

Investigation the synergistic effects of licorice, garlic and fennel essential oils Microemulsions as natural antioxidant and antibacterial agents

Zahedi, M.¹, Memar Maher, B.^{2*}, Anarjan, N.³ Hamishehkar, H.⁴

1. PHD student of Chemical Engineering, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

2. Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

3. Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

4. Professor of Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding author: b_maher@iau-ahar.ac.ir

(Received: 2021/6/1 Accepted: 2021/8/8)

Abstract

The demand for the use of plant essential oils due to their antimicrobial properties as antioxidants and natural preservatives and flavorings and aromatizers is increasing in the food industry. Therefore, in this study, microemulsions of licorice, garlic and fennel essential oils were successfully prepared alone and in combination. Physical and chemical properties, antioxidant activities, antibacterial activities and synergistic properties of prepared microemulsions were investigated. For this reason, various microemulsions with oily phases consisting of pure licorice, garlic and fennel essential oils and their combination were prepared. Microbial and turbidity results showed that reduced particle size of essential oil in the nanoemulsion range can increase their antibacterial and antioxidant properties using microemulsion systems. In addition, the synergistic effects of essential oil on each other were observed where oil phase microemulsions consisting of two components showed higher antibacterial and antioxidant activity compared to oil phase of one component. Therefore, the work aimed to develop a microemulsion system with two oil phases consisting of licorice, garlic and fennel.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Microemulsion; Essential oil; Licorice; Antioxidant

«مقاله پژوهشی»

DOI:10.30495/JFH.2021.1930403.1315

بررسی اثرات هم‌افزایی میکروامولسیون‌های شیرین‌بیان، سیر و رازیانه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان و ضدباکتری طبیعی

مارال زاهدی^۱، بهناز معمارماهر^{۲*}، نویده انرجان^۳، حامد همیشه‌کار^۴

۱. دانشجوی دکتری مهندسی شیمی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

۲. استادیار گروه مهندسی شیمی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

۳. استادیار گروه مهندسی شیمی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۴. استاد، مرکز تحقیقات کاربردی علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: b_maher@iau-ahar.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۳/۱۱ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۵/)

چکیده

تقاضا برای استفاده از اسانس‌های گیاهان به‌دلیل خاصیت ضد میکروبی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان و ماده نگه‌دارنده طبیعی و طعم‌دهنده و عطردهنده در صنایع غذایی روبه‌افزایش می‌باشد. از این‌رو در این تحقیق، میکروامولسیون‌های اسانس‌های شیرین‌بیان، سیر و سیاه‌دانه به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی با موفقیت تهیه شدند. خاصیت فیزیکی و شیمیایی، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، فعالیت‌های ضدباکتریایی و خاصیت هم‌افزایی میکروامولسیون‌های تهیه شده مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور میکروامولسیون‌های مختلف با فازهای روغنی متشکل از اسانس خالص شیرین‌بیان، سیر و سیاه‌دانه و همچنین ترکیب آن‌ها تهیه گردید. نتایج میکروبی و کدورت نشان داد که کاهش اندازه ذرات اسانس‌ها در محدوده‌ی نانوامولسیونی با استفاده از سامانه‌های میکروامولسیونی می‌تواند ویژگی‌های ضدباکتری و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را افزایش دهد. علاوه بر این، اثرات هم‌افزایی اسانس‌ها نسبت به یکدیگر نیز مشاهده شد که در آن میکروامولسیون‌های فاز روغنی متشکل از دو جزء فعالیت ضدباکتری و آنتی‌اکسیدانی بالاتری را در مقایسه با فاز روغن یک جزء نشان دادند؛ بنابراین هدف از این کار توسعه یک سیستم میکروامولسیون با دو فاز روغن متشکل از شیرین‌بیان، سیر و سیاه‌دانه بود.

واژه‌های کلیدی: میکروامولسیون، اسانس، شیرین‌بیان، آنتی‌اکسیدان

مقدمه

از گذشته تا به امروز، استفاده از اسانس‌های گیاهی یکی از گزینه‌های کارآمد برای افزایش سطح ایمنی بدن بیماران و بهبود بسیاری از بیماری‌های شایع، مطرح بوده است. اسانس‌ها، مخلوطی از ترکیبات فرار مانند اسیدهای چرب زنجیره کوتاه، پلی فنول‌ها، ترپن‌ها و ترپنوئیدها و غیره از قسمت‌های مختلف گیاهان مانند جوانه‌ها، گل‌ها، برگ‌ها و پوست گرفته شده‌اند. آن‌ها باعث بو، طعم و مزه خاص گیاه می‌شوند. اثرات تقویت‌کننده اسانس گیاه مانند فعالیت‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها، توسط تحقیقات مختلف علمی تأیید شده است. علاوه بر این، به دلیل سمیت و عوارض جانبی مواد نگه‌دارنده مواد غذایی مصنوعی، تقاضای زیادی برای اسانس‌های گیاهی به عنوان یک جایگزین مطمئن و مؤثر برای مواد نگهدارنده رایج مصنوعی، در فرمولاسیون نوشیدنی‌ها و مواد آرایشی-بهداشتی وجود دارد (Farshbaf Sadigh *et al.*, 2019). اسانس‌های گیاهان که دارای خاصیت ضد میکروبی بالایی هستند به عنوان آنتی‌اکسیدان و ماده نگه‌دارنده طبیعی و طعم‌دهنده و عطردهنده در صنایع غذایی و به عنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی در صنایع غذایی و صنعت دام به منظور مبارزه در برابر عوامل بیماری‌زا و مسمومیت‌های غذایی خطرناک و تولید محصولات گوشتی سالم و باکیفیت استفاده می‌گردد (Ma *et al.*, 2016). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به طور مؤثر و به طرق مختلف از واکنش رادیکال‌های آزاد به شکل‌های اکسیژن و نیتروژن فعال با بیومولکول‌هایی نظیر پروتئین، آمینواسید، لیپید جلوگیری کرده و منجر به کاهش آسیب و یا مرگ سلولی، بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان‌ها

می‌شوند. در کنار نقش آن‌ها در سامانه‌های زیستی، در مواد غذایی سرشار از چربی‌های غیراشباع نیز از کاهش کیفیت تغذیه‌ای، ایمنی، بدطعمی و بی‌رنگ شدن به علت ایجاد ترکیبات سمی جلوگیری می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌ها به دودسته شیمیایی و طبیعی تقسیم‌بندی می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی که بیشترین استفاده را در صنعت غذا دارند، شامل Tert-Butylated Butylhydroquinone (TBHQ)، Butylated BHA (Butylated hydroxyanisole) و BHT (hydroxytoluene) و پروپیل گالات بوده که سرطان‌زایی و اثرات منفی این ترکیبات بر سلامت انسان مشخص شده است. بنابراین، امروزه استفاده از گروه وسیعی از گیاهان دارویی و ترکیبات آروماتیک آن‌ها به عنوان منابع طبیعی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند، مورد توجه محققین قرار گرفته است. گرچه انحلال‌پذیری کم در آب و ناپایداری و فراریت بالا عملاً سبب شده که استفاده از اسانس‌های گیاهی در صنعت پزشکی محدود شود. در نتیجه، محققان تمرکز خود را بر روی فرمولاسیون مخلوط اسانس‌ها قرار داده‌اند تا کارایی آن‌ها را افزایش دهند و همچنین به منظور افزایش حلالیت در آب، پایداری ساختاری و شیمیایی، اثر بخشی و کاهش دوز مؤثر آن‌ها در میکرومولسیون‌ها ترکیب کنند بنابراین نانوتکنولوژی با ایجاد یک رویکرد جدید و نوین این عامل نامناسب را با افزایش پایداری به خصوص در حضور نور، هوا، دمای بالا و رطوبت برطرف کرده است (Piccaglia *et al.*, 1993). میکرومولسیون‌ها به عنوان سیستم‌های انتقال کلونیدی مورد توجه خاص قرار می‌گیرند زیرا به راحتی می‌توانند از مواد غذایی درجه یک تحت شرایط عملیاتی بسیار ساده مانند اختلاط، برش و

از اسانس سیاه‌دانه به‌طور کلی در داروها و سیستم‌های غذایی استفاده می‌شود. همچنین به‌عنوان ضد میکروب، آنتی‌اکسیدان، ضد سرطان، ضد التهاب، ضد دیابت، تعدیل‌کننده سیستم ایمنی، ضد درد، اسپاسمولیتیک، برونکودیلاتور، محافظت‌کننده کبد، محافظ کلیه، محافظ دستگاه گوارش و غیره استفاده شده است. ترکیب اصلی اسانس سیاه‌دانه، تیموکینون است (Ahmad et al., 2013). به‌نظر می‌رسد که هم‌افزایی می‌تواند بین اسانس شیرین‌بیان، سیر و سیاه‌دانه مشاهده شود و ترکیب آن‌ها در غلظت‌های مشابه در مقایسه با استفاده از آن‌ها به‌طور جداگانه، فعالیت‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری داشته باشد؛ بنابراین هدف از این مطالعه تهیه میکروامولسیون‌ها با ترکیبات یکتایی و دوگانه اسانس‌های شیرین‌بیان، سیر و سیاه‌دانه به‌عنوان فاز روغن به‌منظور تهیه یک نگه‌دارنده مواد غذایی طبیعی با بالاترین فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، کوچک‌ترین اندازه ذره، توزیع اندازه ذرات و کدورت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

اسانس شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra, Iran*) و اسانس سیاه‌دانه (*Nigella sativa L, Iran*) به مقدار لازم از شرکت ناجیان تهیه گردیدند. اسانس سیر (*Garlic, Iran*) از طرف شرکت ماگنولیا اهدا گردید. ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریلیدرازیل (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) (DPPH) (Merck, Germany)، سورفاکتانت‌های غیر یونی تووین ۸۰ (Tween 80) و گلیسرول از (Merck, Germany) خریداری شدند. آب مقطر (Dr. Mojallali, Iran) توسط شرکت دکتر مجللی تأمین شد.

همگن‌سازی ساخته شوند. میکروامولسیون‌ها، سیستم‌هایی از نظر ترمودینامیکی ناپایدار اما از نظر سینتیکی پایدار هستند که به‌طور معمول از روغن، سورفاکتانت (گاهی اوقات مواد سورفاکتانت / حلال مشترک) و آب تشکیل می‌شود. این سیستم‌ها دارای اندازه ذرات کوچک (>۵۰۰ نانومتر) با وضوح شفاف و نیمه شفاف یا فقط کمی کدر هستند.

سال‌هاست که گلیسیرینزا گلابرا (*Glycyrrhiza glabra*)، معروف به شیرین‌بیان، به‌عنوان یک ماده طعم‌دهنده در ساخت داروها و مواد غذایی استفاده می‌شود. این ماده حاوی فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، گلیسیریزین، اسید گلیسیرنیتیک، کالکون‌ها و غیره است. از عصاره شیرین‌بیان یا اسانس روغنی آن برای درمان فشارخون، سرفه، بروشیت، آسم، زخم، التهاب و صرع استفاده شده است. همچنین می‌تواند به‌عنوان ماده شیرین‌کننده به‌منظور پوشش دادن طعم‌های نامطبوع سایر مواد غذایی و خواص تقویت‌کننده ارگانولپتیک در انواع مواد غذایی، نوشیدنی‌ها و ترکیبات آرایشی مورد استفاده قرار گیرد (Wittschier, et al., 2009).

سیر دارای فعالیت ضد میکروبی علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها و قارچ‌ها است. این ماده برای درمان سرماخوردگی، سرفه، سل، فشارخون پایین، اختلالات عروقی، سرطان‌ها و غیره استفاده می‌شود. این ماده در غذاها به‌عنوان طعم‌دهنده یا کمک به هضم غذا استفاده می‌شود. اجزای اصلی اسانس سیر، پلی سولفیدهای آلایل هستند، مانند دی‌آلفل سولفید، دیال‌دی سولفید، آلایل متیل تری سولفید، دی‌آلیل تری سولفید، آلایل متیل دی سولفید و ... (Satyal et al., 2017).

-آماده‌سازی میکرومولسیون‌ها

میکرومولسیون‌های اسانس با استفاده از تکنیک کم انرژی خودبه‌خودی تهیه شد. توئین ۸۰ (۱۵ درصد) ابتدا با گلیسرول (۶ درصد) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه با سرعت چرخش ۵۰۰ دور در دقیقه به صورت مغناطیسی (IKA Plate, RCT digital, Deutschland, Germany) هم‌زده شد. سپس اسانس‌ها (با نسبت‌های مختلف، مطابق جدول (۱) و غلظت کلی ۱ درصد وزنی بر وزن) به

مخلوط توئین ۸۰ و گلیسرول اضافه‌شده و به مدت ۱۵ دقیقه به وسیله هم‌زن مغناطیسی هم‌زده شدند. این مخلوط به صورت قطره‌قطره به حجم معینی از آب مقطر (۷۸ درصد) اضافه شد که در حمام آب در دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داشت، در زیر هم‌زن مغناطیسی قرار گرفت تا ظاهر شفاف همگن داشته باشد. این مخلوط پس از ۱ روز در دمای اتاق از سیستم نیمه‌شفاف به سیستم کاملاً شفاف تبدیل شد (Anarjan, 2012).

جدول (۱) - ترکیب درصد اسانس‌های انتخاب‌شده در فاز روغنی میکرومولسیون‌های اسانسی تهیه‌شده

تیمارها	وزن اسانس شیرین بیان (گرم)	درصد اسانس شیرین بیان (وزنی/وزنی)	وزن اسانس سیر (گرم)	درصد اسانس سیر (وزنی/وزنی)	وزن اسانس سیاه‌دانه (گرم)	درصد اسانس سیاه‌دانه (وزنی/وزنی)
تیمار ۱	۰/۳	۱۰۰	۰	۰	۰	۰
تیمار ۲	۰	۰	۰/۳	۱۰۰	۰	۰
تیمار ۳	۰	۰	۰	۰	۰/۳	۱۰۰
تیمار ۴	۰	۰	۰/۱۵	۵۰	۰/۱۵	۵۰
تیمار ۵	۰/۱۵	۵۰	۰/۱۵	۵۰	۰	۰
تیمار ۶	۰/۱۵	۵۰	۰	۰	۰/۱۵	۵۰

- تعیین اندازه قطرات میکرومولسیون‌ها

برای اندازه‌گیری اندازه ذرات و توزیع آن‌ها از دستگاه اندازه‌گیری اندازه ذرات (Microtrac, Japan) استفاده شد. این دستگاه بر اساس پراکنش نور پویا کار می‌کند. اندازه‌گیری‌ها بر روی تیمارها یک‌شب پس از نگهداری آن‌ها انجام شد (Anarjan and Tan, 2013).

- بررسی پایداری امولسیون‌های تهیه‌شده

میزان جذب تمامی تیمارها در طول موج ۶۰۰ نانومتر که بیانگر کدورت آن‌هاست، با استفاده از اسپکتروفتومتر

UV-visible به مدت دو هفته اندازه گرفته شد (PIT320, Iran). قبل از اندازه‌گیری تیمارها از غلظت صفر (آب مقطر به عنوان شاهد) تا ۰/۱ درصد با آب مقطر رقیق شدند. برای بررسی پایداری تیمارها، بعد از ۴۰ روز نگهداری، کدورت تیمارها اندازه‌گیری شد. تیمارها بعد از ۴۰ روز شفاف و پایدار بودند (Anarjan and Tan, 2013).

- بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی

به منظور اندازه‌گیری خواص آنتی‌اکسیدانی تیمارها با دستگاه اسپکتروفتومتر محلول DPPH (۰/۱ mm) با حل کردن ۳/۹ میلی‌گرم DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول تهیه شد. محلول برای تکمیل واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در

تاریکی نگه‌داشته شد. ۲ میلی‌لیتر از تیمار با ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH مخلوط شد. این محلول به شدت تکان داده شده و در تاریکی انکوبه شد. ۳۰ دقیقه بعد جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Crespo et al., 2019).

$$100\% \left(\frac{\text{جذب blank}}{\text{جذب Sample}} - 1 \right) = \text{خواص بازدارندگی رادیکال}$$

به این ترتیب که (blank جذب)، جذب محلول DPPH قبل از واکنش می‌باشد و (Sample جذب)، جذب پس از واکنش می‌باشد.

- بررسی خاصیت میکروبی

- روش انتشار دیسک (diffusion-disk)

باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (S. aureus, PTCC 1431) و باکتری گرم منفی اشریشیاکلی (E. coli, PTCC 1276) در آنالیز میکروبی در آزمایشگاه مورد استفاده قرار گرفتند. باکتری‌های ذکر شده در محیط کشت آگار نوترینت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و در مدت زمان ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس ۴ تا ۵ پرگنه خالص به یک لوله آزمایش محتوی ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی سترون انتقال داده و به خوبی تکان داده شد. در مرحله بعد، کدورت لوله آزمایش حاوی باکتریها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (در طول موج ۶۲۵ nm)، به کدورت محلول استاندارد نیم مک فارلند 10^8 *۱/۵ (cfu) رسانده شد. سپس یک سوپ سترون را با محتویات لوله آغشته کرده و روی آگار نوترینت سترون موجود در پلیت به طور یکنواخت و در جهات مختلف کشت داده شد. دیسک‌ها در میکرومولسیونهای تهیه شده، یا شاهد‌ها (کلرامفنیکل و دی متیل سولفوکسید)

کاملاً غوطه ور شدند، سپس در انکوباتور ۳۰ درجه خشک شده و روی پلیت‌های حاوی باکتریهای کشت داده شده، قرار گرفتند. بعد از گرمخانه گذاری پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس، طول ناحیه شفاف اطراف دیسک‌ها یا همان قطره‌اله عدم رشد اندازه‌گیری شده و بعنوان فعالیت ضدباکتری نمونه‌ها گزارش شدند (Fratini et al., 2019). در این آنالیزها از دی متیل سولفوکسید (Dimethylsulphoxide, DMSO) برای کنترل منفی و از کلرامفنیکل (Chloramphenicol) برای کنترل مثبت جهت تعیین حساسیت مورد استفاده قرار گرفت.

- بررسی مورفولوژی

برای تجسم میکرومولسیون‌های تیمار، تیماری تازه با رنگ زرد با نسبت ۶۰:۱ (وزنی / وزنی) رنگ آمیزی شد. یک قطره از تیمار دارای غلظت مناسب روی گرید مسی قرار داده شد و اجازه داده شد تا ذرات روی گرید قرار بگیرند سپس اضافات تیمار برداشته شد و با یک لغزش در آن پوشانده شد تا اطمینان حاصل شود که هیچ حبابی بین تیمار و پوشش قرار ندارد. مورفولوژی قطرات روغن در میکرومولسیون‌ها با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM, Zeiss LEO 906E, 100 kw, Germany)

یافته‌ها

- خصوصیات میکرومولسیون اسانس

متوسط اندازه ذرات تمام میکرومولسیون‌های اسانس ذرات میکرومولسیون شیرین بیان از میکرومولسیون‌های سیاه‌دانه یا سیر کوچک‌تر است. لذا با استفاده از مخلوط دوگانه از اسانس‌های سیر - سیاه‌دانه در فاز آلی می‌توان میکرومولسیون‌های کوچک‌تر ایجاد کرد. علاوه بر این، می‌توان کوچک‌ترین میکرومولسیون را با استفاده از اسانس شیرین بیان به صورت مجزا به عنوان فاز آلی تولید کرد. از بین میکرومولسیون‌های اسانس‌های خالص تهیه‌شده نیز توزیع اندازه ذرات میکرومولسیون اسانس شیرین بیان کمترین و اسانس سیاه‌دانه بزرگ‌ترین توزیع اندازه ذرات را دارا می‌باشند. با توجه به اینکه توزیع اندازه ذرات میکرومولسیون‌های مخلوط دوگانه اسانس شیرین بیان و سیر از همه تیمارهای امولسیون‌های دوتایی و خالص دیگر کمتر است، می‌توان نتیجه گرفت که این تیمار همگن‌ترین تیمار از نظر اندازه ذرات می‌باشد (جدول ۲).

مشاهده شد. میکرومولسیون‌ها ۱۰ بار رقیق شدند و قطره‌ای از محلول رقیق‌شده به یک شبکه مسی قرار داده شد. این شبکه به مدت ۲ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگه‌داشته شد. یک قطره اورانیل استات ۵/۱ درصد به عنوان یک عامل رنگ‌آمیزی منفی به شبکه گذاشته شد و بعد از زمان کوتاه اضافات رنگ را هم از روی گرید برداشته و اجازه داده شد گرید رنگ‌آمیزی شده در دمای آزمایشگاه خشک شود و در نهایت تیمار آماده شد تا با میکروسکوپ الکترونی عبوری تصویربرداری شود (François Muller et al., 2015).

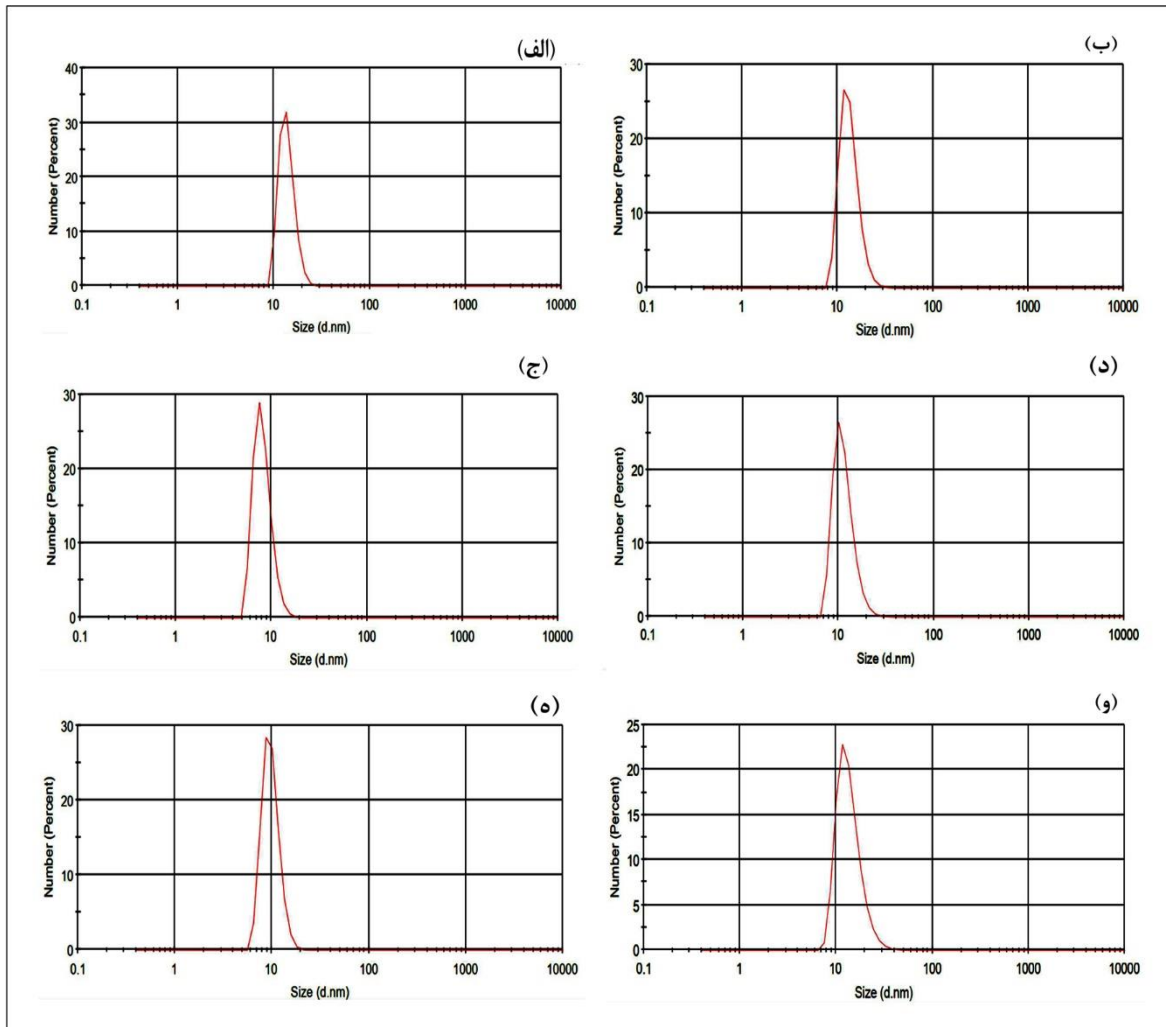
- طرح آماری

آنالیز آماری آزمایشات امولسیون‌ها در این تحقیق به وسیله آنالیز آماری One-Way ANOVA با استفاده از نرم‌افزار Minitab inc, PA, USA به دست آمد. همه آزمایشات و اندازه‌گیری‌ها با سه بار تکرار انجام شدند.

جدول ۲- ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی میکرومولسیون‌های اسانسی تهیه‌شده

تیمار	اندازه ذره (نانومتر)	توزیع اندازه ذرات	کدورت	درصد بازدارندگی (درصد)
تیمار ۱ (اسانس شیرین بیان)	۱۲/۶۳±۲/۳۱۳ ^a	۰/۳۳۶±۰/۰۲۷۳ ^b	۰/۳۰۰±۰/۰۱۵۶ ^a	۶۴/۵۴±۰/۷۴ ^a
تیمار ۲ (اسانس سیر)	۴۴/۹۲±۴/۲۰۱ ^d	۰/۷۹۴±۰/۰۳۴۹ ^e	۰/۲۳۴±۰/۰۱۹ ^b	۶۱/۶۴±۱/۳۷ ^a
تیمار ۳ (اسانس سیاه‌دانه)	۹۵/۶۹±۶/۱۹۲ ^f	۱±۰/۰۴۹۰ ^f	۰/۶۲۹±۰/۰۳۷۱ ^d	۶۱/۹۰±۱/۸۹ ^a
تیمار ۴ (مخلوط اسانس سیر و سیاه‌دانه)	۳۷/۳۳±۳/۸۷۲ ^c	۰/۴۸۵±۰/۰۱۶۱ ^d	۰/۳۷۲±۰/۰۲۹۵ ^c	۷۰/۳۴±۰/۲۰۱ ^b
تیمار ۵ (مخلوط اسانس شیرین بیان و سیر)	۷۰/۶۴±۴/۷۹۳ ^e	۰/۱۵۱±۰/۰۰۴۱ ^a	۰/۰۵۱±۰/۰۰۴۵ ^a	۷۱/۹۴±۰/۲۱۶ ^b
تیمار ۶ (مخلوط اسانس شیرین بیان و سیاه‌دانه)	۲۱/۶۲±۲/۰۳۷ ^b	۰/۳۹۵±۰/۰۲۹۹ ^c	۰/۰۵۵±۰/۰۰۷۹ ^a	۷۲/۱۲±۱/۳۱۸ ^b

a-f: حروف متفاوت در هر ستون بیانگر تفاوت معنادار بین مقادیر متغیر پاسخ می‌باشد (p ≤ 0.05).



شکل ۱- توزیع اندازه ذرات میکرومولسیون‌های اسانس سیاه‌دانه (الف) - اسانس سیر (ب) - اسانس شیرین بیان (ج) - اسانس شیرین بیان - سیاه‌دانه (د) - اسانس شیرین بیان - سیر (ه) - اسانس سیر - سیاه‌دانه (و)

تحقیق حاصل مشخص کرد که کدورت میکرومولسیون‌های ترکیبی کمتر از میکرومولسیون‌ها با فاز روغنی خالص می‌باشد. کدورت میکرومولسیونهای مخلوط اسانس‌های شیرین بیان-سیر و شیرین بیان-سیاه‌دانه از بقیه تیمارها کمتر بوده است. از بین میکرومولسیون‌های تهیه شده، میکرومولسیون اسانس خالص سیاه‌دانه از سایر تیمارها بیشتر بوده است.

کدورت میکرومولسیون‌ها شاخص خوبی برای اندازه یا پایداری فیزیکی آنهاست، به طوری که تیمارهای دارای کدورت کمتر، عموماً اندازه ذرات ریزتر و پایداری فیزیکی بالاتری دارا می‌باشند. کدورت میکرومولسیون اسانس‌های خالص و ترکیبی حاصل در این تحقیق بین ۰/۰۵۱ و ۰/۶۲۹ تغییر یافته است (جدول ۲). لذا پایداری فیزیکی تیمارها به شدت باهم متفاوت می‌باشند. نتایج

برای بقیه تیمارها کاهش یافته است با توجه به اینکه کدورت اکثر نمونه‌ها با گذشت زمان تغییر قابل توجهی نکرده است، می‌توان نتیجه گرفت که میانگین اندازه ذرات فاز پراکنده در طول مدت نگهداری تقریباً ثابت بوده و نمونه‌ها پایداری فیزیکی قابل قبولی داشته‌اند.

کدورت تیمارها نیز که شاخص پایداری آن‌ها می‌باشد هم برای تیمارهای تازه و هم تیمارهای نگهداری شده اندازه‌گیری شده و نتایج در جدول (۳) ثبت شدند. نتایج نشان می‌دهد که کدورت تیمارها تا روز دهم نگهداری ثابت مانده و بعد از آن تا روز چهارم به جز تیمار دوم،

جدول (۳) - میزان کدورت تیمارها در طول ۴۰ روز

تیمار / روز	روز دوم	روز پنجم	روز دهم	روز بیستم	روز سی‌ام	روز چهارم
تیمار ۱ (اسانس شیرین بیان)	۰/۳۰۰±۰/۱ ^a	۰/۲۹۸±۰/۰۹ ^a	۰/۲۷۵±۰/۱۲ ^a	۰/۲۵۱±۰/۰۶ ^b	۰/۲۳۹±۰/۰۵ ^b	۰/۲۲۰±۰/۰۳ ^b
تیمار ۲ (اسانس سیر)	۰/۲۳۴±۰/۰۳ ^a	۰/۲۳۴±۰/۰۱ ^a	۰/۲۲۴±۰/۰۱ ^a	۰/۳۱۵±۰/۱۰ ^b	۰/۳۱۹±۰/۱۵ ^b	۰/۳۲۷±۰/۱ ^b
تیمار ۳ (اسانس سیاه‌دانه)	۰/۶۲۹±۰/۱ ^a	۰/۶۲۵±۰/۱ ^a	۰/۶۲۱±۰/۱۹ ^a	۰/۶۰۹±۰/۱۸ ^a	۰/۵۷۸±۰/۱ ^b	۰/۵۱۵±۰/۱ ^b
تیمار ۴ (مخلوط اسانس سیر و سیاه‌دانه)	۰/۳۷۲±۰/۱ ^a	۰/۳۵۹±۰/۱۶ ^a	۰/۲۷۲±۰/۰۳ ^{۱a}	۰/۲۳۵±۰/۱ ^a	۰/۱۸۰±۰/۱ ^b	۰/۱۵۰±۰/۱ ^b
تیمار ۵ (مخلوط اسانس شیرین بیان و سیر)	۰/۰۵۱±۰/۰۰۳ ^a	۰/۰۵۰±۰/۰۰۱ ^a	۰/۰۴۳±۰/۰۰۲ ^a	۰/۰۲۳±۰/۰۰۱ ^b	۰/۰۲۰±۰/۰۰۳ ^b	۰/۰۱±۰/۰۰۲ ^c
تیمار ۶ (مخلوط اسانس شیرین بیان و سیاه‌دانه)	۰/۰۵۵±۰/۰۰۱ ^a	۰/۰۴۳±۰/۰۰۶ ^a	۰/۰۴۱±۰/۰۰۱ ^a	۰/۰۲۶±۰/۰۰۱ ^b	۰/۰۱۵±۰/۰۰۰۳ ^c	۰/۰۰۹±۰/۰۰۰۲ ^{۱d}

a-d: حروف متفاوت در هر ردیف، بیانگر اختلاف معنادار مقادیر متغیر پاسخ می‌باشد (p≤0.05).

فعالیت ضدباکتریایی میکروامولسیون‌های تولیدشده در برابر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (*S. aureus*) و باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* (*E. coli*)، ارزیابی شدند. فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌ها در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* به صورت ماکرو و میکروامولسیون (مجزا یا مخلوط) در جدول ۴ نشان داده شده است. فعالیت ضد باکتریایی مخلوط شیرین بیان-سیاه‌دانه و سیر-سیاه‌دانه نسبت به مخلوط شیرین بیان-سیر ناچیز بود. مشابه فعالیت آنتی‌اکسیدانی، اثر ضد باکتریایی تیمارها به دلیل هم‌افزایی، افزایش یافته است. نتایج نشان داد که کاهش اندازه ذرات اسانس‌ها و همچنین ترکیب آن‌ها در فرمولاسیون می‌تواند فعالیت

انتظار بر آن است که تمام اسانس‌های منتخب به دلیل داشتن ترکیبات فعال فنلی و فلاونوئید دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در مقیاس‌های ماکرو و نانو باشند؛ بنابراین، فعالیت‌های مهارکننده رادیکال DPPH با نسبت اسانس در میکروامولسیون‌ها برای تعیین اثرات هم‌افزایی یا هم‌کاهشی (Antagonistic) نسبت به یکدیگر مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت‌های مهارکننده رادیکال DPPH میکروامولسیون‌های تهیه‌شده برای میکروامولسیون‌های اسانس‌های خالص معنی‌دار نبوده و کمتر از تیمارهای میکروامولسیونی با فاز آلی ترکیبی بود. اثر آنتی‌اکسیدانی تیمارهای با فاز آلی برابر نیز دارای تفاوت معناداری از هم نبودند (جدول ۲).

ضد باکتریایی آن‌ها را، در برابر باکتری‌های گرم مثبت یا گرم منفی، به میزان قابل توجهی افزایش دهند. نتایج نشان داد که کاهش اندازه ذرات اسانس‌ها و همچنین ترکیب آن‌ها در فرمولاسیون می‌تواند فعالیت‌های ضدباکتریایی آن‌ها را در برابر باکتری‌های گرم مثبت یا گرم منفی، به میزان قابل توجهی افزایش دهند.

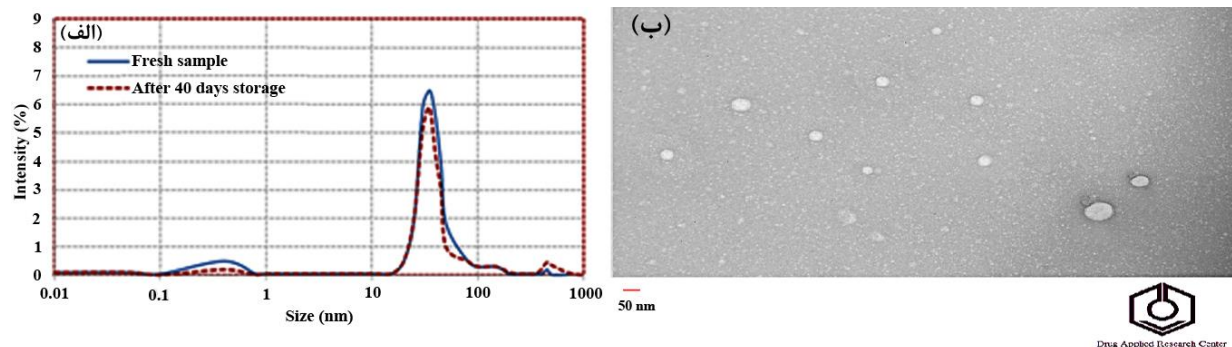
جدول ۴- میانگین (انحراف معیار \pm) قطر هاله عدم رشد در اطراف میکروامولسیون‌های اسانس تولیدشده برحسب میلی‌متر

اثرشیاکلی	فرمولاسیون تیمارها	استانفیلوکوکوس اورئوس
۵±۰/۱۲۹ ^a	اسانس شیرین بیان	۶±۰/۳۰۲ ^a
۶±۰/۶۲۵ ^a	اسانس سیر	۷±۰/۳۸۲ ^a
۳±۰/۳۰۸ ^b	اسانس سیاه‌دانه	۵±۰/۲۹۴ ^a
۹±۰/۹۴۳ ^c	میکروامولسیون اسانس شیرین بیان	۱۱±۰/۶۰۶ ^b
۱۰±۰/۴۲۹ ^c	میکروامولسیون اسانس سیر	۱۳±۰/۶۹۱ ^b
۷±۰/۳۶۴ ^c	میکروامولسیون اسانس سیاه‌دانه	۹±۰/۴۲۸ ^c
۷±۰/۹۰۸ ^c	مخلوط اسانس شیرین بیان- سیر	۹±۰/۴۳۲ ^c
۳±۰/۱۱۵ ^b	مخلوط اسانس شیرین بیان- سیاه‌دانه	۵±۰/۲۸۳ ^a
۵±۰/۲۶۷ ^a	مخلوط اسانس سیر- سیاه‌دانه	۶±۰/۳۱۷ ^a
۱۲±۰/۳۰۹ ^d	مخلوط میکروامولسیون اسانس شیرین بیان- سیر	۱۵±۰/۶۰۶ ^d
۹±۰/۲۱۶ ^c	مخلوط میکروامولسیون اسانس شیرین بیان- سیاه‌دانه	۱۱±۰/۶۱۹ ^b
۹±۰/۵۲۹ ^c	مخلوط میکروامولسیون اسانس سیر- سیاه‌دانه	۱۱±۰/۶۰۲ ^b

a-d: حروف متفاوت در هر ستون بیانگر تفاوت معنادار بین مقادیر متغیر پاسخ می‌باشد ($p \leq 0.05$).

حاصل از تجزیه و تحلیل اندازه ذرات با استفاده از تئوری‌های پراکندگی نور کاملاً همگن با اندازه‌های نسبتاً مشابه کمتر از ۵۰ نانومتر (تقریباً ۳۵ نانومتر) است. شکل TEM، میانگین اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات حاصل از آنالیز DLS را تأیید می‌کند.

مورفولوژی میکروامولسیون با نسبت اسانس‌ها در فاز آلی (۵۰٪ شیرین بیان و ۵۰٪ سیاه‌دانه)، به عنوان نمونه‌ای که به طور کلی دارای مطلوب‌ترین خواص است، با استفاده از روش میکروسکوپ الکترونی (TEM) تعیین گردید (شکل ۲- ب). قطرات از نظر مورفولوژی نسبتاً کروی شکل بودند. میکروامولسیون‌های تهیه شده مطابق با نتایج



شکل (۲-الف): توزیع اندازه ذره تیمار حاوی ۵۰ درصد شیرین بیان و ۵۰ درصد سیاه‌دانه (تازه و پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای $1 \pm 5^\circ\text{C}$).
 شکل (۲-ب): تصویر TEM از میکروامولسیون تیمار ششم تازه: (۵۰ درصد شیرین بیان و ۵۰ درصد سیاه‌دانه).

بحث و نتیجه‌گیری

اسانس سیر نسبت به اسانس شیرین بیان و سیاه‌دانه قطبیت کمتری دارد. بنابراین، به نظر می‌رسد که شکسته شدن ذرات اسانس سیر یا کاهش اندازه آن‌ها به محدوده میکروامولسیون دشوارتر از دو اسانس دیگر باشد (Weiss and Muschiolik, 2007). از آنجاکه توزیع اندازه ذرات تیمارها با پایداری میکروامولسیون‌های تازه شکسته شده تعیین می‌شود، توزیع اندازه ذرات سیستم‌ها در صورت عدم وجود پدیده‌های ناپایدار کاهش می‌یابد (Weiss and Muschiolik, 2007). ویسکوزیته اسانس‌ها در اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات میکروامولسیون‌ها نیز نقش مهمی دارند. اندازه بزرگ میکروامولسیون‌های اسانس سیاه‌دانه نیز می‌تواند با ویسکوزیته بالای آن (داده‌های منتشر نشده) در مقایسه با اسانس‌های سیر و شیرین بیان مرتبط باشد (Anarjan, 2014).

شفافیت میکروامولسیون‌ها شاخص خوبی برای اندازه یا پایداری فیزیکی آن‌هاست، بدان معنی که سیستم‌های با کدورت کم‌تر، معمولاً دارای سیستم‌های میکروامولسیون کوچک‌تر و پایدارتر هستند. تحقیقات قبلی نتیجه گرفته‌اند که سیستم‌های پراکنده با شفافیت

با توجه به این که اندازه تمامی میکروامولسیون تولیدی کمتر از ۱۰۰ نانومتر می‌باشد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که روش میکروامولسیون یک تکنیک کارآمد برای کاهش اندازه اسانس در محدوده نانو در مقیاس مطلوب است. نسبت فاز آلی بر توزیع اندازه ذرات میکروامولسیون‌های تولیدشده به‌طور قابل توجهی تأثیر می‌گذارد. در تحقیقات گذشته ترکیبات مختلف در هر اسانس مشخص شده است. به‌طور کلی، اسانس شیرین بیان از ترکیب آنتول، اتر آروماتیک غیراشباع و گلیسیریزین با ساختار ساپونین تشکیل شده است. اسانس سیر بیشتر شامل ترکیبات مختلف آلی سولفید و اسانس سیاه‌دانه شامل اتر آروماتیک غیراشباع و کتون آروماتیک اشباع نشده می‌باشد (Mnayer et Shahat et al., 2011a; al., 2014b). بنابراین، با توجه به فعالیت سطحی جزئی اسانس شیرین بیان، این ماده می‌تواند بازده امولسیون کنندگی امولسیفایر مورد استفاده را افزایش دهد و بنابراین، کاهش اندازه و تثبیت میکروامولسیون به‌طور مؤثرتری اتفاق می‌افتد (Anarjan and Tan, 2013).

خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون‌ها افزایش پیدا می‌کند (Sacchetti *et al.*, 2005). علاوه بر این، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آن‌ها هنگام استفاده باهم افزایش می‌یابد. بدین معنی که اثر هم‌افزایی بر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها هنگام استفاده از آن‌ها به صورت ترکیبی مشاهده می‌شود.

نتایج نشان داد که برهمکنش دوگانه سیر و سیاه‌دانه در تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیمارها ناچیز است. نتایج این فرضیه را تأیید می‌کند که اثر هم‌افزایی بر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها هنگام استفاده از آن‌ها به صورت ترکیبی افزایش می‌یابد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که میکروامولسیون‌ها با فاز آلی منفرد دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی کمتری نسبت به میکروامولسیون‌هایی که دارای فازهای آلی دوگانه هستند می‌باشند. بنابراین، مخلوط اسانس‌ها می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را به میزان قابل توجهی افزایش دهند. برخلاف نتایج مطالعات قبلی که ارتباط معکوسی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی میکروامولسیون و میانگین اندازه ذرات آن‌ها وجود دارد، در مطالعه فعلی هیچ وابستگی قابل توجهی مشاهده نشد. اما افزایش قابل توجهی در فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی تیمارها مشاهده شد. این نتایج مطابق با مطالعات قبلی در مورد فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی مخلوط اسانس می‌باشد (Crespo *et al.*, 2019).

فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های روغنی به یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های این روغن‌ها یعنی آب‌گریزی آن‌ها و نیز نفوذپذیر بودن و فرایندهای ناشی از ترکیبات آن‌ها مربوط می‌شود. میکروامولسیون‌ها به دلیل ساختار شیمیایی فاز آلی فعالیت ضد میکروبی دارند. گزارش شده

کم‌تر به دلیل اندازه ذرات کوچک‌تر و همگن‌تر، در برابر پدیده‌های استوالد پایدارتر هستند (Anarjan, 2012). استفاده از ترکیب‌های دوگانه باعث ایجاد کدورت کمتری و به تبع آن، باعث تولید میکروامولسیون‌های پایدارتر می‌شود. به طور غیرمنتظره میکروامولسیون‌های حاوی یک اسانس نسبت به میکروامولسیون‌های دارای دو اسانس کدورت بیشتری داشتند. علیرغم تحقیقات قبلی که بین میانگین اندازه ذرات و کدورت میکروامولسیون‌ها رابطه وجود دارد، در مطالعه حاضر هیچ ارتباطی بین اندازه و کدورت تیمارها مشاهده نشده است. این مشاهدات می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات فعال سطحی مربوط به اسانس و ایجاد احتمال کف در طول دوره آماده‌سازی تیمار باشد (Anarjan and Moradi, 2019).

غلظت مواد و رهایش ماده فعال از سیستم کپسوله مهم‌ترین عوامل مؤثر روی ویژگی‌های آنتی-اکسیدانی آن‌ها می‌باشد. از آنجایی که امولسیفایر با کاهش کشش سطحی و میزان انرژی مورد نیاز برای احاطه کردن نانو ذرات و ممانعت کردن از به هم چسبیدن آن‌ها و تبدیل آن‌ها به ذرات با سایز کوچک‌تر، نقش مهمی را در کاهش اندازه‌ی ذرات، رهایش آسان آن‌ها و افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کند و کاهش اندازه ذرات در اثر افزایش سرعت اختلاط (افزایش دور هم‌زن) و افزایش حلال زدایی (افزایش دور هم‌زن) می‌تواند موجب کاهش اندازه ذرات و در نتیجه آن افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی گردد. همان‌گونه که در یافته‌های مطالعه‌ای بر روی مقایسه و بررسی تأثیر خاصیت آنتی-اکسیدانی یازده تیمار از اسانس‌های روغنی در صنعت غذایی انجام گرفت، معلوم شد که با افزایش ماندگاری و پایداری ماده‌ی اصلی که همان اسانس‌های روغنی گیاهی می‌باشد،

است که فعالیت ضد باکتریایی اسانس، مربوط به ترکیبات فنلی، الکلی، کتون و اتر آنهاست که بیشتر در ساختار اسانس‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. بنابراین، می‌توان هم‌افزایی مشاهده‌شده در عملکرد ضدباکتریایی اسانس‌ها را توضیح داد (Fratini et al., 2019).

در حالت کلی تأثیر اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آنها بر روی باکتری‌های گرم مثبت، قدری بیشتر از تأثیر آنها بر روی باکتری‌های گرم منفی است. به عبارت دیگر گرم مثبت‌ها، نسبت به اثر ضد میکروبی اسانس‌ها حساسیت بیشتری نشان دادند. دلیل حساسیت بالای باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی می‌تواند به علت عدم وجود دیواره سلولی لیپوپلی ساکاریدی باشد که این دیواره در باکتری‌های گرم منفی می‌تواند از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری به عمل آورد. به دلیل وجود غشاهای خارجی احاطه‌کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی منطقی به نظر می‌رسد که این باکتری‌ها در برابر اثرات ضد باکتریایی اسانس‌ها و ترکیبات آنها حساسیت کمتری از خود نشان دهند. غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی، انتشار مواد چربی دوست از میان لایه پوشاننده لیپوپلی ساکاریدی را محدود می‌کند. در باکتری‌های گرم مثبت، تماس مستقیم ترکیبات هیدروفوبی اسانس‌ها، با این فسفولیپید دولایه‌ای صورت می‌گیرد. این محل تماس جایی است که این ترکیبات اثر خود را بر جای می‌گذارند. این اثر به صورت افزایش نفوذپذیری یون‌ها و یا با نشت ترکیبات حیاتی سلول رخ می‌دهد. تعداد مطالعات انجام‌شده در مورد مکانیسم عملکردی اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آنها روزبه‌روز در حال گسترش است. با این اوصاف، با توجه به تعداد زیاد مطالعات انجام‌شده،

تفاوت‌های زیادی در مورد عامل ضد میکروبی این اسانس‌ها و ترکیبات آنها مشاهده می‌شود. ضد میکروبی بودن اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آنها عامل بسیار مهم در تعیین بیماری‌زدایی این ترکیبات در مقابل پاتوژن‌ها در برنامه غذایی می‌تواند باشد و همچنین در بافت زنده و یا در روند عفونت می‌تواند اختلال ایجاد کند (Mirhosseini et al., 2009).

در این تحقیق، میکرومولسیون‌های اسانس به صورت مجزا و ترکیبی با موفقیت تقریباً از ۱۲ تا ۹۵ نانومتر با استفاده از توین ۸۰ به عنوان سورفکتانت و گلیسرول به عنوان کوسورفکتانت تهیه گردید. خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی تمام میکرومولسیون‌ها در شرایط آزمایشگاهی از طریق کاهش اندازه ذرات آنها در محدوده نانو افزایش یافت. علاوه بر این، اثرات هم‌افزایی اسانس‌ها نسبت به یکدیگر نیز مشاهده شد که در آن میکرومولسیون‌های فاز روغنی متشکل از دو جزء فعالیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی بالاتری را در مقایسه با فاز روغن یک جزء نشان دادند. میکرومولسیون‌های تهیه‌شده در طول ۱۰ روز ذخیره‌سازی در دمای 1 ± 5 درجه سلسیوس از پایداری فیزیکی عالی و تا ۴۰ روز از پایداری فیزیکی قابل قبولی برخوردار بودند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آزمایشگاه مرکز تحقیقات کاربردی دارویی علوم پزشکی تبریز که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند صمیمانه تشکر می‌نماییم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافع برای اعلام

ندارند.

منابع

- Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Alam Khan, S., Najmi, A.K., Siddique, N.A. *et al.*, (2013). A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific journal of Tropical biomedicine*, 3(5): 337-352.
- Anarjan, N., Jaber, N., Yeganeh-Zare, S., Banafshehchin, E., Rahimirad, A., Jafarizadeh-Malmiri, H. (2014). Optimization of mixing parameters for *α-tocopherol* nanodispersions prepared using solvent displacement method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(8): 1397-1405.
- Anarjan, N., Tan, C.P. (2013). Developing a three component stabilizer system for producing *astaxanthin* nanodispersions. *Food Hydrocolloids*, 30(1): 437-447.
- Anarjan, N., Tan, C.P., Nehdi, I.A and Ling, T.C. (2012). Colloidal *astaxanthin*: Preparation, characterisation and bioavailability evaluation. *Food chemistry*, 135(3): 1303-1309.
- Crespo, Y.A., Sánchez, L.R.B., Quintana, Y.G., Cabrera, A.S.T., Del Sol, A.B., Mayancha, D.M.G. (2019). Evaluation of the synergistic effects of antioxidant activity on mixtures of the essential oil from *Apium graveolens L.*, *Thymus vulgaris L.* and *Coriandrum sativum L.* using simplex-lattice design. *Heliyon*, 5(6): p.e01942.
- Farshbaf Sadigh, A., Jafarizadeh Malmiri, H., Anarjan, A and Najian, Y. (2019). Preparation of *Ginger Oil* in Water Nanoemulsion Using Phase Inversion Composition Technique: Effects of Stirring and Water Addition Rates on their Physico- Chemical Properties and Stability. *Zeitschrift fur Physikalische Chemie*,.
- François Muller., Thibault Dégoussée., Jénil Degrouard., Annie Brûlet., Anniina Salonen. (2015). Probing structure in submicronic aqueous assemblies of emulsified microemulsions and charged spherical colloids using SANS and cryo-TEM. *Journal of Colloid and Interface Science*.
- Fratini, F., Mancini, S., Turchi, B., Sparagni, D., Al-Gwad, A.A., Najjar, B. *et al.*, (2019). Antimicrobial activity of three essential oils (cinnamon, manuka, and winter savory), and their synergic interaction, against *Listeria monocytogenes*. *Flavour and Fragrance Journal*, 34(5): 339-348.
- Ma, Q., Davidson, P.M and Zhong, Q. (2016). Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, *soybean oil*, and *Tween 80*. *International journal of food microbiology*, 226: 20-25.
- Mirhosseini, H., Tan, C.P., Hamid, N.S., Yusof, S and Chern, B.H. (2009). Characterization of the influence of main emulsion components on the physicochemical properties of orange beverage emulsion using response surface methodology. *Food Hydrocolloids*, 23(2): 271-280.
- Mnayer, D., Fabiano-Tixier, A.S., Petitcolas, E., Hamieh, T., Nehme, N., Ferrant, C. *et al.*, (2014). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the Alliaceae family. *Molecules*, 19(12): 20034-20053
- Moradi, S., Anarjan, N. (2019). Preparation and characterization of *α-tocopherol* nanocapsules based on gum Arabic-stabilized nanoemulsions. *Food science and biotechnology*, 28(2): 413-421.
- Piccaglia, R., Marotti, M., Giovanelli, E., Deans, S.G and Eaglesham, E. (1993). Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Industrial crops and Products*, 2(1): 47-50.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. *et al.*, (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food chemistry*, 91(4): 621-632.

-
- Satyal, P., Craft, J.D., Dosoky, N.S and Setzer, W.N. (2017). The chemical compositions of the volatile oils of garlic (*Allium sativum*) and wild garlic (*Allium vineale*). *Foods*, 6(8): p.63.
 - Shahat, A.A and *et al.* (2011). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules*, 16(2): 1366-1377.
 - Weiss, J., Muschiolik, G. (2007). Factors affecting the droplet size of water-in-oil emulsions (W/O) and the oil globule size in water-in-oil-in-water emulsions (W/O/W). *Journal of Dispersion Science and Technology*, 28(5): 703-716.
 - Wittschieber, N., Faller, G and Hensel, A. (2009). Aqueous extracts and polysaccharides from liquorice roots (*Glycyrrhiza glabra L.*) inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(2): 218-223.