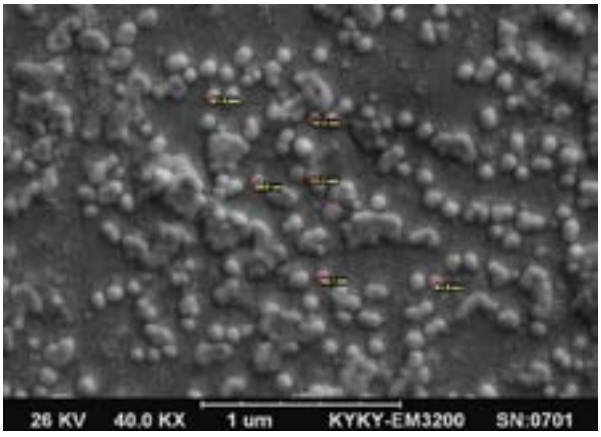
مطالعات بسیار محدودی در مورد خواص ا
نانوکپسول شده تاکنون انجام شده است. nalili
همکارانش در سال ۲۰۱۵ در پژوهشی کپسوله ک
اسانس آویشن در نانو ژلهای سنتز شده از کیتوس
بنزوئیک اسید به منظور افزایش نیمه عمر اسانس و افز
فعالیت ضد قارچی آن انجام دادند، حداقل غلظت مه
نانو ژل های حاوی اسانس بر ضد قارچ آسپرژیل
فلاووس در دو شرایط محیط باز و بسته محاسبه شد
حداقل غلظت مهاری آویشن آزاد مقایسه شده است. ا
بدست آمده نشان داد که حداقل غلظت مهاری نانوژل
حاوی اسانس آویشن ppm ۵۰۰ است و خاصیت
قارچی قابل توجه ای بر ضد قارچ آسپرژیلوس فلاووس
می باشد(۱۲). Zhaveh و همکارانش در سال ۲
اسانس *Cuminum cyminum* را با کیتوسان و کا
اسید، برای بهبود عملکرد ضد میکروبی و پایداری
اسانس کپسوله کردند و برعلیه *Aspergillus flavus*
استفاده قرار دادند. نتایج نشان داد که حداقل غ
بازدارندگی اسانس های *C. cyminum* آزاد و کپسول
در برابر *A. flavus* در به ترتیب به ترتیب ۶۵۰ و
ppm به دست آمد (۱۳).



شکل ۲ – طیف FTIR: a) کیتوزان، b) اسیدکافئیک و c) نانوژل (کیتوزان و اسید کافئیک).



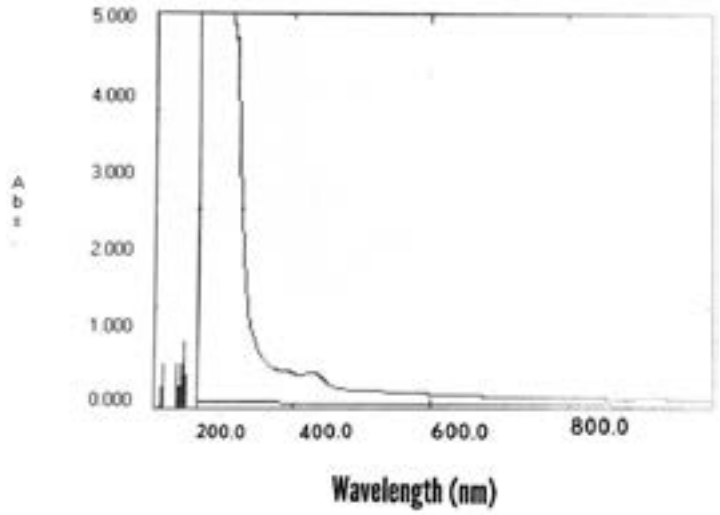
شکل ۳ - طیف مربوط به بررسی اندازه نانوژل با دستگاه زتاسایزر.



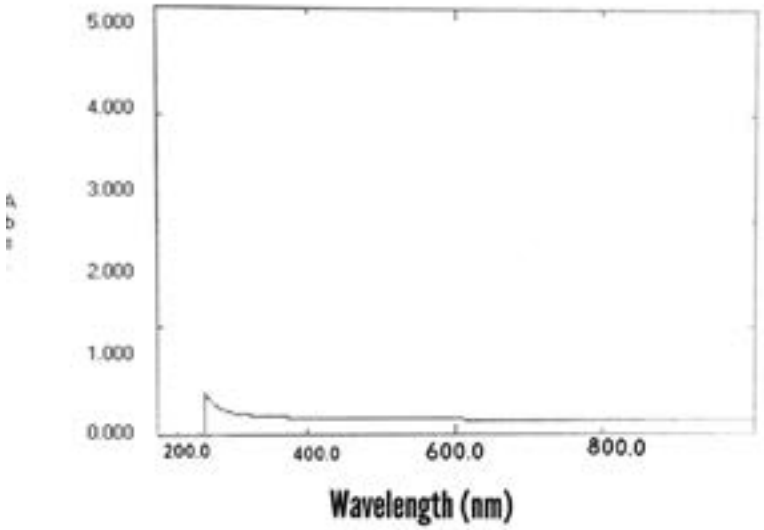
شکل ۴ - بررسی شکل نانوژل توسط میکروسکوپ الکترونی SEM.

Darabad در سال ۲۰۱۵ مطالعه ای بر روی اثرات ضد میکروبی اسانس گیاهان *Artemisia sieberi*, *Lavandula angustifolia, Artemisia sieberi, Myrtus communis* و *Cinnamomum vera* که در نانوژل های کیتوسان کپسوله شده بودند را در برابر باکتری های موثر در سینوزیت که یکی از بیماری های عفونی شایع است انجام داد. در این بررسی که بر روی باکتری های *S. pneumonia, S. pyogenes, S. aureus* و *P. aeroginosa,* انجام گرفت، مشاهده شد که حداقل غلظت مهاری اسانس کپسوله ۰/۰۹۷ میکروگرم بر میلی لیتر برای *S. pneumonia* با نانو اسانس اسطوخودوس، ۰/۰۹۷ میکروگرم برمیلی لیتر، برای استافیلوکوک پیوژنز با نانو اسانس درمنه و اسطوخودوس، ۱/۵۶۲ میکروگرم بر میلی لیتر برای استافیلوکوکوس اورئوس با نانو اسانس درمنه و ۳/۲۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر برای سودوموناس آئروژینوزا با نانو اسانس درمنه و اسطوخودوس است. نتایج نشان داد که تاثیر اسانس کپسوله شده روی چهار میکروارگانیسم اصلی سینوزیت قابل ملاحظه است و همچنین یافته ها نشان داد که نانواسانس ها را می توان به دلیل داشتن عوارض

جانبی کمتر برای از بین بردن این میکروارگانیسم ها در تهیه دارو ضد سینوزیت مورد استفاده قرار داد (۱۴).



شکل ۵ - طیف جذب نانواسانس کپسوله شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر.



شکل ۶ - طیف جذب مایع رویی توسط دستگاه اسپکتوفتومتر.

در پژوهش حاضر نانوژل‌ها به روش خود تجمعی از کیتوسان و اسید کافئیک سنتز شدند. شکل و اندازه نانوژل‌های سنتز شده با روش های اسپکترومتری (FTIR) و میکروسکوپی الکترونی (SEM) سنتز و تائید شد. تمامی ذرات نانوژل قطر ۱۹/۴ نانومتر داشتند و کروی با سطحی صاف بودند. پس از کپسوله کردن اسانس نعناع توسط نانوژل، ظرفیت بارگذاری آن ۶۲/۶۴ بدست آمد و نشان دهنده ذخیره شدن اسانس نعناع در نانوژل بود.

اسانس نعناع مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از GC-MS آنالیز شد. ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس شامل کاروون ۵۵/۷۷ درصد، لیمونن ۲۲/۷۱ درصد، منتول ۴/۴۷ درصد، پولگون ۲/۵۴ درصد به دست آمد که از مهمترین ترکیبات فنولی با خاصیت آنتی اکسیدانی می باشد و بخش مهمی از اثر ضدمیکروبی اسانس نعنا به دلیل وجود این ترکیبات می باشد و مقالات مشابه همخوانی دارد (۱۵و ۱۶).

جدول ۱ - نتایج بررسی حداقل غلظت مهارکننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) اسانس آزاد *Mentha spicata* در مقایسه با اسانس کپسوله شده.

	اسانس آزاد		اسانس کپسوله شده	
	MIC	MBC	MIC	MBC
E. coli	۱۶	۳۲	۴/۸	۴/۸
S. enterica	۳۲	۳۲	۳۹	۷۸/۱
S. aureus	۶۴	۱۲۸	۱۹/۵	۳۹
B. subtilis	۱۶	۱۶	۹/۷	۱۹/۵

سپس اسانس کپسوله شده روی چهار باکتری *Escherichia coli*، *Salmonella enterica*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* اثر داده شد و حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس آزاد با اسانس کپسوله شده مقایسه شد. نتایج بررسی اثرات ضدمیکروبی در این مطالعه نشان داد که اسانس کپسوله شده، اثرات قابل توجهی بر باکتری های گرم منفی و همچنین گرم مثبت دارند و در مقایسه با اثر اسانس آزاد، در غلظت‌های کمتری موجب مهار رشد باکتری‌ها شده است. پس از تکرار و ارزیابی نتایج، به نظر می رسید که اسانس ها را نمی توان از دیسک های کاغذ نانو کپسول بر روی آگارز جامد آزاد کرد. با توجه به نتایج مثبت تعیین MIC و MBC، می توان به دقت بالا و همچنین مزایای استفاده از روش برود میکروپلیت در برابر روش انتشار دیسک تاکید نمود.

این یافته ها می‌تواند به درمان با گیاهان دارویی به منظور دستیابی به عملکرد بهتر اسانس ها، منجر شود. با توجه به فراریت اسانس ها به نظر می رسد می‌توان با کپسوله کردن این ترکیبات نیمه عمر آنها را افزایش داد.

نیاز صنایع داروسازی برای تولید محصولات آنتی بیوتیک جدید با روش های نوین و بر پایه مواد بیولوژیک برای مقابله با باکتری های دارای سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک در بیمارستان ها، دستیابی به داروهای طبیعی و غیرشیمیایی سالم ضروری به نظر می رسد.در این رابطه استفاده از گیاهان بومی ایران با خواص ضد میکروبی و کپسوله کردن آن با نانوذرات کیتوسان، می‌تواند روش نوینی در درمان عفونت های ناشی از باکتری ها باشد. یافته‌های این پژوهش، خاصیت ضد باکتریایی اسانس نعناع و اسانس کپسوله را به خوبی آشکار ساخت و نشان داد که اسانس کپسوله شده در مقایسه با اسانس آزاد، اثر ضد باکتریایی بیشتری برعلیه باکتری های مطالعه شده دارد. همچنین نتایج نشان داد که نانو اسانس نعناع در مهار باکتری اشریشیاکلی نسبت به سایر باکتری های مطالعه شده موثرتر عمل می نماید.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1. Vishwakarma, G. S., Gautam, N., Babu, J. N., Mittal, S., Jaitak, V., 2016. Polymeric encapsulates of essential oils and their constituents: A review of preparation techniques, characterization, and sustainable release mechanisms. Polymer Reviews 56(4): 668-701.
2. Woranuch, S., Yoksan, R., 2013. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. Carbohydrate polymers 96(2): 578-585.
3. Keawchaoon, L., Yoksan, R., 2011. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. Colloids and surfaces B: Biointerfaces 84(1): 163-171.

4. Sotelo-Boyás, M. E., Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., Corona-Rangel, M. L., 2017. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. LWT-Food Science and Technology 77: 15-20.
5. Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., Farahmandghavi, F., 2013. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. Carbohydrate Polymers 95(1): 50-56.
6. Negahban M., Moharramipour S., Zand M., Hashemi S. A., 2013. Repellent activity of nanoencapsulated essential oil of *Artemisia sieberi* Besser on *Plutella xylostella* L. larvae. Iran J Med Aromatic Plant 29(4): 909–24.
7. Adams R. P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadropole mass spectroscopy carol stream IL. Allured Publishing Crop, pp. 465.
8. Dehkordi N., Sajjadi S. E., Ghannadi A., Amanzadeh Y, Azadbakht M., Asghari G. R., Amin G.R., Hajiakhoondi A., Taleb A. M., 2002. Iranian Herbal Pharmacopeia.
9. Wang, T., Zhu, X. K., Xue, X. T., Wu, D. Y., 2012. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. Carbohydrate polymers 88(1): 75-83.
10. Beyki, M., Zhaveh, S., Khalili, S. T., Rahmani-Cherati, T., Abollahi, A., Bayat, M., Tabatabaei, M., Mohsenifar, A., 2014. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. Industrial Crops and Products 54: 310-319.
11. Li, P., Zhao, J., Chen, Y., Cheng, B., Yu, Z., Zhao, Y., Yan, X., Tong, Z., Jin, S., 2017. Preparation and characterization of chitosan physical hydrogels with enhanced mechanical and antibacterial properties. Carbohydrate Polymers 157: 1383-1392.
12. Khalili, S. T., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhaveh, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., Bayat, M., Tabatabaei, M., 2015. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. LWT-Food Science and Technology 60(1): 502-508.
13. Zhaveh, S., Mohsenifar, A., Beiki, M., Khalili, S. T., Abdollahi, A., Rahmani-Cherati, T., Tabatabaei, M., 2015. Encapsulation of *Cuminum cyminum* essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. Industrial Crops and Products 69: 251-256.
14. Darabad, S. G., Mohsenifar, A., Yazdanparast, S. A., Bayat, M., 2015. Antimicrobial Effects of *Lavandula angustifolia* Mill, *Artemisia sieberi* Besser, *Cinnamomum verum* J, Presl and Myrtus *communis* L, encapsulated essential oils against prevalent microorganisms causing sinusitis. Thrita 4(2): e24773.
15. Boukhebti, H., Chaker, A. N., Belhadj, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer, H., Harzallah, D., 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L, and *Mentha spicata* L, essential oils. Der Pharmacia Letter 3(4): 267-275.
16. Padmini, E., Valarmathi, A., Rani, M. U., 2010. Comparative analysis of chemical composition and antibacterial activities of *Mentha spicata* and *Camellia sinensis*. Asian J Exp Biol Sci 1(4): 772-781.