مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۸، شهریور ۱۳۹۸، ۵۲۸-۵۱۵

مطالعه اثرات ضد میکروبی نانومولسیون عصاره آبی گیاه نعناع فلفلی (*Mentha Piperita Lamiaceae*) بر باکتری گرم منفی *Escherichia coli*: یک مطالعه آزمایشگاهی

مژگان حیدری[۱]، مژگان باقری[۲]

دریافت مقاله: ۹۷/۶/۳۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۸/۱ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۱۲/۴ پذیرش مقاله: ۹۷/۱۲/۸

چکیده

زمینه و هدف: از آنجایی‌که بیماری‌های عفونی دسته بزرگی از بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند، لذا امروزه نیاز به مواد آنتیباکتریال کم‌ضرر هر روز بیش‌تر حس می‌شود. گیاه نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha Piperita Lamiaceae* یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی با خواص ضد میکروبی، ضد آفت، ضدانگلی و ضد قارچی می‌باشد. لذا هدف از انجام این مطالعه تعیین اثرات ضد میکروبی نانومولسیون عصاره آبی گیاه نعناع فلفلی بر باکتری گرم منفی اکولای می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، از عصاره گیاه نعناع فلفلی و توئین ۸۰ استفاده شد که با استفاده از روش اولتراسونیفیکاسیون، پارامترهای درصد سورفاکتانت، غلظت اسانس و زمان سونیکاسیون مورد بررسی قرار گرفت. سایز نمونه‌ها به‌وسیله آنالیز پراکندگی نور دینامیکی و خواص ضد میکروبی در برابر باکتری اکولای به دو روش کمی واحد کلونی‌ساز و کیفی دیسک نفوذی بررسی شدند. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش گردید.

یافته‌ها: نانومولسیون ها در غلظت‌های ۱ تا ۵ درصد اسانس گیاه نعناع فلفلی با متوسط اندازه ذرات ۱۲ نانومتر و خواص ضد میکروبی با میانگین ۷۵ درصد و ۳/۱۲ میلی‌متر هاله عدم رشد علیه باکتری گرم منفی اکولای به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: نانومولسیون‌های سنتز شده بر پایه اسانس گیاهی نعناع فلفلی دارای پایداری مناسب هستند و خواص ضد میکروبی بالایی را علیه باکتری گرم منفی اکولای نشان می‌دهند که این خواص با افزایش غلظت نانومولسیون افزایش معنی‌داری دارد. بنابراین، به‌نظر می رسد که نانومولسیون‌های سنتز شده از خواص ضد میکروبی قابل توجهی برخوردار هستند.

واژه‌های کلیدی: ضد میکروبی، نانومولسیون، اسانس نعناع فلفلی، سورفاکتانت، اولتراسونیک

مقدمه

امروزه با توجه به آثار جانبی و معایب ترکیبات نگه دارنده شیمیایی، گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی را می‌توان به جای آن‌ها برای حفظ و نگه‌داری مواد غذایی، دست‌یابی به مواد ضدعفونی کننده و ضد میکروبی طبیعی که تشکیل محصولات جانبی مضر را درپی نداشته باشند، استفاده کرد و

۱- استادیار پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، ایران
تلفن: ۰۲۶-۳۶۲۸۰۰۴۰، دورنگار: ۰۲۶-۳۶۲۰۱۸۸۸، پست الکترونیکی: m.heydari@merc.ac.ir
۲- استادیار پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، ایران

این امر مسئله‌ای رو به گسترش در جهان است [۲-۱].

با توجه به افزایش روز افزون مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض جانبی آن‌ها، استفاده از گیاهان دارویی و عصاره‌های گیاهی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند [۵-۳]. به تازگی نشان داده شده است که بسیاری از اسانس‌ها خواص ضد میکروبی داشته و می‌توان از آن‌ها به‌عنوان گزینه دوست‌دار محیط زیست به منظور از بین بردن باکتری‌ها و میکروب‌های مضر استفاده کرد [۶-۷]. آن‌ها مکانیسم های متفاوتی را برای مبارزه با میکروارگانیسم‌ها به عهده دارند که از جمله می‌توان به جلوگیری از ساخت دیواره سلولی و اسیدهای نوکلئیک، مهار پروتئین‌سازی، تغییر در عملکرد غشاء سلولی اشاره کرد [۸-۱۱].

امروزه مواد آنتی باکتریال کاربردهای فراوانی را در پزشکی و صنعت به عهده دارند [۱۳-۱۴]. مواد ضد میکروبی طبیعی و سازگار با محیط زیست برای انسان و سایر جانداران بی‌زیان بوده و باعث آلودگی محیط زیست نمی‌شود و از نظر اقتصادی مصرف این‌گونه مواد ارگانیک و طبیعی کاملاً مقرون به صرفه است. محققان بر این عقیده‌اند که اسانس‌ها یا همان عصاره‌های معطر گیاهی قابلیت بالایی برای استفاده به شکل مواد آنتی باکتریال زیستی و جایگزینی با مواد شیمیایی دارند [۱۴-۱۶].

محققان نشان داده‌اند که کارآیی بعضی از اسانس‌های گیاهی طبیعی حتی در بعضی موارد بهتر از مواد مصنوعی می‌باشد. اما مشکل عمده آن‌ها فراریت بالا و متعاقب آن ناپایداری می‌باشد. به منظور مقابله با این مشکل یکی از بهترین راه حل‌ها استفاده از فرمولاسیون نانوامولسیون است که در واقع با استفاده از فناوری نانو، پایداری و کارآیی ترکیب مورد نظر را به نحو چشم‌گیری افزایش می‌دهد [۱۷].

تحقیقات نشان داده است که می‌توان با استفاده از فناوری نانو، مزایای فراوانی را در مواد ضد میکروبی نظیر کاهش مصرف مواد ضد میکروبی، افزایش کارآیی، سازگاری بالا با محیط زیست و بهبود کیفیت ایجاد نمود [۱۸].

نانوامولسیون‌ها به دلیل اندازه کوچک قطرات و در نتیجه شفافیت و پایداری فیزیکی طولانی مدت (بدون هیچ انعقاد ظاهری، رسوب و یا دو فازی شدن) و هم‌چنین نیاز به سورفاکتانت کم‌تر، باعث جذب بیش‌تر مواد ضد میکروبی توسط میکروارگانیسم و کاهش مصرف می شوند که از مزایای آن‌هاست. تولید نانوامولسیون برای ریزپوشینه‌سازی (microencapsulation) و کنترل رهایش ترکیبات فرآسودمند مانند انواع داروها، رنگ‌ها، اسانس‌ها و ویتامین‌ها یکی از زمینه‌های کاربردی فناوری نانو در صنایع غذایی بوده است [۱۹].

اولین بار یک ترکیب نانوامولسیونی دارویی روغن در آب توسط Baker و همکاران تهیه شد که به منظور غیر فعال کردن باکتری مقاوم دارای اسپور سنتز شد و سایز ذرات پراکنده نانوامولسیون مقدار ۵۰۰ تا ۵۰۰۰ نانومتر به‌دست آمد [۲۰]. سپس محققان دیگر به منظور کاربردهای عمدتاً دارویی و غذایی نیز از نانوامولسیون‌های متفاوت دیگر استفاده کردند [۲۱-۲۲، ۱۷، ۱۲]. گروهی از دانش‌مندان نیز در زمینه تهیه نانوامولسیون تحقیقات فراوانی انجام دادند که نقص عمده این سیستم‌ها، انجام آزمایشات وقت گیر و محدوده سایز نانو ذرات عمدتاً بزرگ‌تر از ۱۰۰ نانومتر بوده است [۱۲].

در این تحقیق، با استفاده از تکنیک ساده و سریع اولتراسونیک، یک سیستم نانوامولسیون پایدار با محدوده سایز ذرات کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر تهیه شده است که با توجه به دانش ما تاکنون سایز ذرات نانوامولسیون نعناع فلفلی کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر و پایدار گزارش نشده است که نوآوری این کار تحقیقاتی می‌باشد. هدف از اجرای این طرح، تعیین اثرات ضد میکروبی نانوامولسیون عصاره آبی گیاه نعناع فلفلی بر باکتری گرم منفی اکولای (Escherichia coli) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی (پژوهشگاه مواد و انرژی، سال ۱۳۹۵) مواد اولیه استفاده شده در این تحقیق شامل سورفاکتانت غیریونی توئین ۸۰ (Tween 80) و اتانول (Ethanol) از شرکت Merck آلمان و اسانس گیاهی نعناع فلفلی (تیره :Lamiaceae - نعنائیان، نام فارسی: نعناع فلفلی، نام انگلیسی: pepermint، تهیه شده با استفاده از روش تقطیر با آب (Water Distillation Method) از شرکت بهبو قمصر سماوات کاشان فراهم شدند. آب مورد استفاده در کلیه آزمایشات، آب دوبار تقطیر ضدعفونی شده بود. به منظور تست‌های ضد میکروبی مواد محتوی محیط کشت شامل پپتون، آگار، کلرید سدیم، عصاره مخمر از شرکت Merck آلمان و باکتری‌های گرم منفی اکولای گونه‌های (ATCC 25922, PTCC 1399) از بانک سلولی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند. برای بررسی اجزاء تشکیل دهنده اسانس گیاهی نعناع فلفلی دستگاه طیف سنج کروماتوگرافی گازی (Agilent 6890N/5973N GC–MS, USA) و برای سنتز نانوامولسیون، دستگاه اولتراسونیک پروب دار (Labsonic P, Sartorius Stedim Biotech, Germany) مورد استفاده قرار گرفت.

در آزمایشات بعدی به بررسی فرمولاسیون‌های نانوامولسیون سنتز شده از طریق اندازه گیری ویسکوزیته (Brookfield Viscometer, model RV-DV III Ultra, USA)، هدایت الکتریکی (Conductometer Metrohm, 712 USA) و pH (pH meter, Mettler Toledo, Switzerland) پرداخته شد. نحوه انجام آزمایشات از طریق قراردادن پروب‌های دستگاه در داخل محلول نانوامولسیون انجام گرفت [۲۳]. برای مطالعه سایز ذرات نانوامولسیون های سنتز شده از روش پراکندگی نور دینامیکی (Zetasizer Nano ZS, Model 3000HAs, Malvern, UK) استفاده شد که روشی فیزیکی برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون‌هاست. این روش به برهمکنش نور با ذره بستگی دارد. در این روش، حرکت براونی ذرات که وابسته به اندازه آن‌هاست اندازه گیری می‌شود، به این ترتیب که ذرات توسط نور لیزر تابش داده می شوند و شدت نوسانات نور پراکنده شده مورد آنالیز قرار می‌گیرد [۲۴]. در پایان به بررسی تست‌های ضد میکروبی در برابر باکتری گرم منفی اکولای، فرمولاسیون نانوامولسیون‌های سنتز شده با استفاده از روش کمی واحد کلونی ساز (CFU=Colony Forming Unit) و کیفی دیسک نفوذی (DDM=Disc Diffusion) پرداخته شد.

انجام آزمایشات در مقیاس آزمایشگاهی در دمای محیط صورت گرفته است و نتایج میانگین ۳ بار اندازه‌گیری می‌باشد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (Statistical Package for Social Science) نسخه ۱۶

صورت پذیرفت، به‌طوری که بررسی داده‌های کیفی و کمی آنالیزهای مختلف انجام گرفت و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شده است.

نتایج

شناسایی ترکیبات موجود در اسانس نعناع فلفلی با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی و سپس شناسایی آن‌ها با استفاده از طیف سنج جرمی انجام گرفت. بر این اساس ۵۰ ترکیب منفرد شناسایی شد. ترکیبات اصلی به ترتیب فراوانی شامل منتول (Menthol) (۲۸ درصد)، پارا-منتانون (p-Menthanone) (۱۳/۰۷ درصد)، منتون (Menthone) (۱۱/۳۱ درصد)، لیمونن (Limonene) (۷/۲۱ درصد)، نئوایزومنتول (Neoisomenthol) (۵/۴۴ درصد)، کاروون (Carvone) (۴/۹۴ درصد)، ترانس کاران (Trans-Carane) (۴/۴۵ درصد)، پولگون (Pulegone) (۴/۳۱ درصد)، منتوفوران (Menthofuran) (۴/۲۷ درصد)، اوکالیپتول (Eucalyptol) (۴/۰۱ درصد)، کاریوفایلن (Caryophyllene) (۳/۲۹ درصد)، جرماکرن (Germacrene) (۲/۶۴ درصد)، بتا-پینن (β-Pinene) (۱/۵۲ درصد)، آلفا-پینن (α-Pinene) (۱/۱۲ درصد)، ویریدی فلورول (Veridiflorol) (۰/۸۹ درصد)، ۴-توجانول (4-Thujanol) (۰/۸۷ درصد)، توجن (Thujene) (۰/۷۷ درصد)، سیکلوهگزانون (Cyclohexanone) (۰/۷۴ درصد)، بتا-بوربونن (β-Bourbonene) (۰/۵۹ درصد) و آلفا-ترپینئول (α-Terpineol) (۰/۵۶ درصد) بودند.

برای سنتز نانوامولسیون‌ها، از یک امولسیون روغن در آب برای ایجاد نانوامولسیون‌های روغنی استفاده می‌شود. به این منظور مخلوط اسانس گیاهی نعناع فلفلی (فاز روغنی) و ماده سورفاکتانت غیر یونی توئین ۸۰ و اتانول و آب مقطر به مقادیر متفاوت درصد حجمی هم‌زده می‌شود. در مرحله بعدی محلول امولسیون با استفاده از دستگاه اولتراسونیک پروب‌دار در فرکانس ۲۴ کیلوهرتز و پالس‌های ۰/۵ ثانیه و توان ورودی ۴۰۰ وات در مدت زمان‌های گوناگون هموژنیزه می‌شود [۲۵].

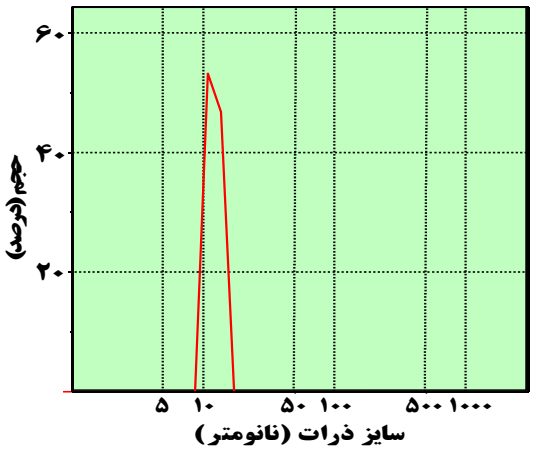
در آزمایشات بعدی پارامترهای فیزیکوشیمیایی نمونه‌های نانوامولسیون نظیر ویسکوزیته، هدایت الکتریکی و pH مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). آزمایشات ۳ بار تکرار شده‌اند و نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین گزارش شده است.

جدول ۱- پارامترهای فیزیکوشیمیایی فرمولاسیون نانوامولسیون نعناع فلفلی

نانوامولسیون برمبنای درصد حجمی اسانس نعناع فلفلی	ویسکوزیته (سانتی‌پویز)*	pH*	هدایت الکتریکی (میکروزیمنس بر سانتی‌متر)*
۱ درصد	۱۴/۲۳ ± ۰/۳۱	۵/۰۱ ± ۰/۰۸	۴۸/۸۵ ± ۰/۳۱
۲ درصد	۱۴/۴۱ ± ۰/۴۲	۵/۴۰ ± ۰/۰۹	۵۷/۲۰ ± ۰/۹۷
۳ درصد	۱۵/۷۲ ± ۰/۷۱	۵/۴۳ ± ۰/۰۴	۷۲/۲۹ ± ۰/۷۲
۴ درصد	۱۵/۹۱ ± ۱/۴۶	۵/۳۵ ± ۰/۰۶	۷۸/۷۶ ± ۰/۷۸
۵ درصد	۱۶/۴۶ ± ۱/۶۹	۵/۳۳ ± ۰/۱۱	۱۲۰/۷۰ ± ۰/۶۸

**** نتایج به صورت (انحراف معیار ± میانگین) گزارش شده است.***

برای مطالعه اندازه ذرات نانوامولسیون‌های سنتز شده از روش پراکندگی نور دینامیکی استفاده شد. برای نمونه توزیع اندازه ذرات برای نانوامولسیون ۳ درصد نعناع فلفلی (۱۲/۲۱ نانومتر) در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱- توزیع اندازه ذرات نانومولسیون اسانس نعناع فلفلی ۳ درصد (۱۲/۲۱ نانومتر) با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی

بعد از انجام آنالیزهای مختلف و مشخصه‌یابی فرمولاسیون‌های نانومولسیون به بررسی خاصیت ضد میکروبی نانومولسیون نعناع فلفلی در مقابل باکتری گرم منفی اکولای با استفاده از دو روش کمی واحد کلونی ساز و کیفی دیسک نفوذی پرداخته شد.

ابتدا آزمایشات کمی ضد میکروبی توسط روش واحد کلونی ساز برای محلول‌های نانومولسیون حاوی ۱ تا ۵ درصد اسانس نعناع فلفلی و محلول شاهد (محتوی توئین ۸۰ و آب مقطر) از طریق شمارش کلونی‌ها و انجام محاسبات مربوطه با استفاده از رابطه ۱ انجام گرفت و نتایج آن در جدول ۲ نشان داده شده است. برای هر رقت، آزمایش سه بار انجام شد. نتیجه تست به صورت درصد بر اساس رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$R = 100\ (B-A)/B \qquad (1)$$

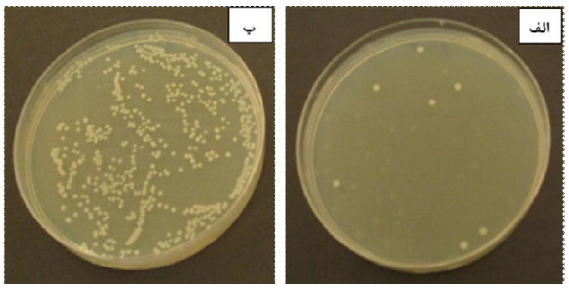
که در آن، R= درصد کاهش، A= تعداد باکتری‌های شمارش شده در نمونه (CFU/ml) و B= تعداد کلونی‌های شمارش شده در نمونه شاهد (CFU/ml) می باشد [۲۶].

جدول ۲- نتایج آزمون کمی ضد میکروبی محلول‌های نانومولسیون نعناع فلفلی

نانومولسیون بر مبنای درصد حجمی اسانس نعناع فلفلی	خاصیت ضد میکروبی (درصد)*
۱ درصد	۶۵/۰۴ ± ۲/۶۵
۲ درصد	۶۸/۳۲ ± ۱/۷۳
۳ درصد	۷۳/۰۸ ± ۳/۶۰
۴ درصد	۷۷/۱۰ ± ۵/۵۷
۵ درصد	۸۹/۴۸ ± ۸/۷۲

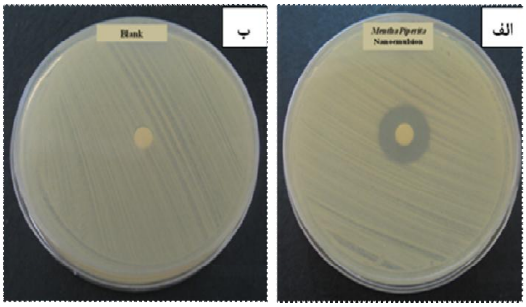
** نتایج به صورت (انحراف معیار ± میانگین) گزارش شده است.*

نتایج آزمون کمی ضد میکروبی در برابر باکتری اکولای در محیط کشت نیز در شکل ۲ نشان داده شده است



شکل ۲- تصاویر محیط کشت باکتری گرم منفی اکولای (الف) در حضور محلول نانومولسیون ۵ درصد اسانس نعناع فلفلی و (ب) در غیاب آن با استفاده از روش کمی واحد کلونی ساز

تست‌های کیفی ضد میکروبی توسط روش دیسک نفوذی در مقابل باکتری اکولای از طریق بررسی و اندازه‌گیری قطر هاله تشکیل شده اطراف دیسک‌های آغشته به محلول‌های نانومولسیون حاوی ۱ تا ۵ درصد اسانس نعناع فلفلی و محلول شاهد (محتوی توئین ۸۰ و آب مقطر) نشان دهنده میزان فعالیت آنتی باکتریالی آن‌ها می باشد. نتایج آزمون کیفی ضد میکروبی دیسک نفوذی در برابر باکتری اکولای در محیط کشت نیز در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳- تصاویر محیط کشت باکتری گرم منفی اکولای (الف) در حضور محلول نانوامولسیون ۵ درصد اسانس نعناع فلفلی و (ب) در غیاب آن با استفاده از روش کیفی دیسک نفوذی

قطر هاله عدم رشد باکتری اکولای برای محلول‌های نانوامولسیون حاوی ۱ تا ۵ درصد اسانس نعناع فلفلی نیز برای مقایسه در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- نتایج آزمون کیفی ضد میکروبی محلول‌های نانوامولسیون نعناع فلفلی

نانوامولسیون بر مبنای درصد حجمی اسانس نعناع فلفلی	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)*
۱ درصد	۲/۳۳ ±۰/۰۲
۲ درصد	۲/۵۴ ±۰/۰۳
۳ درصد	۲/۹۷ ±۰/۰۹
۴ درصد	۳/۵۵ ±۰/۱۶
۵ درصد	۴/۲۱ ±۰/۱۰

**** نتایج به صورت (انحراف معیار ± میانگین) گزارش شده است.***

بحث

در این تحقیق طی یک سری فرآیندهای گوناگون، نانوامولسیون‌های محتوی اسانس گیاهی نعناع فلفلی سنتز شدند. سپس برای بررسی پایداری فرمولاسیون‌ها، آنالیزهای مختلف از جمله آزمایشات شفافیت نوری، ویسکوزیته، اندازه‌گیری pH، اندازه‌گیری هدایت الکتریکی بر روی نمونه‌ها انجام شد. هم‌چنین اندازه نمونه‌ها به‌وسیله آنالیز پراکندگی نور دینامیکی بررسی شد. در پایان تست‌های ضد میکروبی کمی و کیفی بر روی محلول نانوامولسیون سنتز شده محتوی عصاره گیاهی نعناع فلفلی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی اسانس گیاهی نعناع فلفلی نشان داد که بیش‌ترین سهم به منتول، پارا-منتانون و منتون مربوط می‌باشد و جزء اصلی اسانس نعناع فلفلی از خانواده منتول می‌باشد که ترکیباتی آب‌گریز (Hydrophobe) و فرار بوده و به عنوان ماده مؤثره قارچ‌کش‌ها استفاده می‌شود. هر چند که تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی به شدت تحت شرایط محیط می‌باشد، اما در هر صورت نقش عمده در بیان صفات فیزیولوژیکی گیاه بیش‌تر تحت تأثیر ژنوتیپ گیاه می‌باشد [۲۷-۲۸].

مقدار منتول در اسانس نعناع بسته به نوع آن و شرایط محیطی از ۳۵ الی ۵۵ درصد متغیر است [۲۹]. در این مطالعه میزان قابل توجه ترکیب‌های منتول در اسانس نعناع فلفلی (۲۸ درصد منتول، پارا-منتانون ۱۳/۰۷ درصد و منتون ۱۱/۳۱ درصد) مورد آزمایش نشان‌دهنده کیفیت مطلوب آن بود. منتول موجود در اسانس نعناع فلفلی یک ماده آنتی‌باکتریال قوی می‌باشد.

نتایج حاصل از سنتز نانوامولسیون‌ها نشان داد که شفافیت نمونه‌ها پس از ۱۵ دقیقه قرار گرفتن تحت امواج مافوق صوت کامل می‌شود، اما از آن‌جایی که تفاوتی بین شفافیت نمونه‌ها در زمان‌های بالاتر مشاهده نشد، زمان ۱۵ دقیقه به عنوان زمان بهینه انتخاب گردید. مولکول سورفاکتانت با کاهش دادن انرژی آزاد و کاهش کشش سطحی در فصل مشترک روغن- آب کمک به فرآیند تشکیل امولسیون می‌کند [۳۰].

نتایج نشان داد سنتز نانوامولسیون‌ها با استفاده از امواج اولتراسونیک که تولید امواج با انرژی بالا را می‌کند، کامل می‌شود و سایز ذرات کوچک می‌شود. به‌این ترتیب امولسیون‌ها از حالت میکروامولسیون به نانوامولسیون تغییر وضعیت می‌دهند. این پدیده تولید امواج با انرژی بالا توسط امواج اولتراسونیک به منظور سنتز نانوامولسیون ها قبلاً توسط دانش‌مندان دیگر نظیر Syed و همکارش و Ghosh و همکاران نیز انجام شده و مورد تأیید قرار گرفته است [۲۵، ۲].

سپس پارامترهای فیزیکوشیمیایی نمونه‌های نانوامولسیون نظیر ویسکوزیته، هدایت الکتریکی و pH مورد بررسی قرار گرفتند که در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که انتظار می‌رفت، محلول‌های نانوامولسیون از ویسکوزیته پایینی برخوردار بودند که این خود یکی از ویژگی‌های نانوامولسیون‌ها می‌باشد. هم‌چنین ویسکوزیته نانوامولسیون‌ها با افزایش غلظت اسانس افزایش می‌یابد. با افزایش غلظت فاز روغنی، مولکول‌های آب در پیوندهای عرضی مولکول‌های سورفاکتانت محبوس شده، منجر به افزایش ویسکوزیته نانوامولسیون‌ها می‌شود. ویسکوزیته روغن نقش مهمی را در شکستن قطرات روغن بازی می‌کند؛ هر چه ویسکوزیته روغن بیش‌تر باشد، مدت زمان طولانی‌تری برای شکستن قطرات روغن سپری می‌شود [۳۱].

از آن جایی که در تهیه نانوامولسیون‌ها از سورفاکتانت غیر یونی استفاده شده است، فاکتور pH تأثیر چندانی روی فرمولاسیون‌های نانوامولسیون نداشت که نشان می‌دهد که قدرت یونی بی‌اثر بوده است و نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه برخی از محققین که اثرات pH را بررسی نموده‌اند، مطابقت دارد [۳۲-۳۳].

هدایت الکتریکی محلول‌های نانوامولسیون با افزایش غلظت اسانس افزایش می‌یابد که نشان دهنده پایداری بیش‌تر امولسیون‌ها در نمونه‌ها با غلظت کمتر اسانس می‌باشد. هم‌چنین در مطالعه دیگری که توسط Hassan در مورد اثر هدایت الکتریکی انجام گرفت، پایداری بیش‌تر امولسیون‌ها با کاهش غلظت و تأثیر دما گزارش شده است [۳۴]. به‌طور کلی همه نمونه‌ها دارای پایداری بالایی می‌باشند که این امر نشان می‌دهد که فاز آبی به عنوان فاز پیوسته می‌باشد، به‌این معنی که نانوامولسیون‌های تشکیل شده از نوع روغن در آب (O/W=Oil in Water) می‌باشد.

باتوجه به این‌که انحراف معیار نشان‌دهنده پراکندگی داده‌ها از مقدار میانگین می‌باشد و این مقدار در نمونه‌های درصد پایین‌تر اسانس (جدول ۱) کم‌تر است، نشانه نزدیک بودن داده‌ها به میانگین می‌باشد. هم‌چنین از آن جایی که مقادیر انحراف معیار در نمونه‌های با درصد حجمی بالاتر اسانس رو به افزایش است، می‌توان از نظر آماری این‌گونه استنتاج نمود که پراکندگی داده‌ها در نمونه‌های غلیظ‌تر بیش‌تر از نمونه‌های رقیق‌تر می‌باشد.

در مرحله بعدی سایز ذرات نانوامولسیون‌های سنتز شده با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که تغییر سایز ذرات نانوامولسیون در درصدهای حجمی متفاوت اسانس نعناع فلفلی از ۱ تا ۵ درصد چشم‌گیر نمی‌باشد، به‌طوری که متوسط اندازه آن‌ها در محدوده باریک بین ۱۱ تا ۱۳ نانومتر

می‌باشد که با افزایش غلظت اسانس سایز ذرات افزایش می‌یابد.

برای نمونه توزیع اندازه ذرات برای نانوامولسیون ۳ درصد نعناع فلفلی (۱۲/۲۱ نانومتر) در شکل ۱ آورده شده است. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود، توزیع اندازه ذرات نسبتاً باریک و در محدوده ۱۲ نانومتر می‌باشد. نتایج در این تحقیق توزیع اندازه ذرات نسبت به روش های سایر محققین بسیار کم‌تر به‌دست آمده است که یکی از مزایای مهم سیستم‌های امولسیونی می‌باشد. در تحقیقی که توسط Syed و همکارش انجام گرفت، یک سیستم امولسیونی اسانس کارواکرول (Carvacrol) و صمغ عربی با محدوده سایز ۲۰۰ نانومتر سنتز نمودند [۲].

سپس پایداری نمونه‌ها نسبت به پدیده‌های ناپایدار کننده امولسیون (تفکیک گرانشی، انبوهش، ادغام و رسیدگی استوالد)، برای مدت زمان طولانی (۱۲ ماه) بررسی شد که مشاهدات نشان داد که نمونه‌ها دارای پایداری بالایی می‌باشند. کوچک بودن اندازه ذرات نانوامولسیون موجب پایداری آن‌ها در برابر پدیده‌های تشکیل رسوب یا خامه ای شدن می‌شود، زیرا حرکت براونی و به تبع آن نرخ انتشار بیش‌تر از سرعت پدیده‌های تشکیل رسوب یا خامه ای‌شدن بر اثر نیروی وزن قطرات است.

در انتها به بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوامولسیون نعناع فلفلی در مقابل باکتری گرم منفی اکولای با استفاده از دو روش کمی واحد کلونی ساز و کیفی دیسک نفوذی پرداخته شد. برای نمونه، بر اساس محاسبات توضیح داده شده در بخش قبلی، همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، عملکرد ضد میکروبی نانوامولسیون نعناع فلفلی ۵ درصد، حدود ۸۹ درصد به‌دست آمد که نسبت به سایر سیستم‌های امولسیونی ضد میکروبی دارای اسانس طبیعی از خاصیت چشم‌گیری برخوردار است [۳۵]. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود، محلول‌های نانوامولسیون از خاصیت ضد میکروبی قابل توجهی برخوردارند و میزان خاصیت ضد میکروبی با افزایش درصد اسانس افزایش می‌یابد. هم‌چنین از لحاظ آماری، میزان پراکندگی داده‌ها در نمونه‌های ضد میکروبی بالاتر (۵ درصد اسانس)، بیش‌تر از نمونه‌های ضد میکروبی پایین‌تر می‌باشد (جدول ۲).

نتایج آزمون کمی ضد میکروبی در برابر باکتری اکولای در محیط کشت نیز در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، در حضور محلول نانوامولسیون ۵ درصد باکتری رشد ناچیزی کرده، در حالی که در غیاب آن رشد کامل باکتری مشاهده شد.

نتایج تست های کیفی ضد میکروبی نیز برای نمونه‌های سنتز شده نانوامولسیون حاوی ۱ تا ۵ درصد اسانس نعناع فلفلی و محلول شاهد در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشهود است، هاله‌ای اطراف دیسک نفوذی آغشته به محلول نانوامولسیون ۵ درصد اسانس نعناع فلفلی به دلیل عدم رشد باکتری ایجاد شده است. در حالی که اطراف دیسک نفوذی محلول شاهد، هیچ‌گونه هاله‌ای تشکیل نشده است که نشان‌دهنده فقدان خاصیت ضد میکروبی می‌باشد. به‌این معنی که در حضور محلول نانوامولسیون ۵ درصد باکتری رشد ناچیزی کرده، در حالی که در غیاب آن رشد کامل باکتری مشاهده می‌شود.

قطر هاله عدم رشد باکتری اکولای برای محلول‌های نانوامولسیون حاوی ۱ تا ۵ درصد اسانس نعناع فلفلی نیز

برای مقایسه در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود، محلول‌های نانوامولسیون از خاصیت ضد میکروبی قابل توجهی برخوردارند و میزان خاصیت ضد میکروبی با یک روند افزایشی با افزایش مقدار درصد اسانس مشاهده می‌شود که در واقع امکان جذب بهتر باکتری‌ها بر روی نانوامولسیون‌ها را فراهم می‌کند. از نظر آماری، میزان پراکندگی داده‌ها در آزمایشات کیفی ضد میکروبی برای کلیه نمونه‌های اسانس با غلظت‌های ۱ الی ۵ درصد از روند مشابهی برخوردار است و تفاوت چندانی ندارد و همگی به میزان میانگین بسیار نزدیک می‌باشند (جدول ۳). در تطابق با کار سایر محققین، در تحقیقی که توسط Singh و همکاران روی عصاره نعناع فلفلی انجام شده است، خواص آنتی‌باکتریال مناسبی بر علیه هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و منفی نیز گزارش شده است [۳۶].

به‌طورکلی، نانو مواد به دو روش مستقیم و غیر مستقیم می‌توانند منجر به غیرفعال سازی و مرگ باکتری شوند. در حالت مستقیم، نانو مواد یون‌هایی را آزاد می‌کنند که با گروه تیول پروتئین‌های موجود بر سطح سلول باکتری‌ها واکنش می‌دهند. این قبیل پروتئین‌ها از غشاء سلولی باکتری به سمت بیرون برآمدگی داشته و موجب انتقال مواد غذایی از دیواره سلول می‌شوند. نانو مواد این پروتئین‌ها را غیر فعال کرده، نفوذ پذیری غشاء را کاهش داده و سرانجام باعث مرگ سلولی می‌شود [۳۷-۳۸].

در واقع در این مکانیسم، تأثیر نانو ذرات بر روی باکتری‌ها از طریق آسیب به پروتئین، دزوکسی ریبونوکلئیک اسید (Deoxyribonucleic acid; DNA) و تخریب دیواره سلولی است. نانو ذرات می‌توانند با برهمکنش الکترواستاتیک که بین بار مثبت نانو ذره و غشاء سلول که دارای بار منفی است، به آن متصل شده و به دلیل حجم بزرگ نانو ذره در مقایسه با غشاء سلول، منجر به تخریب غشاء شوند. از طرف دیگر انباشتگی نانو ذرات در سیتوپلاسم سلول و روی غشاءهای خارجی آن می تواند از دیگر ساز و کارهای دخیل در جلوگیری از رشد و ادامه حیات باکتری باشد [۳۹].

از طرف دیگر نانو ذرات می‌توانند از طریق نیروهای الکترواستاتیک به DNA متصل شده و با نابود کردن پیوندهای هیدروژنی یا تولید پیوندهای جدید غیرعادی به DNA سلول آسیب رسانند. علت برخی از این تغییرات می‌تواند دگرگونی یک و یا چند واحد سازنده DNA سلول باشد که می‌تواند منجر به بی‌ثباتی و گسستگی ساختار آن شود [۴۰].

علاوه بر این، ثابت شده است که گونه‌های فعال اکسیژنی (Reactive Oxygen Species; ROS) مانند رادیکال‌های هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و آنیون‌های سوپراکسید که یکی از عوامل شرکت کننده در فرآیند نابودی باکتری از طریق تخریب غشاء آن هستند، حتی در غیاب اشعه ماورای بنفش نیز می‌توانند تولید شوند. یون‌های آزادشده در کنار این گونه‌های فعال می‌توانند از طریق نفوذ به پوشش سلول، تخریب غشاء آن و یا آسیب رساندن به DNA سلول از طریق اختلال در واحدهای سازنده آن موجب مرگ باکتری و جلوگیری از تکثیر آن‌ها شوند [۴۱].

بسیاری از محققان تأکید کرده‌اند که خاصیت آنتی باکتریال اجزاء اصلی اسانس‌ها به خاصیت آب گریزی (hydrophobic) آن‌ها و دیواره غشاء پلاسمایی میکروب بستگی دارد. افزایش مقدار برخی یون‌های ویژه بر روی و یا

داخل غشاء پلاسمایی تأثیر وسیعی بر روی نیروی محرکه پروتون‌ها، میزان آدنوزین تری فسفات (Adenosine Triphosphate; ATP) درون سلولی و فعالیت کلی سلول‌های میکروبی (شامل کنترل فشار ورم سلول‌های زنده، انتقال مواد حل شونده و تنظیم متابولیسم) دارد [۴۳-۴۲]. نتیجه اینکه اسانس‌ها، مکانیسم عمل یک‌سانی نداشته و ممکن است از طرق مختلف باعث جلوگیری از رشد باکتری‌ها شوند.

در اغلب تحقیقاتی که بر روی مکانیسم عمل ترکیبات فنولیک انجام شده است، اکثراً صحبت از تأثیر اسانس‌ها بر غشاء سلولی می‌باشد. در حقیقت ترکیبات فنولی نه تنها به غشاء سیتوپلاسمی حمله می‌کنند، حتی به موجب آن باعث تخریب قابلیت نفوذپذیری غشاء شده و نیز باعث آزاد شدن اجزای اصلی داخل سلول (مثل ریبوز و گلوتامات سدیم و غیره) می‌شوند و نیز می‌توانند تخریب عملکرد در زمینه انتقال الکترون، جذب مواد مغذی، سنتز نوکلئیک اسید و هم‌چنین فعالیت آنزیم ATPase را به همراه داشته باشند [۴۳-۴۴].

لذا با توجه به این که آزمون ضد میکروبی انجام شده در محیط مایع و امولسیونی و بدون تابش فرابنفش صورت گرفته و نتیجه نهایی فعالیت بالای نانو ذرات را نشان می‌دهد، می‌توان این گونه استنتاج نمود که در اینجا نانوامولسیون نعناع فلفلی به طور مستقیم غشاء باکتری را تخریب کرده و باعث از بین بردن آن شده است که این پدیده نشان دهنده مؤثر بودن سیستم ضد میکروبی سنتز شده می‌باشد. ذکر این نکته ضروری می‌باشد که بررسی مکانسیم دقیق عملکرد ضد میکروبی نانوامولسیون سنتز شده نیاز به تحقیقات گسترده‌ای دارد که با توجه به محدودیت‌های دستگاهی موجود از جمله الکترون اسپین میکروسکوپی (*Electron spin microscopic*) در حال حاضر امکان پذیر نمی‌باشد.

نتیجه‌گیری

نانوامولسیون‌ها یکی از امیدبخش‌ترین ساختارها برای بهبود حلالیت و افزایش ارزش زیستی و عملکردی ترکیبات آب گریز می‌باشند. ایجاد مواد ضد میکروبی بر مبنای اسانس‌های طبیعی، زمینه ساز بسیاری از کاربردهای پزشکی، بهداشت، محیط زیست و غذا می‌باشد. در این تحقیق نانوامولسیون‌های محتوی اسانس گیاهی نعناع فلفلی تهیه شدند. نتایج نشان داد که متوسط اندازه نانو ذرات ۱۲ نانومتر با پایداری بالا برای مدت زمان ۱۲ ماه می‌باشند. خواص ضد میکروبی نانوفرمولاسیون‌های ساخته شده در برابر باکتری گرم منفی اکولای نشان داد که آنها با دارا بودن خواص نانویی از خواص ضد میکروبی قابل توجهی برخوردار هستند.

تشکر و قدردانی

از حمایت مالی پژوهشگاه مواد و انرژی در انجام این پروژه تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی با کد ۷۲۱۳۹۲۰۰۹ تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

[1] Sinha R, Karan R, Sinha A, Khare S. Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells. *Bioresour Technol* 2011; 102(5): 1516-20.

[2] Syed I, Sarkar P. Ultrasonication-assisted formation and characterization of Geraniol and Carvacrol-loaded emulsions for enhanced antimicrobial activity against food-borne pathogens. *Chemical Papers* 2018; 1(1): 1-14.

[3] Steward FC. *Growth, Nutrition, and Metabolism of Mentha Piperita L: Parts I-VII*. New York State College of Agriculture: Cornell University Agricultural Experiment Station; 1962; 20-27.

[4] Thomas J, Jerobin J, Seelan SJ, Thanigaivel S, Vijayakumar S, Mukherjee A, et al. Studies on pathogenecity of *Aeromonas salmonicida* in catfish *Clarias batrachus* and control measures by Neem nanoemulsion. *Aquaculture* 2013; 396-9: 71-75.

[5] Singha R, Sonib SK, Patela RP, Kalrab A. Technology for improving essential oil yield of *Ocimum Basilicum L.* (sweet basil) by application of bioinoculant colonized seeds under organic field conditions. *Ind Crops Prod* 2013; (45): 335-42.

[6] Herro E, Jacob SE. Mentha piperita (peppermint). *Dermatitis* 2010; 21(6): 327-9.

[7] Jalali M, Abedi D, Ghasemi Dehkordi N, Charmahali A. Evaluation of antibacterial activity of ethanol extracts of some medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *J Shahrekord Univ* 2006; 8(3): 25-33.

[8] Kaper JB, James P, Nataro JB, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia Coli Nat Microbiol* 2004; 2(1): 123-40.

[9] Janssen AM, Scheffer JJC, Baerheim A. Antimicrobial activity of essential oil: a 1976-86 literature review. aspects of the test methods. *Planta Med* 1987; 53(1): 395-8.

[10] Rahman MA, Bari MA. Antibacterial activity of cell suspension cultures of *Castor (Ricinus communis L.* cv. *Roktima*). *European J Med Plants* 2013; 3(1): 65-77.

[11] Conlon BP, Nakayasu ES, Fleck LE, LaFleur MD, Isabella VM, Coleman K, et al. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature* 2013; 503(7476): 365-70.

[12] Solans C, Solé I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2012; 17(1): 246-54.

[13] Benoit JP, Joly-Guillou ML, Rossines E, Saulnier P. Nanocapsulation of essential oils for preventing or curing infectious diseases alone or with an antibiotic, *Patent WO 2012114201 A1*; 2012.

[14] Frewer LJ, Norde W, Fischer ARH, Kampers FWH. Nanotechnology in the Agri-Food sector-implications for the future, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. *KGaA* 2011: 75-87.

[15] Pavela R. Insecticidal and repellent activity of selected essential oils against of the pollen beetle, *Meligethes Aeneus* (Fabricius) adults. *Ind Crops Prod* 2011; 34(1): 888-92.

[16] Combrinck S, Regnier T, Kamatou GPP. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Ind Crops Prod* 2011; 33(1): 344-9.

[17] Rachmawati H, Budiputra DK, Mauludin R. Curcumin Nanoemulsion for transdermal application: formulation and evaluation, *Drug Dev. Ind. Pharm* 2015; 41(4): 560-66.

[18] Akhilesh D, Bini KB, Kamath JV. Review on span-60 based non-ionic surfactant vesicles (niosomes) as novel drug delivery. *Int J Res Pharm Biomed Sci* 2012 (3): 6-12.

[19] Koul O, Walia S, Dhaliwal GS. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International* 2008; 4(1): 63-84.

[20] Baker JR, Wright DC, Hayes MM, Hamouda T, Brisker J. Method for inactivating bacteria including bacterial spores *U. S. Patent # 6015832;* 2000.

[21] Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech* 2015; 5(2): 123-17.

[22] Sanguansri L, Oliver CM, Leal-Calderon F. Nanoemulsion technology for delivery of nutraceuticals and functional-food ingredients, *Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences*, First Edition, John Wiley & Sons, Ltd., 2013; 667-96.

[23] Riddle P. pH Meters and their electrodes: calibration, maintenance and use. *Biomed. Sci* 2013; 2(1): 202-5.

[24] Merkus HG. *Particle Size Measurements: Fundamentals, Practice, Quality*, 1st ed. The Netherlands: Springer; 2009; 14-42.

[25] Ghosh V, Mukherjee M, Chandrasekaran N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity, *Ultrason Sonochem* 2013; 20(1): 338-44.

[26] Sieuwerts S, De Bok FA, Mols E, De Vos WM, Vlieg JE. A simple and fast method for determining colony forming units. *Lett Appl Microbiol* 2008; 47(4): 275-8.

[27] Lee S, Peterson CJ, Coats JR. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J Stored Prod Res* 2003; 39(1): 77-85.

[28] Tholl D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 2006; 9(3): 297-304.

[29] Tassou C, Koutsoumaris K, Nychas GJE. Inhibition of salmonella enteritidis and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Res Int* 2000; 33(3-4): 273-80.

[30] Nielloud F, Marti-Mestres G. *Pharmaceutical emulsions and suspensions*, 1st ed. USA: Marcel Dekker; 2000: 19-73.

[31] Tadros T. *Emulsion Formation and Stability*, 1st ed.

Wheinheim, 1st ed. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.; 2013; 37-52.

[32] de Morais JM, Santos ODH, Delicato T, Rocha-filho P. Characterization and evaluation of electrolyte influence on Canola oil/water nano□emulsion. *J Disper Sci Technol* 2006; 27(7): 1009-14.

[33] Qian C, Decker EA, Xiao H, McClements DJ. Physical and chemical stability of b-carotene-enriched nanoemulsions: influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chem* 2012; 132(1): 1221-29.

[34] Hassan AK. Effective surfactants blend concentration determination for O/W emulsion stabilization by two nonionic surfactants by simple linear regression. *Indian J Pharm Sci* 2015; 77(4): 461-69.

[35] Sugumar S, Ghosh V, Nirmala MJ, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. *Ultrason Sonochem* 2014; 21(3): 1044-49.

[36] Singh R, Shushni MAM, Belkheir A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arab J Chem* 2015; 8(1): 322-28.

[37] Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci* 2004; 275(1): 177-82.

[38] Feng Q, Wu J, Chen G, Cui F, Kim T, Kim J. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver Ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 2000; 52(4): 662-68.

[39] Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memic A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: A comparative study. *Int J Nanomedicine* 2012; 7(1): 6003-9.

[40] Li Y, Chen X, Gu N. Computational investigation of interaction between nanoparticles and membranes: hydrophobic/ hydrophilic effect. *The Journal of Physical Chemistry B* 2008; 112(51): 16647-53.

[41] Leung YH, Chan CM, Ng AM, Chan HT, Chiang MW, Djurišić AB, Ng YH, Jim WY, Guo MY, Leung FC, Chan WK, Au DT. 2012. Antibacterial activity of ZnO nanoparticles with a modified surface under ambient illumination. *Nanotechnology* 2012; 23(47): 475703 (12pp).

[42] Bupesh G, Amutha C, Nandagopal S, Ganeshkumar A, Sureshkumar P, Murali KS. Antibacterial activity of *Mentha piperita L.* (peppermint) from leaf extracts – a medicinal plant. *Acta Agric Slov* 2007; 89(1): 73-79.

[43] Alvandi K, Sharifan. A, Aghazadeh Meshgi M. Study of chemical composition and antimicrobial activity of peppermint essential oil. *Journal of Comparative Pathobiology* 2011; 7(4): 355-64.

[44] Beyth N, Houri-Haddad Y, Domb A, Khan W, Hazan R. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *J Evid -Based Complementary Altern Med* 2015; Article ID: 246012 (16pp).

The Antimicrobial Effects of Hydro-Extract of *Mentha Piperita Lamiaceae* Essential Oil Nanoemulsion on Gram-negative Bacteria of *Escherichia coli*: A Laboratory Study

M. Heydari[1], M. Bagheri[2]

Received: 22/09/2018 Sent for Revision: 23/10/2018 Received Revised Manuscript: 23/02/2019 Accepted: 27/02/2019

Background and Objectives: Since infectious microbial diseases belong to the most common sicknesses in the world, it is necessary to discover and explore new antibacterial materials. *Mentha Piperita Lamiaceae* is one of the most consumed medicinal plants in the world; having outstanding antimicrobial, pesticide, antiparasitic, antifungal and therapeutic properties. Therefore, aim of this study was to determine the antimicrobial effects of hydroalcoholic extract of *Mentha piperita* essential oil nanoemulsions against gram-negative bacteria of *E.coli*.

Materials and Methods: In this laboratory study, *Mentha piperita* essential oil and tween 80 were mixed by ultrasonification. Then parameters of surfactant concentration, essential oil percentage, and sonication time were studied. The size of nanoemulsion formulations were then analyzed by dynamic light scattering. The antibacterial activity against gram-negative bacteria, i.e. *E.coli* was studied using 2 different quantitative and qualitative methods of Colony Forming Unit (CFU) and Disc Diffusion Method (DDM), respectively. The results were reported as mean ± standard deviation.

Results: The nanoemulsion formulations were obtained in the concentration ranges of 1 to 5 percent *Mentha piperita* essential oil with the mean droplets size of about 12 nm and antibacterial activity of quantitative method of around 75 percent (based on CFU) and qualitative method of 3.12 mm inhibitory zone diameter around the disc (based on DDM) against gram-negative bacteria of *E.coli*.

Conclusion: The nanoemulsion system was appropriately stable and showed high antibacterial activity against gram-negative bacteria, i.e. *E.coli*, in which with increasing essential oil concentration, a significant increase in antibacterial activity was observed. Therefore, it seems that synthesized nanoemulsion formulations have remarkable antibacterial activity with nano-scale properties.

Key words: Antibacterial, Nanoemulsion, *Mentha piperita* oil, Surfactant, Ultrasonics

Funding: This research was funded by Materials and Energy Research Center.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Materials and Energy Research Center (Research Deputy Office) approved the study (Ethical number: 721392009).

How to cite this article: Heydari M, Bagheri M. The Antimicrobial Effects of Hydro-Extract of *Mentha Piperita Lamiaceae* Essential Oil Nanoemulsion on Gram-negative Bacteria of *Escherichia coli*: A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2019; 18 (6): 515-28. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran
ORCID: 0000-0003-2239-3864
(Corresponding Author) Tel: (+98 26) 36280040, Fax: (+98 26) 36201888, E-mail: m.heydari@merc.ac.ir
2- Assistant Prof., Dept. of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran
ORCID: 0000-0002-9771-0169