مقاله پژوهشی

علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و شش، شماره هشت، آبان ماه ۱۴۰۳ (۸۴-۷۳)

تهیه نانوالیاف پلیمری زیست‌سازگار جدید حاوی عصاره گیاه دافنه ماکروناتا و بررسی فعالیت ضدمیکروبی آن

لاله صفوی‌نیا [۱]

محمدرضا اخگر [*۲]

akhgar@iauk.ac.ir

بتول تهامی‌پور [۳]

سیدعلی احمدی [۴]

تاریخ دریافت: ۹۹/۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: گیاه دافنه ماکروناتا یکی از گونه‌های جنس دافنه در ایران است که دارای خواص زیستی منحصر به فرد بوده و از دیرباز به‌عنوان یک گیاه دارویی استفاده شده است. در این مطالعه، نانوالیاف پلیمری زیست‌سازگار از پلی‌وینیل الکل و عصاره گیاه دافنه ماکروناتا به عنوان پوشش ضدمیکروبی با کارآیی بالا به روش الکتروریسی تهیه و خواص ضدمیکروبی آن بر روی باکتری های گرم‌مثبت، گرم‌منفی و قارچ بررسی شد.

روش بررسی: در این تحقیق محلول پلیمری با درصد وزنی/وزنی ۱۲ درصد از پلیمر پلی‌وینیل الکل تهیه شد و ۲ میلی‌لیتر، از عصاره گیاهی به ۱۰ میلی‌لیتر از محلول پلیمری افزوده شد. به منظور تهیه نانوالیاف، شرایط بهینه دستگاه الکتروریسی شامل ولتاژ ۱۷ کیلوولت، نرخ تزریق محلول ۳ میلی‌لیتر بر ساعت، فاصله سر نازل تا جمع‌کننده ۷ سانتی‌متر و سرعت جمع‌کننده ۱۰۰ دور بر دقیقه تنظیم شد.

یافته‌ها: بعد از تهیه لایه پلیمری، مورفولوژی و قطر نانوالیاف به کمک تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی معین شد و قطر متوسط نانوالیاف تهیه شده در شرایط بهینه، برابر ۸۰ نانومتر به‌دست آمد. بررسی فعالیت ضدمیکروبی این پوشش نشان داد که این ساختار اثر ضدمیکروبی قابل‌توجهی بر روی باکتری‌ها نشان می‌دهد، به طوری که بیشترین اثر ضدمیکروبی بر روی باکتری گرم‌مثبت استرپتوکوکوس پیوژنز با قطر هاله عدم رشد ۱۴ میلی‌متر مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نانوپوشش حاصل در این پژوهش به دلیل ساختار زیست‌سازگار، غیرسمی، ارزان قیمت و کارآیی بالا می‌تواند به عنوان پوشش ضدمیکروبی در حوزه زیستی و پزشکی جهت بسته‌بندی یا پوشش زخم مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: دافنه ماکروناتا ، عصاره، پلی‌وینیل الکل، نانوالیاف، ضدمیکروبی.

۱- دانشجوی دکترای شیمی آلی، گروه شیمی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.

۲- دانشیار شیمی آلی، گروه شیمی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران. *(مسوول مکاتبات)

۳- استادیار شیمی آلی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران.

۴- استادیار شیمی آلی، گروه شیمی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.

J. Env. Sci. Tech., Vol 26, No. 8, November, 2024

Preparation of new biocompatible polymeic nanofibers containing Daphne macronata plant extract and evaluation of its antimicrobial activity

Laleh Safavinia [1]
Mohammad Reza Akhgar[1] *
akhgar@iauk.ac.ir
Batool Tahamipour [2]
Majid Eshagh Nimvari [1]

Admission Date:February 7, 2021 Date Received: November 20, 2020

Abstract

Background & Objective: *Daphne macronata* is one of the species of Daphne genus in Iran that has unique biological properties and has been used as a medicinal plant for a long time. In this study, biocompatible polymer nanofibers from polyvinyl alcohol and *Daphne macronata* plant extract were prepared as an antimicrobial coating with high efficiency by electrospinning method and its antimicrobial properties on gram-positive, gram-negative and the fungus was examined.

Material and Methodology: In this study, a polymer solution with weight / weight of 12% polyvinyl alcohol polymer was prepared and 2 mL of plant extract was added to 10 mL of polymer solution. In order to prepare nanofibers, the optimal conditions of the electrospinning device including voltage of 17 kV, solution injection rate of 3 mL / h, nozzle head to collector distance of 7 cm and collector speed of 100 rpm were set.

Findings: After preparing the polymer layer, the morphology and diameter of the nanofibers were determined by scanning electron microscopy and the average diameter of the nanofibers prepared under optimal conditions was 80 nm. Examination of the antimicrobial activity of this coating showed that this structure shows a significant antimicrobial effect on bacteria, so that the highest antimicrobial effect was observed on the gram-positive bacterium Streptococcus pyogenes with a growth inhibition zone diameter of 14 mm**.**

Discussion and conclusion: The nanocoatings obtained in this study can be used as an antimicrobial coating in the biological and medical fields for packaging or wound dressing due to their biocompatible, non-toxic, inexpensive and high efficiency structure.

Keywords: Daphne mucronata, Extract, Polyvinyl alcohol, Nanofibers, Antimicrobial.

1- Department of Chemistry, Faculty of Science, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.
2- Young Researchers and Elite Club, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran. **(Corresponding Authors)*

مقدمه

گیاهان دارویی میراث‌های بومی هر کشوری به شمار می‌آیند که از اهمیت فراگیر و جهانی در صنایع مختلف به ویژه پزشکی برخوردار هستند(۱). تنوع و تعداد گونه‌های گیاهی با خواص دارویی، در ایران بسیار زیاد است به طوری که نتایج بررسی‌ها نشان داده است که حدود ۸ هزار گونه گونه‌های گیاهی دارای خواص دارویی در ایران وجود دارد(۲). در سالهای اخیر، گسترش مقاومت سویه‌های میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌ها از یک سو و افزایش هزینه تولید ترکیبات دارویی جدید از سوی دیگر باعث شده است که محققان از ترکیبات ارزان قیمت طبیعی مانند عصاره گیاهان دارویی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی استفاده کنند. فراوانی، هزینه پایین تولید و زیست‌سازگاری این ترکیبات، آنها را به گزینه‌ای مناسب برای مهار انواع سویه‌های باکتریایی تبدیل نموده است(۳). گیاه دافنه[1] یکی از گیاهان دارویی شناخته شده در ایران است که شامل ۵ گونه مختلف است (۴). یک گونه از این گیاه با عنوان دافنه ماکروناتا[2] از زمان‌های گذشته برای درمان بیماری‌های روماتیسمی، درد مفاصل، بیماری‌های پوستی و برخی از انواع سرطان مورد استفاده می‌شده است (۵). در ایران این گیاه در دامنه‌های جنوبی البرز و استان‌های مرکزی از جمله اصفهان، فارس و کرمان انتشار دارد و در مناطق کوهستانی به خوبی رشد می‌کند(۶).

با توجه به اینکه گزارش‌های کمی در مورد خواص دارویی این گیاه منتشر شده است و نیز میزان و کیفیت مواد موثره دارویی در این گیاه در مناطق مختلف ایران متاثر از عوامل اکولوژیکی و اقلیمی هر منطقه می‌باشد، لذا تحقیق در مورد بررسی ترکیب شیمیایی این گیاه در مناطق مختلف و همچنین خواص‌دارویی این گیاه بیش از پیش ضروری به نظر می‌رسد.

امروزه فناوری نانو به دلیل خواص منحصر به فرد در محصولات، توجه جهانی را به خود جلب کرده است. در حوزه پزشکی و دارویی نیز فناوری نانو، روش‌های زیادی برای فرآوری داروهای گیاهی به ارمغان آورده که می‌تواند باعث بهبود و ارتقای کیفیت سیستم‌های دارورسانی شود(۷).

یکی از کاربردی‌ترین ساختارهای نانویی، نانوالیاف هستند که به دلیل خواص جالب توجه، کاربردهای صنعتی زیادی پیدا کرده‌اند. کاربردهای نانوالیاف در زمینه‌های زیستی و پزشکی شامل بسته بندی مواد غذایی، تثبیت آنزیم، مهندسی بافت و پوشش زخم می‌باشد(۸, ۹). با این وجود، نانوساختارهای پلیمری به دلیل تخلخل زیاد، محیط مناسبی برای رشد میکروب‌ها هستند و می‌توانند سبب انتقال انواع بیماری‌ها شوند. همچنین، تجزیه بیولوژیکی نانوالیاف توسط میکروب‌ها می‌تواند سبب تغییر رنگ و کاهش خواص مکانیکی و کشش الیاف شده و موجبات پوسیدگی آنها را فراهم آورد. امروزه تهیه پوشش نانوالیاف ضدمیکروبی به دلیل کاربرد پزشکی و زیستی فراوان مورد توجه محققین قرار گرفته است(۱۰). خواص ضدمیکروبی در نانوالیاف مورد استفاده به عنوان پوشش زخم نیز از اهمیت بالایی برخوردار است. استفاده از زخم‌پوش‌های نانولیفی ضدمیکروبی مانع عفونت زخم شده و موجب تسریع در بهبودی زخم و در نتیجه کاهش طول مدت درمان می‌گردد (۱۱).

تا به‌حال گزارش‌های زیادی از کاربرد نانوالیاف ضدمیکروبی با استفاده از ترکیبات پلیمری و عصاره‌های گیاهی مختلف جهت کاربردهای متفاوت ارائه شده است(۱۲, ۱۳). با وجود خواص دارویی جالب توجه گونه گیاهی دافنه ماکروناتا ، تا کنون استفاده از عصاره این گیاه در نانوالیاف گزارش نشده است. در این پژوهش، ساخت نمونه جدید از نانوالیاف پلی‌وینیل الکل[3] و عصاره این گونه گیاهی به عنوان پوشش ضدمیکروبی موثر و ارزان مورد توجه قرار گرفته است. بدین منظور، ابتدا ترکیبات عصاره این گیاه شناسایی و سپس نانوالیاف حاوی عصاره تهیه و در نهایت فعالیت ضدمیکروبی آن بررسی شده است.

1- Daphne
2- Daphne mucronata
3- polyvinyl alcohol

روش بررسی

مواد و روشها

مواد شیمیایی مورد نیاز شامل پلیمر پلی‌وینیل الکل با وزن مولکولی ۱۰۰۰۰۰، حلال متانول با درجه خلوص ۹۵ درصد، حلال دی‌متیل –سولفوکسید[1] با درجه خلوص ۹۸ درصد، محیط کشت مولر-هینتون آگار[2] به شماره Cat.No.1.05437، اسید سولفوریک ۹۵ درصد و پودر کلرید باریم بدون آب جهت ساخت استاندارد مک فارلند[3] از شرکت مرک آلمان تهیه شد و بدون خالص‌سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفت.

میکروارگانیسم‌های استفاده شده جهت انجام تست ضدمیکروبی، شامل باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus cereus* (PTCC 1665)، *Staphylococcus epidermidis* (PTCC 1435) و *Streptococcus pyogenes* PTCC (1447) و باکتری‌های گرم منفی *Salmonella enterica* (PTCC 1709) و *Acinetobacter baumannii* (PTCC 1855) و قارچ *Fusarium oxysporum* (PTCC 5115) بودند که از بانک میکروبی مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

تهیه عصاره گیاهی

گونه دافنه ماکروناتا پس از جمع‌آوری از مناطق کوهستانی اطراف شهرستان جیرفت، توسط‌متخصصین گیاه‌شناس دانشگاه شهید باهنر کرمان شناسایی و مورد تأیید قرار گرفت. سپس برگ‌های تازه گیاه با آب مقطر به خوبی شستشو داده شدندو به مدت یک هفته در دمای اتاق بـه دور از نور مستقیم خورشید خشک شدند. برگ‌های خشک شده، در شرایط استریل توسط آسیاب برقی به صورت پودر درآمدند. عصاره-گیری از برگ‌های گیاه، به وسیله حلال متانول۸۰٪ با روش خیساندن انجام‌شد. سپس محلول در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای مدت یک ساعت بر روی شیکر به هم زده شد. پس از خنک شدن و انجام عمل فیلتراسیون توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲، جهت از بین بردن تمامی ذرات معلق به مدت ۳۰ دقیقه به وسیله دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت، عصاره به دست آمده در ویال‌های استریل و برای استفاده‌های بعدی در یخچال با دمای تقریبی ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.(۱۵، ۱۴)

تولید لایه نانوالیاف به روش الکتروریسی

برای تهیه نانو الیاف ابتدا محلول پلیمری با درصد وزنی/وزنی ۱۲ درصد از پلیمر پلی‌وینیل الکل بر اساس مطالعات قبلی تهیه شد(۱۶). در مرحله بعد و پس از تعیین شرایط مطلوب الکتروریسی، مقدار ۲ میلی‌لیتر، از عصاره گیاهی به ۱۰ میلی‌لیتر از محلول پلیمری مطلوب افزوده و مخلوط حاصل درون ظروف محافظت شده از نور، به مدت ۲ ساعت بر روی همزن مغناطیسی و در دمای محیط قرار گرفت تا محلول کاملاً یکنواختی حاصل گردد.

جهت تهیه نانوالیاف از دستگاه الکتروریسی شرکت نانو آزما، ساخت کشور ایران استفاده شد. این دستگاه مجهز به دو سامانه مستقل تامین‌کننده ولتاژ بالا، هر یک به میزان ۳۰ کیلوولت و ۲ پمپ الکتروریسی با سرنگ ۵ سی‌سی، سوزن مدل اسپاینال ۲۲ و یک جمع‌کننده می‌باشد. در این تحقیق، محلول پلیمری داخل یک سرنگ ریخته شد و فاصله سوزن تا جمع‌کننده ۷ سانتی‌متر، ولتاژ دستگاه ۱۷ کیلوولت، نرخ تزریق ۳ میلی‌لیتر بر ساعت و سرعت چرخش جمع‌کننده ۱۰۰ دور بر دقیقه تنظیم شد. بعد از یک ساعت کار دستگاه، لایه نازکی از نانوالیاف پلیمری حاوی عصاره گیاهی بر روی جمع‌کننده تشکیل شد. مورفولوژی و قطر نانوالیاف حاصل از فرایند الکتروریسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد (۱۷).

شناسایی ترکیبات موجود در عصاره

شناسایی ترکیبات عصاره به روش GC/MS انجام شد. به این منظور از دستگاه GC/MS مدل Agilent 3223 با ستون موئین HP5 به طول ۳۰ متر استفاده شد. برنامه حرارتی ۵۰ تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دقیقه، گاز حامل، هلیوم با جریان ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه، دمای

1- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
2- Mueller-Hinton agar
3- McFarland standard

محفظه تزریق و دمای دتکتور ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت شکافت ۱:۱۰ بود. طیف جرمی ترکیبات در ۷۰ الکترون‌ولت با گستره جرمی ۵۰ تا ۴۷۰ amu ثبت گردید. همچنین، اطلاعات کمی به وسیله انتگراسیون الکترونی از سطح زیر پیک‌ها به‌دست آمد. شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده عصاره با مقایسه طیف های جرمی و شاخص‌های بازداری بدست آمده با طیف‌های جرمی و شاخص‌های بازداری ترکیب‌های استاندارد انجام شد.(۱۸)

بررسی خواص ضدمیکروبی

فعالیت‌های ضدمیکروبی ترکیبات شامل تعیین حداقل غلظت بازدارندگی، تعیین حداقل غلظت کشندگی و تعیین قطر هاله عدم رشد بررسی شد. تعیین حداقل غلظت بازدارندگی با روش-های انتشار دیسک طبق دستورالعمل CLSI، M07-A9 و M27-A2 صورت گرفت. حداقل غلظت کشندگی نیز طبق دستورالعمل CLS ، M26-A صورت گرفت.(۱۹, ۲۰)

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی[1]

ابتدا سویه‌های باکتریایی گرم‌مثبت و گرم‌منفی با غلظت نیم‌مک-فارلند در محیط کشت مایع مولر-هینتون تهیه شد. سپس غلظت‌های مختلفی از ترکیبات سنتز شده در حلال دی‌متیل سولفوکسید[2]تهیه و از هر غلظت، مقدار ۲۰ میکرولیتر به ترتیب در چاهک‌های یک ردیف از پلیت ۹۶ خانه انتقال داده شد. مقدار ۱۷۰ میکرولیتر محیط کشت مایع مولر-هینتون براث و ۱۰ میکرولیتراز سویه‌های باکتریایی و قارچ به هر چاهک اضافه و به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت، کمترین غلظتی را که داخل چاهک کدورت مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) گزارش گردید. در چاهک آخر هر ردیف، به عنوان کنترل منفی، فقط حلال دی‌متیل سولفوکسید و سویه باکتری ریخته شد. آزمون مذکور برای داروی جنتامایسین نیز به عنوان شاهد صورت گرفت.

تعیین حداقل غلظت کشندگی[3]

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی، محلول موجود در چاهک حداقل غلظت بازدارندگی و سه الی چهار غلظت بالاتر از آن را با سوآپ به صورت جداگانه بر روی پلیت حاوی محیط کشت جامد مولر-هینتون آگار کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از زمان مذکور، پلیت‌ها بررسی و غلظتی که باکتری و قارچ رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) گزارش شد.

تعیین قطر هاله عدم رشد[4]

برای تعیین قطر هاله عدم رشد، ابتدا با سوآپ سویه‌های باکتریایی و قارچ بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد مولر-هینتون آگار کشت داده و روی آنها دیسک بلانک قرار داده شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از غلظت حداقل بازدارندگی مشتقاتی که دارای اثرات ضدباکتریایی برعلیه سویه باکتری مورد نظر بودند بر روی دیسک بلانک تزریق و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت، پلیت‌ها را برداشته و قطر هاله ایجاد شده، توسط کولیس اندازه‌گیری شد.

مشخصه‌یابی نانوالیاف

به منظور مشاهده ساختار نانوالیاف تهیه شده و ساختار شبکه پلیمری، از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل Mira 3-TESCAN استفاده شد. همچنین قطر نانوالیاف با استفاده از روش پردازش تصویر و نرم افزار Image-J 1.46r، تولید کشور آمریکا محاسبه شد. به منظور تایید وجود عصاره گیاهی در نمونه نانوالیاف، از طیف‌سنج مادون قرمز[5](FTIR) با دقت $4\ cm^{-1}$ و در محدوده $4000\text{-}400\ cm^{-1}$ استفاده شد.

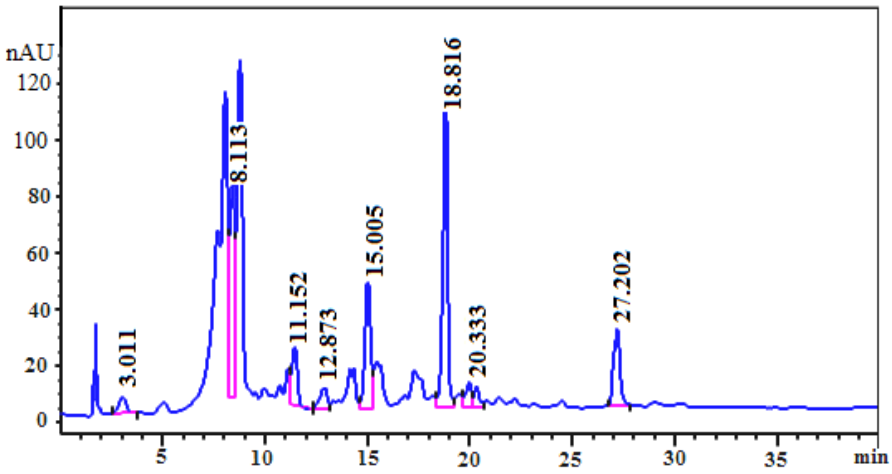
یافته ها و بحث

شناسایی ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه

استفاده صحیح از گیاهان دارویی مستلزم اطلاعات دقیق علمی و شناخت ترکیبات شیمیایی موجود در آنهاست. زیرا وجود ترکیبات شیمیایی خاص در گیاه است که باعث خواص درمانی

1- Minimum inhibitory concentration (MIC)
2- Dimethyl sulfoxide(DMSO)
3- Minimum Bactericidal Concentration (MBC)
4- Diameter inhibition zone
5- Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

آن می‌گردد. در این تحقیق، ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره متانولی برگ گونه گیاهی دافنه ماکروناتا به روش GC/MS شناسایی شد. شکل ۱ منحنی کروماتوگرافی گازی عصاره گیاه را نشان می‌دهد. در جدول ۱ ترکیبات اصلی شناسایی‌شده در عصاره گیاه، همراه با زمان بازداری این ترکیبات نشان داده شده است.



شکل ۱- نمودار کروماتوگرافی گازی عصاره متانولی دافنه ماکروناتا

Figure 1. Gas chromatographic diagram of Daphne Macronata methanolic extrac

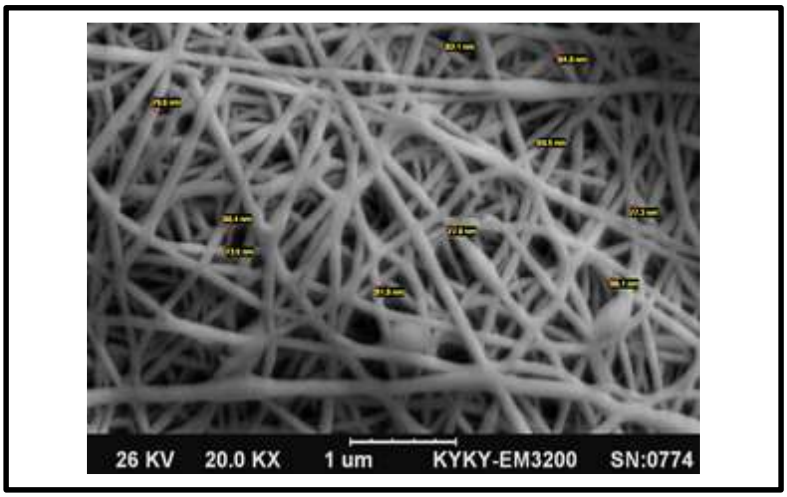
جدول ۱ -ترکیبات اصلی شناسایی‌شده در عصاره متانولی دافنه ماکروناتا

Table 1. Main compounds identified in Daphne macronata methanolic extract

نام ترکیب	میلی‌گرم بر لیتر	زمان بازداری (دقیقه)
گالیک اسید	۱۳۵	۳/۳
کاتچین	۱۵۳۱	۸/۳
هسپریدین	۱۰۶۶	۱۸/۵

نتایج نشان داد که در عصاره این گیاه ۱۷ ترکیب مختلف وجود دارد که ۳ ترکیب گالیک اسید، کاتچین و هسپردین درصد بیشتری از عصاره این گیاه را به خود اختصاص می‌دهند. گالیک اسید یا تری‌هیدروکسی بنزوئیک اسید ترکیبی از خانواده پلی-فنل‌ها با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچی و ضدباکتریایی قوی است که در عصاره برخی از گیاهان دارویی یافت می‌شود(۲۱). همچنین، کاتچین یک مکمل گیاهی و پلی‌فنول قوی و محلول در آب است. این ترکیب یکی از مواد مهم در برگ سبز چای محسوب می‌شود. این ترکیب در گروه فلاونوئیدها قرار داشته و اثر ضدمیکروبی قوی دارد(۲۲). هسپریدین نیز یک بیوفلاونوئید با اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است که در مرکبات یافت می‌شود(۲۳). در دیگر تحقیقات انجام شده بر روی گونه گیاهی دافنه ماکروناتا، ترکیبات موجود در عصاره آن شناسایی شده‌اند که با نتایج به دست آمده در این تحقیق شباهت‌ها و تفاوت‌هایی دارند. در تحقیقی که توسط پناهی و همکاران انجام شده است، ترکیب بتولین از عصاره این گیاه به دست آمد.(۲۴) بتولین یک تری‌ترپن طبیعی موجود درگیاهان جنس دافنه است که خاصیت ضدتوموری آن در برخی از انواع سرطان‌ها تأیید شده است. بتولین می‌تواند به بتولینیک اسید تبدیل گردد که از نظر زیستی ترکیبی فعالتر از بتولین است. بتولینیک اسید یک تری‌ترپنوئید پنتاسیکلیک طبیعی است که دارای خواص دارویی زیاد می‌باشد.با توجه به اینکه این گونه گیاهی در پاکستان نیز یافت می‌شود تحقیقاتی در ارتباط با شناسایی ترکیبات موجود در عصاره این گیاه در این

کشور انجام شده است. در تحقیقی که توسط زیدی و همکاران صورت گرفت، ترکیبات موجود در عصاره متانولی گیاه شناسایی شد و انواع ترکیبات شیمیایی شامل کومارین، کربوکسیلیک اسیدها، فلاونوئید و ترپنوئید از این گیاه به دست آمد که با ترکیبات به دست آمده در این تحقیق نیز مشابهت دارند (۲۵). همچنین، در تحقیقی که توسط اشرف و همکاران بر روی ترکیبات روغنی به دست آمده از ریشه و برگ این گیاه انجام شد، انواع ترکیبات هیدروکربنی و الکلی در عصاره گیاه شناسایی شد که با ترکیبات شناسایی شده در این تحقیق تفاوت دارند (۲۶). به منظور ارزیابی اندازه، قطر و شکل نانوالیاف تولید شده، تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نمونه‌های نانوالیاف پلی‌وینیل الکل با عصاره گیاهی تهیه شد. (شکل ۲).

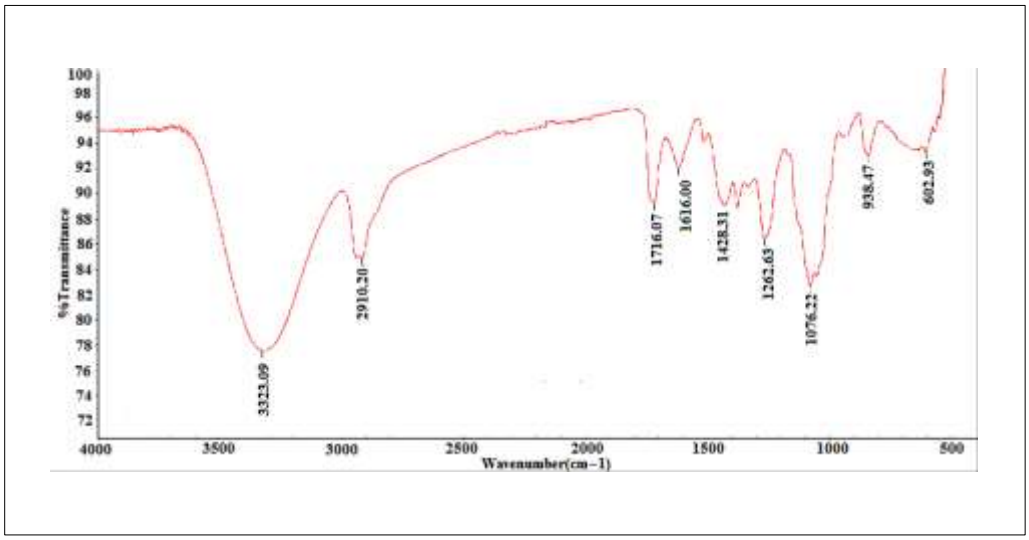


شکل ۲ - تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوالیاف پلی‌وینیل الکل حاوی عصاره گیاه

Figure 2. Electron microscope image of polyvinyl alcohol nanofibers containing plant extract

نانوالیاف پلیمری جهت کاربرد به عنوان پوشش، نیازمند کنترل مورفولوژی و ساختار نانوالیاف به شکل یک لایه مداوم و یکنواخت می‌باشد. عوامل گوناگونی بر روی ساختار و مورفولوژی نانوالیاف تولیدی از فرآیند الکتروریسی تاثیرگذارند که مهمترین آنها غلظت محلول و شرایط الکتروریسی است. غلظت محلول پلی‌وینیل الکل در این تحقیق با توجه به پژوهش‌های انجام شده قبلی، به میزان ۱۲ درصد و غلظت عصاره گیاهی ۲۰ درصد انتخاب شد. (۲۷).

تصویر میکروسکوپ الکترونی به دست آمده از نمونه جمع‌آوری شده بر روی فویل آلومینیومی، الیاف مناسبی را نشان داد که از نظر قطر ذرات و یکنواختی و شبکه‌ای‌شدن قابل‌قبول هستند. به طوری که میانگین قطر الیاف در محدوده ۸۰ نانومتر است. همچنین، تشکیل الیاف یکنواخت و بدون‌دانه نشان می‌دهد که وارد کردن عصاره گیاهی در بافت پلیمری با غلظت۲۰ درصد، تغییر چندانی در بافت نانوالیاف ایجاد نمی‌کند. تشکیل الیاف یکنواخت و منظم با عصاره گیاهی در این طرح به دلیل امکان تنفس بهتر و عبور بهتر هوا، کاربرد این پوشش را در پانسمان زخم و نیز بسته‌بندی‌های مواد خوراکی افزایش می‌دهد. برای بررسی و شناسایی دقیق‌تر ساختار نانوالیاف سنتز شده پلی‌وینیل الکل و عصاره گیاه، طیف مادون‌قرمز آن تهیه و مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). در طیف مادون قرمز این ترکیب پیک‌های مربوط به گروه‌های OH در cm^{-1} ۳۳۲۳، گروه کربونیل در cm^{-1} ۱۷۱۶ و پیک مربوط به پیوندهای کربنی آروماتیک در cm^{-1} ۱۶۱۶ مشاهده شده است که با ساختار شیمیایی ترکیب پلی وینیل‌الکل و ترکیبات اصلی شناسایی‌شده در عصاره گیاهی مطابقت داشته و وجود عصاره گیاهی در بافت نانوالیاف را تایید می‌کند.



شکل ۳- طیف مادون قرمز نانوالیاف پلی‌وینیل الکل حاوی عصاره گیاه

Figure 3. Infrared spectrum of polyvinyl alcohol nanofibers containing plant extracts

فعالیت ضدمیکروبی نانوالیاف

میکروارگانیسم‌ها از عوامل مهم ایجاد بیماری در انسان می‌باشند و خطرات ناشی از وجود آنها موجب شده است که محققین به فکر روش‌های موثرتر برای مقابله با آنها باشند. در این پژوهش، فعالیت ضدمیکروبی نانوالیاف حاوی عصاره گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، ابتدا فعالیت ضدمیکروبی عصاره دافنه ماکروناتا به صورت خالص و سپس نمونه نانوالیاف حاوی عصاره گیاهی بر روی سه گونه باکتری گرم‌مثبت *Bacilus cereus*، *Streptococcus pyogenes* و *Staphlococcus epidermidis*، دو گونه باکتری گرم‌منفی *Salmonella enteric* و *Acinetobacter baumannii* و همچنین قارچ *Fusarium oxysporum* بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوالیاف حاوی عصاره گیاهی، فعالیت ضدمیکروبی قابل‌توجهی بر روی باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی مورد آزمایش نشان می‌دهند (جدول ۲).

به طوری که بیشترین قطر هاله عدم رشد در نانوالیاف حاوی عصاره، بر روی باکتری گرم مثبت *Streptococcus pyogenes* با قطر هاله ۱۴ میلی‌متر مشاهده شد. کمترین قطر هاله ضدمیکروبی در باکتری گرم منفی *Acinetobacter baumannii* با قطر هاله ۱۰ میلی‌متر مشاهده شد.

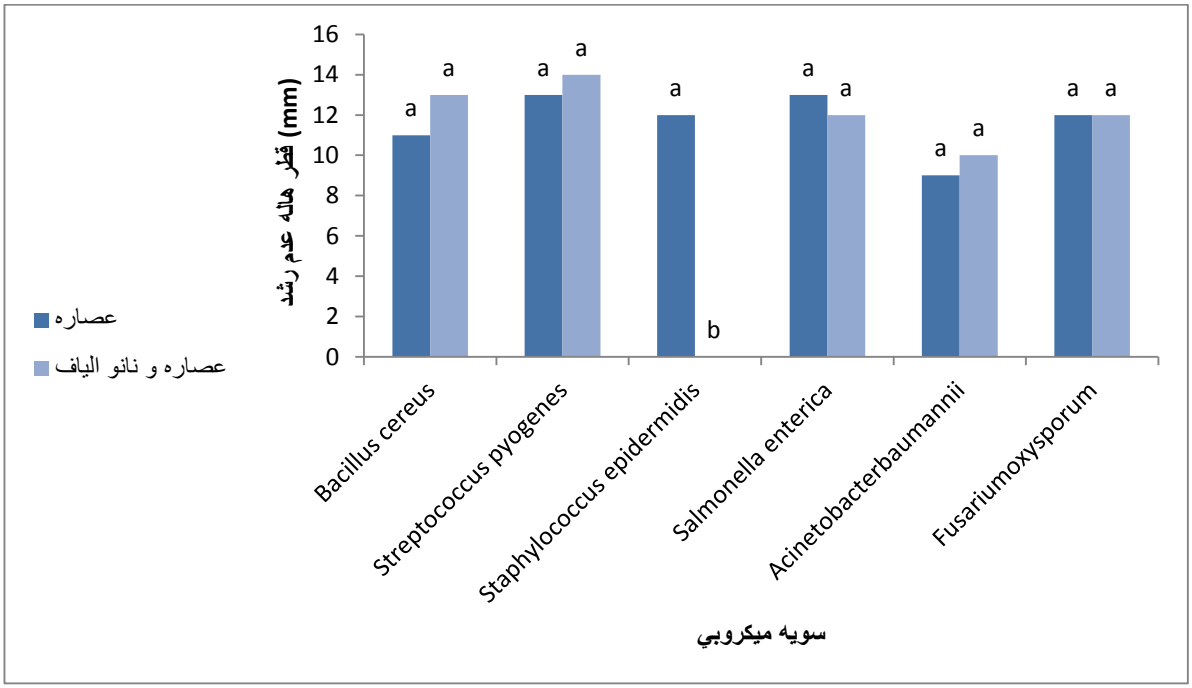
جدول ۲- فعالیت ضدمیکروبی عصاره گیاه و نانوالیاف حاوی عصاره گیاه بر روی باکتری‌های گرم‌مثبت، گرم‌منفی و قارچ

Table 2. Antimicrobial activity of plant extracts and nanofibers containing plant extracts on gram-positive, gram-negative and fungal bacteria

سویه میکروبی	شاخص بررسی‌شده	عصاره	عصاره و نانوالیاف	جنتامیسین
Bacillus cereus (PTCC 1665)	قطر هاله عدم رشد (mm)	۱۱	۱۳	۲۴
	حداقل غلظت بازدارندگی (mg/mL)	۳۲	۵۱۲	۱
	حداقل غلظت کشندگی (mg/mL)	۶۴	۱۰۲۴	۴
Streptococcus pyogenes (PTCC 1447)	قطر هاله عدم رشد (mm)	۱۳	۱۴	۱۴
	حداقل غلظت بازدارندگی (mg/mL)	۵۱۲	۲۵۶	۴
	حداقل غلظت کشندگی (mg/mL)	۱۰۲۴	۵۱۲	۴

Staphylococcus epidermidis (PTCC 1435)	قطر هاله عدم رشد (mm)	۱۲	-	۲۵
	حداقل غلظت بازدارندگی (mg/mL)	۵۱۲	-	۲
	حداقل غلظت کشندگی (mg/mL)	۱۰۲۴	-	۴
Salmonella enterica (PTCC 1709)	قطر هاله عدم رشد (mm)	۱۳	۱۲	۲۶
	حداقل غلظت بازدارندگی (mg/mL)	۵۱۲	۲۰۴۸	۴
	حداقل غلظت کشندگی (mg/mL)	۱۰۲۴	۴۰۹۶	۸
Acinetobacter baumannii (PTCC 1855)	قطر هاله عدم رشد (mm)	۹	۱۰	۱۹
	حداقل غلظت بازدارندگی (mg/mL)	۲۰۴۸	۱۰۲۴	۳۲
	حداقل غلظت کشندگی (mg/mL)	۴۰۹۶	۱۰۲۴	۶۴
Fusarium oxysporum (PTCC 5115)	قطر هاله عدم رشد (mm)	۱۲	۱۲	۲۳
	حداقل غلظت بازدارندگی (mg/mL)	۵۱۲	۲۰۴۸	۶۴
	حداقل غلظت کشندگی (mg/mL)	۱۰۲۴	۴۰۹۶	۱۲۸

آنالیز آماری اثر عصاره گیاه و نانوالیاف حاوی عصاره گیاه بر روی سویه میکروبی انجام شد (شکل ۴) . مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه تکرار) با استفاده از آزمون دانکن انجام شد ($P<0.05$). میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند ($P<0.05$)



شکل ۴- نتایج آنالیز آماری اثر عصاره گیاه و نانوالیاف حاوی عصاره گیاه بر روی سویه های میکروبی

Figure 4. Results of statistical analysis of the effect of plant extracts and nanofibers containing plant extracts on microbial strains

مطالعات مختلف انجام شده توسط سایر محققین نیز اثر ضدباکتریایی گونه دافنه ماکروناتا را به اثبات رسانده‌اند. در تحقیق انجام شده توسط جاویدنیا و همکاران، فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی و الکلی برگ، ساقه و ریشه دافنه

ماکروناتا، جمع‌آوری شده از استان فارس، بر روی باکتری‌های مختلف بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره متانولی، بیشترین اثر را بر روی باکتری *Streptococcus aureus* دارد(۲۸). از طرف دیگر، در تحقیق انجام شده توسط طلایی و همکاران، فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی و الکلی برگ و ریشه *Daphne mucronata*، جمع‌آوری شده از منطقه لرستان بر روی باکتری‌های مختلف بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره متانولی این گیاه بیشترین اثر را بر روی باکتری دهانی *Streptococcus mutans* دارد (۲۹). اشرف و همکاران در پاکستان، فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگ گونه دافنه ماکروناتا را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این بررسی نشان داد که عصاره این گیاه اثر ضدمیکروبی قابل‌توجهی بر روی قارچ *Candida albicans* نشان می‌دهد، به طوری که قطر هاله عدم رشد آن ۲۲ میلی‌متر بود.(۲۶)

بررسی نتایج تحقیقات انجام شده، نشان می‌دهد که عصاره گیاه دافنه ماکروناتا، به دست آمده از مناطق مختلف، فعالیت ضدمیکروبی قابل‌ملاحظه‌ای بر روی باکتری‌های مختلف نشان می‌دهد. این اثر را می‌توان به حضور ترکیبات فنولی در این گیاه نسبت داد.

نتیجه‌گیری

نانوالیاف پلیمری، نانوساختارهای مهمی هستند که کاربرد زیادی در صنعت و پزشکی دارند. گسترش آلودگی‌های میکروبی در محیط‌های بیمارستانی و صنعتی، مشکلاتی را در استفاده از نانوالیاف ایجاد کرده است. حضور میکروارگانیزم‌ها بر روی نانوالیاف، ضمن انتقال آلودگی می‌تواند سبب ایجاد تأثیرات نامطلوبی نظیر تجزیه مواد سازنده الیاف، کاهش استحکام و در نهایت پوسیدگی منسوج شود. در این پژوهش، پوشش نانوالیاف پلیمری جدیدی از پلی‌وینیل الکل و عصاره گیاه دافنه ماکروناتا به روش الکتروریسی تهیه شد و خواص ضدمیکروبی آن بر روی چند نمونه باکتری بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت. بررسی ساختار به دست آمده نشان داد که نانوالیاف پلیمری حاوی عصاره گیاهی با میانگین قطر ۸۰ نانومتر تهیه شدند. همچنین، فعالیت ضدمیکروبی نانوپوشش در مقابل باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم منفی نشان داد که این ساختار می‌تواند اثر بازدارنگی قابل‌توجهی بر روی انواع باکتری‌ها به ویژه *Streptococcus pyogenes* داشته باشد. نانوپوشش حاصل به دلیل ساختار زیست‌سازگار، غیرسمی، ارزان قیمت و کارآیی بالا می‌تواند جایگزین مناسبی برای پوشش‌های پلیمری مورد استفاده در صنایع پزشکی و غذایی باشد.

References

1. Wang W, Xu J, Fang H, Li Z, Li M. Advances and challenges in medicinal plant breeding. Plant Science. 2020; 298:110573.
2. Bahmani M, Shirzad H, Majlesi M, Shahinfard N, Rafieian-Kopaei M. A review study on analgesic applications of Iranian medicinal plants. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2014; 7:S43-S53.
3. Rajput M, Kumar N. Medicinal plants: A potential source of novel bioactive compounds showing antimicrobial efficacy against pathogens infecting hair and scalp. Gene Reports. 2020;21:1008.۷۹
4. Hou X, Hou X, Li L. Chemical constituents from the flower buds of Daphne genkwa (Thymelaeaceae). Biochemical Systematics and Ecology. 2020;91:104055.
5. Khodadadian Z, Hassanpour-Ezatti M, Mousavi SZ, Asgarpanah J. Analgesic and anti-inflammatory potential of aerial parts of the Daphne mucronata Royle extract in mice: Opioid-independent action. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2016;6(3):198-201.
6. Abolmaali SM-R, Tarkesh M, Bashari H. MaxEnt modeling for predicting suitable habitats and identifying the effects of climate change on a threatened species, Daphne mucronata,

in central Iran. Ecological Informatics. 2018;43:116-23.
7. Zheng Y, Xie Q, Wang H, Hu Y, Ren B, Li X. Recent advances in plant polysaccharide-mediated nano drug delivery systems. International Journal of Biological Macromolecules. 2020;165:2668-83.
8. Zhang W, He Z, Han Y, Jiang Q, Zhan C, Zhang K, et al. Structural design and environmental applications of electrospun nanofibers. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing. 2020;137:106009.
9. Ibrahim HM, Klingner A. A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications. Polymer Testing. 2020;90:106647.
10. Topuz F, Uyar T. Antioxidant, antibacterial and antifungal electrospun nanofibers for food packaging applications. Food Research International. 2020;130:108927.
11. Homaeigohar S, Boccaccini AR. Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings. Acta Biomaterialia. 2020;107:25-49.
12. Kim JH, Lee H, Jatoi AW ,Im SS, Lee JS, Kim I-S. Juniperus chinensis extracts loaded PVA nanofiber: Enhanced antibacterial activity. Materials Letters. 2016;181:367-70.
13. Aruan NM, Sriyanti I, Edikresnha D, Suciati T, Munir MM, Khairurrijal. Polyvinyl Alcohol/Soursop Leaves Extract Composite Nanofibers Synthesized Using Electrospinning Technique and their Potential as Antibacterial Wound Dressing. Procedia Engineering. 2017;170:31-5.
14. Abubakar A, Haque M. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences. 2020;12(1):1-10.
15. Hedayati M, Yazdanparast R, Fasihi H, Azizi F. Anti-tumor Activity of Daphne mucronata Extract and its Effects on TNF-a Receptors and TNF-a Release in Cultured Human Monocytes. Pharmaceutical Biology. 2003;41(3):194-8.
16. Supaphol P, Chuangchote S. On the electrospinning of poly(vinyl alcohol) nanofiber mats: A revisit. Journal of Applied Polymer Science. 2008;108(2):969-78.
17. Tian H, Yuan L, Wang J, Wu H, Wang H, Xiang A, et al. Electrospinning of polyvinyl alcohol into crosslinked nanofibers: An approach to fabricate functional adsorbent for heavy metals. Journal of Hazardous Materials. 2019;378:120751.
18. Liu B, Hu T, Yan W. Authentication of the Bilberry Extracts by an HPLC Fingerprint Method Combining Reference Standard Extracts. Molecules. 2020;25(11):2514.
19. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis . ۹-۷۱:(۲)۶;۲۰۱۶.
20. Guimarães AC, Meireles LM, Lemos MF, Guimarães MC, Endringer DC, Fronza M, et al. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. Molecules. 2019;24(13).
21. Inoue M, Suzuki R, Koide T, Sakaguchi N, Ogihara Y, Yabu Y. Antioxidant, Gallic Acid, Induces Apoptosis in HL-60RG Cells. Biochemical and Biophysical Research

Communications. 1994;204(2):898-904.

22. Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L, Chantre P, Vandermander J. Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. International Journal of Obesity. 2000;24(2):252-8.
23. Garg A, Garg S, Zaneveld LJD, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. Phytotherapy Research. 200.٦٩-٦٥٥:(٨)١٥;١
24. Panahi Kokhdan E, Mianabadi M, Sadeghi H, Khalaf M. The Effects of Two Species of Daphne, Betulin and Betulinic Acid on Alkaline Phosphatase Activity in Two Human Cancer Cell lines, K562 and MCF-7. yums-armaghan. 2014;18(11):900-9.
25. Zaidi A, Bukhari S, Khan F, Noor T, Iqbal N. Ethnobotanical, Phytochemical and Pharmacological Aspects of Daphne mucronata (Thymeleaceae). Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2015;14:1517.-
26. Ashraf I, Zubair M, Rizwan K, Rasool N, Jamil M, Khan SA, et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial potential of essential oils from different parts of Daphne mucronata Royle. Chemistry Central Journal. 2018;12(1):135.
27. Li X, Kanjwal MA, Lin L, Chronakis IS. Electrospun polyvinyl-alcohol nanofibers as oral fast-dissolving delivery system of caffeine and riboflavin. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2013;103:182-8.
28. Javidnia K, Miri R, Bahri Najafi R, Khademzadeh Jahromi N. A PRELIMINARY STUDY ON THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF DAPHNE MUCRONATA ROYLE. DARU JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE. 2003;11(1):28-31.
29. Talei GR, Meshkat Alsadat M, Delfan B. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FRUIT, LEAVES EXTRACTS OF ARTEMISIA PERSICA BOISS, RHUS CORIARIA, EPHEDRA INTERMEDIA AND DAPHNE MUCRONATA ROYLE OF LORESTAN. YAFTEH. 2004;5(18):19-23.