

## Antibacterial and antioxidant activity of oil-in-water nanoemulsion of *Mentha pulegium* essential oil and extract

Ashgan Zandiyeh<sup>1</sup>, Negar Motakef Kazemi<sup>1</sup>, Nabi Shariatifar<sup>2</sup>, Ali Salimi<sup>3</sup>, Raheleh Halabian<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

<sup>2</sup> Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>3</sup> Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>4</sup> Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

### Abstract

**Background:** The medical application of oil-in-water nanoemulsion has been expanded due to its special properties. Nanoemulsions based on medicinal plants are important because of the simple and fast preparation method, high efficiency, and economic efficiency.

**Materials and methods:** In this study, the oil-in-water nanoemulsion was prepared containing *Mentha pulegium* essential oil as the oil phase, *Mentha pulegium* extract as the aqueous phase, and span 80 surfactant for 30 minutes using homogenizer. The properties of samples were investigated. Chitosan was used as the natural biological material to modify the optimal nanoemulsion due to its biocompatibility, biodegradability, and antibacterial properties. The samples were evaluated by methods of dynamic light scattering (DLS) to investigate size and size distribution, transmission electron microscopy (TEM) to measure size and shape, and zeta potential to determine stability. Antibacterial activity, antioxidant activity, and cytotoxicity of the samples were investigated.

**Results:** The results of the antibacterial activity of the essential oil, its extract, and nanoemulsions against gram-negative bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) and gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) showed that these materials are suitable candidates instead of chemical drugs to deal with strains. The antioxidant activity of the samples was observed based on the measurement of total phenolic compounds and free radical inhibition. Also, the samples are not cytotoxic on healthy cells.

**Conclusion:** Based on the results, oil-in-water nanoemulsion containing essential oil as the oily phase and extract as the aqueous phase can be suitable candidates for pharmaceutical and medical applications.

**Keywords:** Nanotechnology, Nanoemulsion, *Mentha pulegium*, Extract, Essential oil.

**Cited as:** Zandiyeh A, Motakef Kazemi N, Shariatifar N, Salimi A, Halabian R. Antibacterial and antioxidant activity of oil-in-water nanoemulsion of *Mentha pulegium* essential oil and extract. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 33(4): 355-364.

**Correspondence to:** Dr. Negar Motakef Kazemi I

**Tel:** +98 2122006660

**E-mail:** motakef@iaups.ac.ir

**ORCID ID:** 0000-0002-2161-2941

**Received:** 2 Jun 2023; **Accepted:** 13 Aug 2023

## فعالیت ضدباکتری و ضداکسیدانی نانوامولسیون روغن در آب اسانس و عصاره پونه

اشگان زندیه<sup>۱</sup>، نگار معتکف کاظمی<sup>۱</sup>، نبی شریعتی فر<sup>۲</sup>، علی سلیمی<sup>۳</sup>، راحله حلبیان<sup>۴</sup><sup>۱</sup> گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران<sup>۲</sup> گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران<sup>۳</sup> مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه بقیه الله (عج)، تهران، ایران<sup>۴</sup> مرکز تحقیقات علوم میکروبی، دانشگاه بقیه الله (عج)، تهران، ایران

## چکیده

**سابقه و هدف:** کاربرد پزشکی نانوامولسیون روغن در آب به دلیل خواص ویژه گسترش یافته است. نانوامولسیون‌ها بر پایه گیاهان دارویی به دلیل روش تهیه ساده و سریع، کارایی بالا، و صرفه اقتصادی مهم هستند.

**روش بررسی:** در این پژوهش نانوامولسیون روغن در آب حاوی اسانس پونه به عنوان فاز روغنی، عصاره پونه به عنوان فاز آبی، و سورفکتانت اسپن ۸۰ به مدت ۳۰ دقیقه توسط هموژنایزر تهیه شد. خواص نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. کیتوزان به دلیل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، و خواص ضدباکتری به عنوان ماده زیستی طبیعی جهت اصلاح نانوامولسیون بهینه استفاده شد. نمونه‌ها با روش‌های پراکندگی نور دینامیکی (DLS) جهت بررسی اندازه و توزیع اندازه، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای سنجش اندازه و شکل، و پتانسیل زتا برای تعیین پایداری ارزیابی شدند. فعالیت ضدباکتری، فعالیت ضداکسیدانی، و سمیت سلولی نمونه‌ها بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج فعالیت ضدباکتری اسانس، عصاره، و نانوامولسیون‌ها علیه باکتری گرم منفی اشرشیاکلی (*E. Coli*) و باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (*S. Aureus*) نشان داد که این مواد کاندید مناسب بجای داروهای شیمیایی جهت مقابله با سویه‌ها هستند. فعالیت ضداکسیدانی نمونه‌ها بر اساس سنجش ترکیبات فنولی تام و مهار ادیکال آزاد مشاهده شد. همچنین نمونه‌ها سمیت سلولی روی سلول‌های سالم ندارند.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج، نانوامولسیون روغن در آب حاوی اسانس به عنوان فاز روغنی و عصاره به عنوان فاز آبی می‌تواند کاندید مناسبی برای کاربردهای دارویی و پزشکی باشد.

**واژگان کلیدی:** نانوفناوری، نانوامولسیون، پونه، عصاره، اسانس.

## مقدمه

نانوفناوری در زمینه‌های مختلف پیشرفت چشمگیر دارد. در طول سال‌های گذشته، میکروامولسیون‌ها به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد مانند سهولت در آماده‌سازی، شفافیت و پایداری طولانی مدت توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (۱). در سال‌های اخیر نانوامولسیون‌ها به دلیل کاربردهای بالقوه در صنایع مختلف مانند مواد غذایی، آرایشی، دارویی و کشاورزی

مورد مطالعه گسترده قرار گرفته‌اند (۲، ۳). نانوامولسیون‌ها به عنوان واسطه امولسیون‌ها و میکروامولسیون‌ها معمولاً در محدوده اندازه ۲۰ تا ۵۰۰ نانومتر در نظر گرفته می‌شوند (۴-۶). اندازه کوچک نانوامولسیون می‌تواند باعث افزایش نفوذ یا جذب توسط سلول‌ها شود (۷). طبقه‌بندی اصلی نانوامولسیون شامل روغن در آب یا آب در روغن است (۸-۱۰). اجزای امولسیون شامل بخش چربی دوست در فاز روغنی و بخش آبدوست در فاز آبی در حضور امولسیفایر جهت حفظ پایداری است. اندازه قطرات تولیدی در نانوامولسیون وابسته به ترکیب اجزا و روش همگن‌سازی است. نانوامولسیون‌ها را می‌توان با روش‌های امولسیون‌سازی با انرژی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران،

نگار معتکف کاظمی (email: motakef@iaups.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0002-2161-2941

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۳/۱۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۵/۲۲

در این پژوهش نانومولسیون حاوی عصاره و اسانس پونه تهیه و فعالیت ضدباکتری، ضداکسیدانی، و سمیت سلولی آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روشها

### مواد و تجهیزات

نمونه برداری از گیاه پونه از مناطق بکر پُلکو از توابع شهرستان سنگر در استان گیلان انجام شد و پس از تأیید در بخش هرباریوم دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران ۱۶۳۴-AUPF در سایه و به دور از نور مستقیم خورشید و در شرایط استاندارد خشک شد. اسپین ۸۰ و کیتوزان از مرک (آلمان) خریداری شد.

دستگاه هموژنایزر مدل Heidolph ساخت کشور آلمان برای تهیه نانومولسیون استفاده شد. اسپکتروفوتومتر مدل GENESYS 30 ساخت کشور آمریکا استفاده شد. دستگاه پراکندگی نور دینامیکی مدل Quadix ساخت کشور کره جنوبی برای ارزیابی اندازه و توزیع اندازه نانومولسیون استفاده شد. میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل Zeiss-EM10C-100 KV ساخت کشور آلمان برای بررسی شکل و اندازه نانومولسیون استفاده شد.

مقاله مستخرج از پایان نامه با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1398.064 است.

### روشها

#### اسانس گیری

برای اسانس گیری ابتدا ۱۰۰ گرم از گیاه پونه در یک بالن ۲ لیتری ریخته و به آن کمی بیشتر از نصف حجم بالن آب اضافه شد. سپس با دستگاه کلونجر عمل اسانس گیری با اعمال حرارت به مدت ۳ ساعت تا زمان ثابت ماندن سطح اسانس انجام شد. در نهایت آگیری اسانس توسط سولفات سدیم انیدر برای افزایش کیفیت انجام شد و نمونه نهایی در ظرف شیشه‌ای درب بسته و با فویل پوشیده در یخچال نگهداری شد.

#### عصاره گیری

برای عصاره گیری پودر گیاه پونه با نسبت ۱ نمونه به ۱۰ حلال در یک بالن ژوژه ریخته و به مدت ۶ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد و دور چرخش ۷۰۰ rpm حرارت داده شد. سپس عصاره با کاغذ صافی صاف شده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری می‌شود. لازم به ذکر است که اگر حلال آب باشد عصاره آبی، و اگر ۸۰ درصد متانول باشد عصاره متانولی است. تهیه عصاره فراکشن متانولی مشابه عصاره متانولی است با این تفاوت که به مدت ۴۸ ساعت تحت همزدن در دما محیط و دور از نور قرار داده شد. سپس مخلوط صاف شده و در ظرفی دربدار

بالا یا انرژی کم تهیه کرد. هموژنایزر فشار بالا یکی از روشهای پر انرژی برای تشکیل نانومولسیونها است (۱۱، ۱۲). نانومولسیونها به دلیل اندازه کوچک مزایایی مانند شفافیت نوری بالاتر، پایداری بالاتر و فراهمی زیستی افزایش یافته ترکیبات چربی دوست دارند (۱۳). با این حال، کاربرد پزشکی نانومولسیون به دلیل خطرات بالقوه مانند سمیت برخی از اجزا به عنوان مثال سورفکتانتها، امکان استفاده برخی ترکیبات زیست فعال و اثرات نامطلوب بر سلامت انسان محدود می‌شود (۱۴، ۱۵).

امروزه نانوفناوری در کاربردهای ضدباکتری به عنوان رویکردی برای حذف یا کاهش فعالیت میکروارگانیسمها گسترش یافته است (۱۶، ۱۷). گیاهان دارویی به عنوان عوامل ضدباکتری طبیعی برای افزایش اثربخشی و مهار رشد باکتری استفاده می‌شوند (۱۸، ۱۹). به کارگیری اسانس به عنوان ترکیب طبیعی مستخرج از گیاه با فعالیت ضد میکروبی برای پاسخ به نگرانی‌های مصرف کننده جهت ایمنی افزودنی‌های خوراکی مصنوعی به شدت افزایش یافته است (۲۰). کاربرد اسانسها در نانومولسیونها با کاربرد ضدباکتری جایگاه ویژه‌ای دارد (۲۱-۲۳). اسانسها به عنوان مواد فرار می‌توانند خواص درمانی و دارویی ایجاد کنند (۲۴، ۲۵). گسترش کاربرد ضداکسیدانی ترکیبات گیاهی (۲۶) و نانومواد (۲۷) برای جلوگیری از اکسیداسیون واکنش شیمیایی با توانایی تولید رادیکالهای آزاد و ایجاد واکنشهای زنجیره‌ای با امکان آسیب به سلولهای موجودات زنده حائز اهمیت است (۲۸). سم شناسی نانومواد عبارت از مطالعه برهم کنشهای این مواد با سامانه‌های زیستی برای ارائه رابطه‌ای منطقی بین ویژگی فیزیکوشیمیایی و پاسخهای زیستی آنها می‌باشد. فعالیت زیستی و سمیت نانومواد ارتباط مستقیم با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مانند اندازه، شکل، نسبت سطح به حجم، تراکم، نقص‌های سطحی و ساختاری دارد (۲۹).

امروزه ترکیبات گیاهی با توجه به نگرانی‌ها در ارتباط با داروهای شیمیایی به طور ویژه‌ای مورد توجه قرار گرفته است. گیاه پونه با نام علمی *Mentha pulegium* و نام محلی خالواش یکی از گونه‌های خانواده نعناعیان است و کاربردهای فراوان به عنوان تسهیل کننده فرآیند قاعدگی، مسکن، مُدر، مُعرق، و باد شکن معده دارد (۳۰). وجود ترکیبات فنولی به خصوص ترکیبات فلاونوئیدی در این گیاه باعث خواص بالقوه مذکور و خاصیت ضداکسیدانی می‌شود (۳۱-۳۳). امروزه کاربرد زیست پزشکی نانومولسیونها بر پایه گیاهان به دلیل خواص منحصر به فرد گسترش یافته است (۳۴-۳۹). از این رو

نگهداری شد و بار دیگر به آن متانول اضافه و روند ذکر شده به مدت ۴۸ ساعت دیگر تکرار شد. سپس مخلوط صاف شده و هر دو عصاره با یکدیگر مخلوط شده و درون روتاری تحت شرایط خلاء و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده تا به پودر همان فراکشن متانولی تبدیل شود. سپس برای بدست آوردن فراکشن آبی ابتدا ۱۰ گرم از پودر متانولی تام را درون ارلن ۵۰۰ میلی لیتری ریخته و به آن ۲۰۰ میلی لیتر این هگزان اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت تحت همزدن بدون دما قرار گرفت. سپس محلول حاصله را با کاغذ صافی شده و به مواد باقیمانده ۲۰۰ میلی لیتر دی کلرومتان افزوده و به مدت ۲۴ ساعت همزده و سپس صاف شد. سپس به آن اتیل استات افزوده و همین روند تکرار شد. در نهایت به همین روش با اضافه کردن آب مقطر عصاره حاصله فراکشن آبی خواهد بود.

### تهیه نانوامولسیون

سه ماده اساسی شامل فاز پیوسته، فاز پراکنده و سورفکتانت برای تهیه نانوامولسیون نیاز است. بر اساس نتایج قبل نسبت‌های مختلف اجزای نانوامولسیون‌ها ارزیابی و گزارش شد (۳۴). به منظور تهیه نانوامولسیون از ۲ میلی لیتر اسپن ۸۰ به عنوان سورفکتانت، ۴۴ میلی لیتر عصاره پونه به عنوان فاز پیوسته، ۴ میلی لیتر اسانس پونه به عنوان فاز پراکنده با دستگاه هموژنایزر به مدت ۳۰ دقیقه با دور rpm1900 استفاده شد. مراحل تهیه نانوامولسیون حاوی کیتوزان مشابه قبل است با این تفاوت که در حضور محلول یک درصد کیتوزان و یک درصد اسیداستیک است. در نهایت نمونه‌ها شامل اسانس S1 (E O)، عصاره آبی (W.E) S2، عصاره متانولی S3 (M.E)، فراکشن آبی S4 (W.F)، فراکشن متانولی S5 (M.F)، نانوامولسیون عصاره آبی S6 (W.E.N)، نانوامولسیون عصاره متانولی S7 (N.M.E)، نانوامولسیون فراکشن آبی S8 (N.W.F)، نانوامولسیون فراکشن متانولی S9 (N.M.F)، و نانوامولسیون عصاره آبی با کیتوزان S10 (W.E.N.CH) ارزیابی شدند.

### بررسی فعالیت ضدباکتری

فعالیت ضدباکتری علیه باکتری گرم منفی و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمده از دانشگاه آزاد اسلامی بررسی شد. برای انجام تست MIC ابتدا مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت را درون هر چاهک ریخته سپس به هر چاهک مقدار ۱۰ میکرولیتر باکتری فعال شده افزوده و در ادامه ۳ غلظت متفاوت از اسانس، عصاره و نانوامولسیون‌ها اضافه می‌کنیم. در نهایت پلیت‌ها را درون انکوباتور شیکردار گذاشته و بعد از طی ۲۴ ساعت جذب نوری آنها را در طول موج ۶۲۰ nm خواندیم به دلیل تعداد بالای نمونه‌ها در ۳ غلظت متفاوت و ۳ بار تکرار از

پلیت‌های ۹۶ خانه استفاده شده است. پس از مشخص شدن مقدار بهینه در تست MIC، در تست MBC یک دوز بالاتر انتخاب می‌شود. در این تحقیق از روش چاهک گذاری استفاده شد. برای این کار در ابتدا در دو پلیت حاوی محیط کشت مولر هیلتون آگار به صورت جداگانه، به کمک سر سمپلر آبی و با رعایت فواصل کافی چاهک ایجاد شد، سپس باکتری‌های مورد نظر را با رعایت تمام موارد ایمنی در این دو پلیت به صورت جداگانه و به روش کشت چمنی کشت شد. پس از این کار برای باکتری *E.Coli* مقدار ۴۰  $\mu$ L از اسانس، عصاره‌ها و نانوامولسیونها به همراه ۱۶۰  $\mu$ L آب مقطر مخلوط و درون هر چاهک ریخته شد و همین کار را برای باکتری *S.Aureus* انجام شد با این تفاوت که مقدار ماده موثره و مقدار آب مقطر اضافه شده به ترتیب ۵۰ و ۱۲۰ میکرولیتر بوده است. دلیل اضافه کردن آب مقطر نیز جلوگیری از خشک شدن سریع نمونه‌های درون چاهک پس از گذاشتن نمونه‌ها درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد می‌باشد.

### بررسی فعالیت ضداکسیدانی

بررسی فعالیت ضداکسیدانی با اندازه‌گیری ترکیبات فنولی تام و ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) انجام شد. میزان ترکیبات فنولی تام با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد و نتایج برحسب میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان شد. اساس کار در این روش، احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۰ نانومتر نشان می‌دهد. به طور خلاصه در این روش، ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره درون لوله آزمایش با ۱/۱۶۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شدند. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰٪ وزنی/حجمی) به محتوای لوله آزمایش افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن و پس از گذشت ۳۰ دقیقه در تاریکی جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد.

میزان فلاونوئید تام به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. اصول روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید، تشکیل کمپلکس‌های اسیدی آلومینیوم کلرید با گروه کتو و یا گروه هیدروکسیل فلاونوئیدها است که این ترکیبات بیشترین جذب را در طول موج ۴۱۵ نانومتر دارند. در این روش میزان ۰/۵ میلی لیتر از محلول عصاره با ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۹۵٪، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید. بعد از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، جذب مخلوط در ۴۱۵

به‌عنوان نشانگر سلول‌های زنده مورد استفاده قرار می‌گیرد. بدیهی است که با افزایش غلظت رنگ تولید شده در سلول‌ها، میزان جذب خوانده شده در دستگاه الیزا را بدر افزایش می‌یابد.

در این پژوهش سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش برای بررسی سمیت سلولی استفاده شد. ابتدا محیط کشت روی سلول‌ها توسط سمپلر خالی شد. سپس ته فلاسک را با ۴ میلی لیتر مخلوط PBS/EDTA شست و شو داده شد. در مرحله سوم به آنها مقدار ۰٫۵ میلی لیتر آنزیم تریپسین مستقیماً به ته فلاسک اضافه کرده و فلاسک را به صورت عدد ۸ انگلیسی حرکت داده و مدت زمان کوتاهی آن را درون انکوباتور گذاشته شد. سپس فلاسک خارج و محتویات آن را درون یک فالکون ۱۵ میلی لیتری ریخته شد. در مرحله چهارم فالکون را درون دستگاه سانتریفیوژ گذاشته و پس از تنظیم کردن دستگاه (به مدت ۵ دقیقه، ۱۲۰۰ دور در دقیقه) روشن شد. در مرحله پنجم، به دلیل نیروی گریز از مرکز سلول‌ها در ته فالکون ته‌نشین شدند، به همین دلیل ابتدا سطح رویی را به آرامی خالی شد و سپس مقداری محیط کشت DMEM و یا FBS به آن اضافه شد تا آنزیم تریپسین خنثی شود. در مرحله ششم، مقداری محیط کشت غنی شده (DMEM، FBS و Pen/Strep) به آن اضافه شد. مرحله هفتم، در ادامه مقدار ۱۰۰  $\mu\text{L}$  محیط کشت دارای سلول، مقدارهای ۲، ۱۰، ۲۰، ۵۰  $\mu\text{L}$  از نمونه‌ها که بیانگر غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۱۰۰، ۲۵۰  $\mu\text{g/ml}$  می‌باشند را درون چاهک‌های پلیت ریخته و در نهایت پلیت‌ها را درون انکوباتور ۳۷ درجه همراه با  $\text{CO}_2$  ۵ درصد گذاشته تا تست سمیت سلولی آن‌ها را در روزهای ۱، ۳ و ۵ انجام شود. برای انجام تست MTT ابتدا محیط کشت رویی را کاملاً خالی و سپس به هر یک از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر MTT رقیق شده اضافه و به مدت ۳ ساعت پلیت را درون انکوباتور گذاشته شد. سپس پلیت را بیرون آورده و محیط حاوی MTT رقیق شده به دقت و با سمپلر خالی کرده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد و پیتاژ کرده و بعد از چند دقیقه میزان جذب آن را به کمک دستگاه الیزا در طول موج بین ۵۷۰ تا ۶۳۰ نانومتر با ارتباط مستقیم با تعداد سلول‌های زنده بررسی شد.

### تحلیل آماری

کلید آمون‌ها به‌صورت Triplicate و با ۳ مرتبه تکرار به‌انجام رسیدند. نتایج به‌دست آمده و میزان بقای سلولی به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (mean  $\pm$  SD) مورد استفاده قرار گرفت. در آنالیز واریانس، با دامنه طبیعی‌سازی و خطای معیار و معنی‌داری با اختلاف در سطح  $p < 0.01$ ،  $p < 0.01$  و  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

نانومتر خوانده شد. از کوئرستین به منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج برحسب میلی‌گرم کوئرستین در ۵۰ گرم پودر خشک گیاه پونه بیان شد.

۲.۲\_ دی‌فنیل\_۱\_پیکریل‌هیدرازیل یا DPPH، رادیکال چربی دوستی است که دارای جذب بیشینه در طول موج ۵۱۷ نانومتر است. در آزمون DPPH، گروه‌های هیدروکسیل ترکیبات آنتی-اکسیدانی با دادن H به رادیکال‌های آزاد DPPH منجر به کاهش مولکول‌های DPPH می‌شوند که با تغییر رنگ محلول واکنش از رنگ بنفش تیره به زرد روشن همراه است. در نتیجه جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر کاهش می‌یابد. جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر بیانگر مقدار DPPH باقیمانده است. برای این منظور، محلولهایی با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از عصاره و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT (Butylated hydroxytoluene) در حلال متانول آماده شدند. یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت یک میلی‌مولار معادل با ۰٫۳۹۴ میلی‌گرم) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت همزده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت، میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد لازم به ذکر است که در نمونه کنترل، عصاره با ۳ میلی‌لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$I\% = ((Ac - As) / Ac) \times 100$$

که در این رابطه Ac و As به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه است.

### بررسی سمیت سلولی

سمیت سلولی پس از کشت سلول و خواندن میزان جذب نوری سلول‌ها توسط دستگاه الیزا را بدر انجام شد. آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی جهت ارزیابی فعالیت متابولیک سلولی است. به عبارت دیگر اساس این روش مبتنی بر فعالیت میتوکندری می‌باشد. فعالیت میتوکندری در سلول‌های زنده به صورت پایدار است و بنابراین افزایش یا کاهش تعداد سلول‌های زنده به صورت خطی با فعالیت میتوکندری در ارتباط است. رنگ تترازولیوم MTT در سلول‌های فعال (به لحاظ متابولیکی)، احیاء می‌شود. دهیدروژنازهای میتوکندریایی در سلول‌های زنده، حلقه تترازولیوم را شکسته و با تولید NADH و NADPH منجر به تشکیل رسوب نامحلول ارغوانی رنگ به نام فورمازان می‌شوند. این رسوب می‌تواند توسط ایزوپروپانول یا دی‌متیل سولفواکسید (DMSO) حل شود. از سوی دیگر، سلول‌های مرده، چنین توانایی را نداشته و بنابراین واکنشی را نشان نمی‌دهند. در این روش، تشکیل رنگ

**یافته‌ها و بحث**

**بررسی اندازه**

اندازه و توزیع اندازه نانوامولسیون‌ها با روش پراکندگی دینامیک نوری بررسی شد (جدول ۱). بر اساس نتایج نانوامولسیون بهینه بر اساس اندازه و پایداری و عدم جدایش فازی نانوامولسیون آبی و نانوامولسیون آبی با کیتوزان با توزیع اندازه باریک هستند (شکل ۱). حضور کیتوزان باعث کاهش اندازه شده است، که احتمالاً به دلیل بار کیتوزان و افزایش پایداری نانوامولسیون است. نتایج موید گزارش قبل است (۳۴). پایداری نانوامولسیون توسط پتانسیل زتا بررسی شد. پتانسیل زتا برای نانوامولسیون آبی و نانوامولسیون آبی با کیتوزان به ترتیب برابر با ۳۱٫۷- و ۴۶٫۹ میلی ولت است (شکل ۲). از این رو افزودن کیتوزان باعث افزایش پایداری نانوامولسیون شده است. شکل و اندازه نانوامولسیون آبی و نانوامولسیون آبی با کیتوزان توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی شد

(شکل ۳). بر اساس نتایج نانوذرات کروی شکل مشاهده شد.

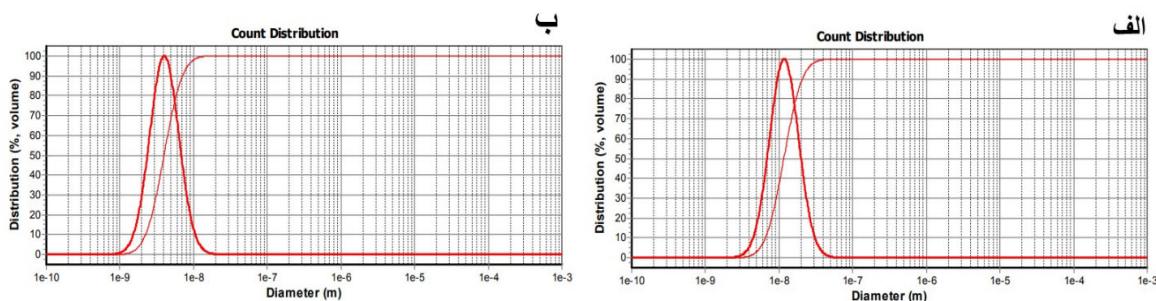
**فعالیت ضدباکتری**

حداقل غلظت مهار کنندگی نمونه‌ها برای باکتری‌های *S.Aureus* و *E.Coli* انجام شد (شکل ۴) و بر اساس نتایج بهترین غلظت مهار کننده برای باکتری *E.Coli* غلظت ۵ و برای باکتری *S.Aureus* غلظت ۱۰  $\mu\text{g/ml}$  می‌باشد.

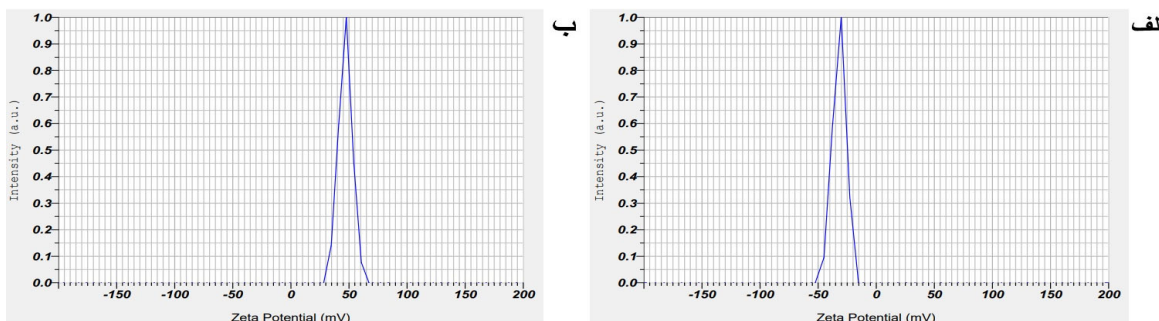
حداقل غلظت کشندگی نمونه‌ها برای باکتری‌های *S.Aureus* و *E.Coli* مورد سنجش قرار گرفت (شکل ۵) و بر اساس نتایج بهترین غلظت مهار کننده برای باکتری *E.Coli* غلظت ۱۰ و برای باکتری *S.Aureus* غلظت ۲۰  $\mu\text{g/ml}$  است.

**جدول ۱. نتایج DLS برای نانوامولسیون‌ها**

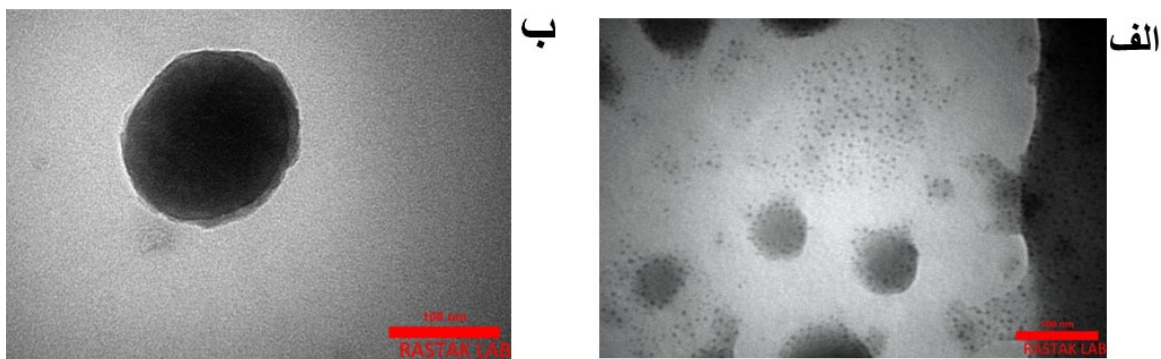
نمونه	نانوامولسیون آبی	نانوامولسیون متانولی	نانوامولسیون آبی	نانوامولسیون متانولی	نانوامولسیون آبی	نانوامولسیون متانولی
اندازه (nm)	۲۱/۶	۱۹۸	۶/۳۸	۱۹۸	۷/۲۳	۸۱/۴



**شکل ۱. نمودار DLS (الف) نانوامولسیون آبی و (ب) نانوامولسیون آبی با کیتوزان.**

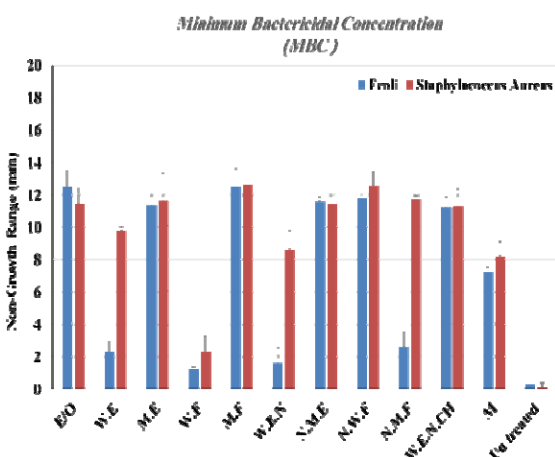


**شکل ۲. نمودار پتانسیل زتا (الف) نانوامولسیون آبی و (ب) نانوامولسیون آبی با کیتوزان.**



شکل ۳. تصویر TEM (الف) نانوامولسیون آبی و (ب) نانوامولسیون آبی با کیتوزان.

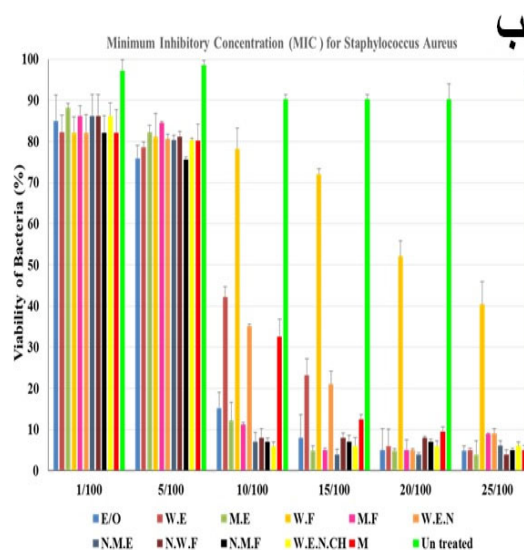
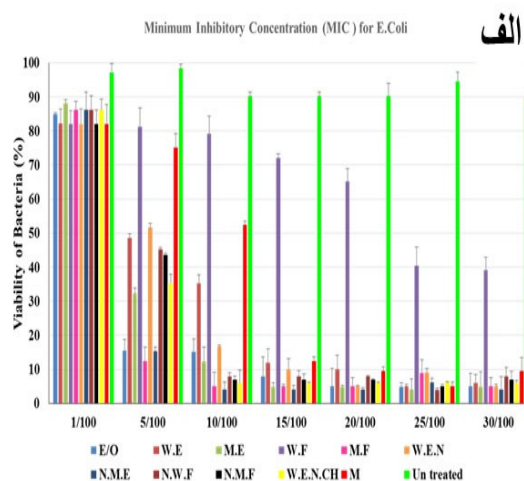
گالیک اندازه‌گیری شد (شکل ۶). بر اساس نتایج عصاره متانولی بدست آمده در روش حمام روغن دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی بوده و با این که اسانس این گیاه دارای مقدار قابل ملاحظه‌ای از ترکیبات فنولی است، اما در مقایسه با میزان همین مواد در عصاره متانولی بدست آمده در روش حمام روغن بسیار کمتر است.



شکل ۵. نتایج MBC برای باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus*.

برای سنجش ترکیبات فلاونوئیدی تام از روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید با منحنی استاندارد کوئرستین استفاده شد و میزان جذب نمونه‌ها را در ۴۱۵ نانومتر بررسی شد (شکل ۷). بر اساس نتایج بین عصاره‌ها، عصاره متانولی و فراکشن متانولی و در بین نانوامولسیون‌ها نانوامولسیون با فراکشن متانولی دارای بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی است.

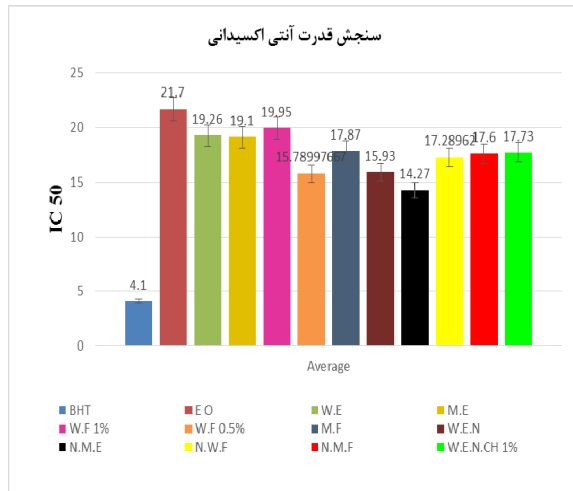
سنجش قدرت ضداکسیدانی با استفاده از مهار ادیکال آزاد به کمک روش DPPH با بررسی جذب نوری نمونه‌ها را در طول موج ۵۱۷ نانومتر ارزیابی شد (شکل ۸). بر اساس



شکل ۴. نتایج MIC برای باکتری (الف) *E. coli* و (ب) *S. aureus*.

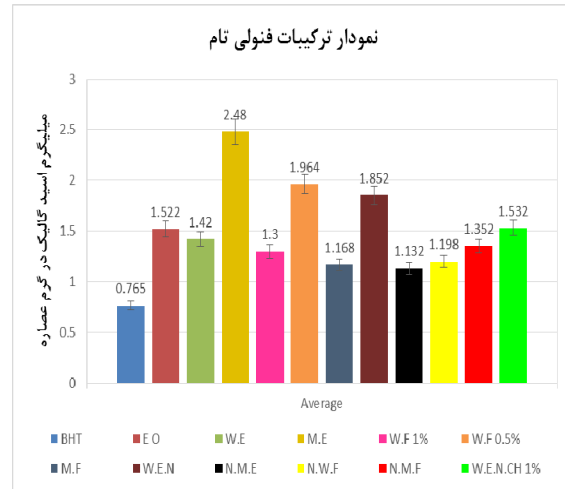
### فعالیت ضداکسیدانی

برای سنجش ترکیبات فنولی تام، میزان جذب نمونه‌ها پس از آماده سازی در ۷۶۰ نانومتر با منحنی استاندارد اسید

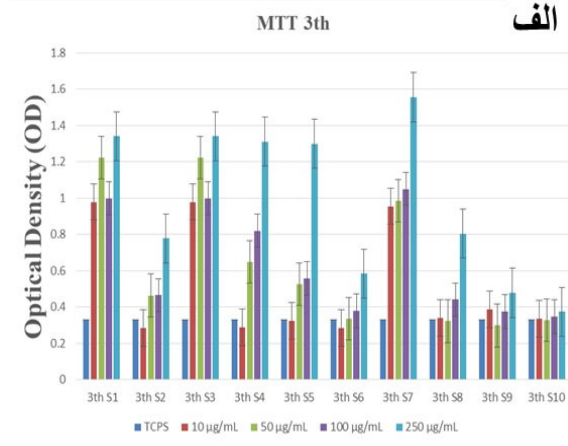


شکل ۸. مهار ادیکال آزاد به کمک DPPH.

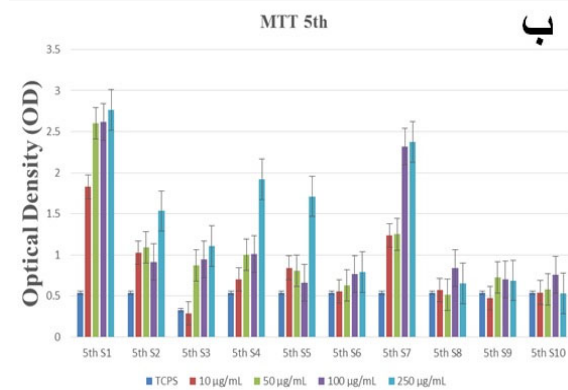
نتایج فعالیت ضداکسیدانی تمامی نمونه بالا است که موید تحقیقات پژوهشگران دیگر است (۴۰، ۴۱).



شکل ۶. نمودار ترکیبات فنولی تام بر اساس اسید گالیک.

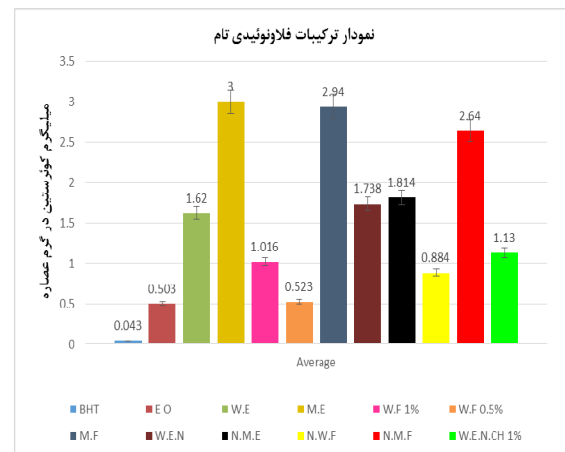


الف



ب

شکل ۹. تست MTT الف) روز سوم و ب) روز پنجم نمونه‌ها.



شکل ۷. نمودار ترکیبات فنولی تام بر اساس کوئرستین.

### سمیت سلولی

نتایج سمیت سلولی در شکل ۹ نشان داده شده است. با توجه به نتایج سمیت سلولی در روزهای سوم و پنجم، نمونه‌ها نه تنها خاصیت سمی بودن برای سلول‌های سالم را ندارند بلکه افزایش غلظت هر یک از نمونه‌ها موجب افزایش میزان تکثیر سلول‌ها می‌شوند. از این رو استفاده از اسانس، عصاره و نانومولسیون‌های حاوی اسانس و عصاره گیاه پونه می‌تواند موجب مهار رشد افسار گسیخته سلول‌های سرطانی شوند، این در حالی است که این ترکیبات تاثیر منفی روی سلول‌های سالم مورد بررسی در این آزمایش نداشته است.

### نتیجه گیری

نانومولسیون با توجه به خواص و مزایا منحصر به فرد برای بهبود افزایش ارزش زیستی پتانسیل کاربردی گسترده و بالقوه دارد. در تحقیق حاضر نانومولسیون روغن در آب اسانس و عصاره پونه با روش ساده و سریع تهیه شد. فعالیت ضدباکتری،



خوب نمونه‌ها به دلیل وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در ضد اکسیدان‌ها بر پایه گیاه گزارش شد. عدم سمیت سلولی روی سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش در غلظت‌های مورد استفاده برای سلول‌های سالم مشاهده شد. بر اساس نتایج نانوامولسیون حاوی پونه به دلیل خواص درمانی می‌تواند چشم انداز آینده گسترش تحقیقات در صنایع مختلف مانند پزشکی، دارویی، غذایی، و آرایشی و بهداشتی را بیش از گذشته نشان دهد.

و فعالیت ضداکسیدانی، و سمیت سلولی نمونه‌ها بررسی شد. نمونه‌ها براساس نتایج DLS توزیع اندازه باریک و TEM نانوذرات کروی شکل هستند و نمونه بهینه شامل ۸ درصد اسانس و ۴ درصد سورفکتانت و ۸۸ درصد عصاره می‌باشد. فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری گرم منفی /شرشیاکلی و باکتری گرم مثبت /استافیلوکوکوس اورئوس برای حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی به ترتیب ۵، ۱۰ و ۱۰، ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. فعالیت ضداکسیدانی

## REFERENCES

1. Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:S77-98.
2. Izquierdo P, Esquena J, Tadros TF, Dederen JC, Feng J, Garcia-Celma MJ, et al. Phase behavior and nano-emulsion formation by the phase inversion temperature method. *Langmuir* 2004;20:6594-8.
3. Guglielmini G. Nanostructured novel carrier for topical application. *Clin Dermatol* 2008;26:341-6.
4. Anton N, Benoit J.P, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates: a review. *J Control Release*. 2008; 128:185-199.
5. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nanoemulsions. *Colloid Interface Sci* 2004; 108:303-318.
6. Ee SL, Duan X, Liew J, Nguyen QD. Droplet size and stability of nanoemulsions produced by the temperature phase inversion method. *Chem Eng Sci* 2008; 140:626-631.
7. Lin C.C, Lin H.Y, Chen H.C, Yu M.W, Lee M.H, Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions. *Food Chemistry* 2009; 116:923-928.
8. Porras M, Solans C, Gonzales C, Martínez A, Guinart A, Gutierrez J.M. Studies of formation of W/O nano-emulsions. *Colloids Surf A* 2004; 249:115-118.
9. Sajjadi S. Formation of fine emulsions by emulsification at high viscosity or low interfacial tension: a comparative study. *Colloids Surf A* 2007; 299:73-78.
10. Al-Edresi S, Baie S. Formulation and stability of whitening VCO-in-water nano-cream. *Pharm Nanotechnol* 2009; 373:174-178.
11. Izquierdo P, Feng J, Esquena J, Tadros T.F, Dederen J.C, Garcia M.J, Azemar N, Solans C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. *Colloid Interface Sci* 2005; 285:388-394.
12. Sole I, Maestro A, Gonzales C, Solans C, Gutierrez J.M. Optimization of nanoemulsion preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system. *Langmuir* 2006; 22:8326-8332.
13. McClements DJ, Xiao H. Potential biological fate of ingested nanoemulsions: influence of particle characteristics. *Food Function* 2012; 3:202-220.
14. McClements D.J. Edible lipid nanoparticles: digestion, absorption, and potential toxicity. *Prog Lipid Res* 2013; 52:409-423.
15. Pinheiro A.C, Coimbra M.A, Vicente A.A. In vitro behaviour of curcumin nanoemulsions stabilized by biopolymer emulsifiers Effect of interfacial composition. *Food Hydrocoll* 2016; 52:460-467.
16. Motakef Kazemi N, Rashidian M, Taghizadeh Dabbagh S, Yaqoubi M. Synthesis and characterization of bismuth oxide nanoparticles by thermal decomposition of bismuth-based MOF and evaluation of its nanocomposite. *Iran J Chem Chem Eng* 2021; 40:11-19.
17. Adibzadeh P, Motakef Kazemi N. Preparation and characterization of curcumin-silver nanoparticle and evaluation of the effect of poly ethylene glycol and temperature. *J Nanoanalysis* 2018; °:156-162.
18. Cowan M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microb Rev* 1999; 12:564-582.
19. Hemaiswarya S, Kruthiventi A.K, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomed* 2008; 15:639-652.
20. Seow Y.X, Yeo C.R, Chung H.L, Yuk H.G. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014; 54:625-644.

21. Moghimi R, Ghaderi L, Rafati H, Aliahmadi A, McClements D.J. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chem* 2016; 194:410–415
22. Donsi F, Ferrari G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *J Biotechnol* 2016; 233:106–120.
23. Semeniuc CA, Pop CR, Rotar AM. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Food Drug Anal* 2017; 25:403-408.
24. Kesselmeier J, Staudt M. Biogenic volatile organic compounds (VOC): An overview on emission, physiology and ecology. *J Atmos Chem* 1999; 33:23-88.
25. Salvia-Trujillo L, Rojas-Graü A, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocoll* 2015; 43:547-556.
26. Abdolmaleki A, Akram M, Saeed M, Asadi A, Kajkollah M. Herbal medicine as neuroprotective potential agent in human and animal models: a historical overview. *J Pharm Care* 2020; 8:75-82.
27. Polak P, Shefi O. Nanometric agents in the service of neuroscience: manipulation of neuronal growth and activity using nanoparticles. *Nanomed* 2015; 11:1467-1479.
28. Mau J.L, Lin H.C, Song S.F. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res In.* 2002; 35:519-526.
29. Bruna J, Peñaloza A, Guarda A, Rodríguez F, Galotto M. Development of MtCu<sup>2+</sup>/LDPE nanocomposites with antimicrobial activity for potential use in food packaging. *Appl Clay Sci* 2012; 58:79-87.
30. Miraj S, Kiani S. Study of pharmacological effect of *Mentha pulegium*: A review. *Der Pharmacia Lettre* 2016; 8:242-245.
31. Aires A, Marrinhas E, Carvalho R, Dias C, José Saavedra M. Phytochemical composition and antibacterial activity of hydroalcoholic extracts of *Pterospartum tridentatum* and *Mentha pulegium* against *Staphylococcus aureus* isolates. *BioMed Res Int* 2016; 2016:1.
32. Mimica-Dukic N, Popovic M, Jakovljevic V, Szabo A, Gašic O. Pharmacological studies of *Mentha longifolia* phenolic extracts. II. Hepatoprotective activity. *Pharm Biol* 1999; 37:221-224.
33. Baris O, Karadayi M, Yanmis D, Guvenalp Z, Bal T, Gulluce M. Isolation of 3 flavonoids from *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* and determination of their genotoxic potentials by using the *E. coli* WP2 test system. *J Food Sci* 2011; 76:T212-217.
34. Langaroudi F, Motakef Kazemi N. Preparation and characterization of O/W nanoemulsion with Mint essential oil and Parsley aqueous extract and the presence effect of chitosan. *Nanomed Res J* 2019; 4:48-55.
35. Karimi E, Motakef Kazemi N. Preparation of O/W nanoemulsion containing saffron aqueous solution and sesame oil and evaluation of its properties. *Nanomed Res J* 2021; 6:112-116.
36. Liu J, Zhou H, Tan Y, Muriel Mundo J.L, Julian McClements D. Comparison of plant-based emulsifier performance in water-in-oil-in-water emulsions: Soy protein isolate, pectin and gum Arabic. *J Food Eng* 2021; 307: 110625.
37. Liu C, Pei R, Heinonen M. Faba bean protein: A promising plant-based emulsifier for improving physical and oxidative stabilities of oil-in-water emulsions. *Food Chem* 2022; 369: 130879.
38. Herrero A.M, Merino E, Muñoz-González I, Ruiz-Capillas C. Oil-in water vegetable emulsions with oat bran as meat raw material replacers: compositional, technological and structural approach. *Foods* 2023; 12: 40.
39. Wang X, Yu K, Cheng C, Peng D, Yu X, Chen H, et al. Effect of sesamol on the physical and chemical stability of plant-based flaxseed oil-in-water emulsions stabilized by proteins or phospholipids. *Food Funct* 2021; 12: 2090-2101.
40. Kamkar A, Shariatifar N, Jamshidi A, Jebelli Javan A, Sadeghi T, Zeigham Monfared M. In vitro evaluation of antioxidant activity of Iranian *Mentha longifolia* essential oil and extracts. *J Med Plant* 2012; 1:185-194.
41. Kamkar A, Javan A.J, Asadi F, Kamalinejad M. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food Chem Tox* 2010; 48:1796-1800.