

Paper Type: Original Article



Nanoemulsification of Thyme Essence by a Mixture of Emulsifiers and Evaluation of the Antibacterial Activity Against *E.coli* DH5 α

Fatemeh Shakeri¹, Fatemeh Moradian*¹ , Pooyan Mehrabanjoubani¹, Mehran Rostami²

¹Department of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran;*(Associate Professor: Corresponding author: f.moradian@sanru.ac.ir).

²Department of Nano Materials and Nano Coatings, Institute for Color Science and Technology, Tehran, Iran.

Citation:



Shakeri, F., Moradian, F., Mehrabanjoubani, P. & Rostami, M. (2024). Nanoemulsification of Thyme essence by a mixture of emulsifiers and evaluation of the antibacterial activity against *E. coli* DH5 α . *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 37 (Issue No. 2), PP. 61-72

Received: 2023.10.17

Accepted: 2024.11.25

Abstract

Introduction: In the present study, thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil nanoemulsion was prepared and its characteristics were investigated using a device method also the antibacterial effects of *E. coli* DH5 α were investigated.

Methods: First, the primary microemulsion was prepared in the oil phase and then it was transformed into a nanoemulsion by ultrasound. The surface charge, viscosity, particle size, and morphology of essential oil nanoemulsion were investigated using a zeta potential device, DLS, and electron microscope TEM. The effect of the prepared nanoemulsion on the growth of *Escherichia coli* bacteria was evaluated by colony count.

Results: The results showed that the zeta potential of nanoemulsion containing 10 and 30 percent essential oil was -11.5 and -11.1 mV, respectively. The morphology of the nanoparticles of both samples was spherical and the average size of the nanoemulsion nanoparticles with 10 percent and 30 percent essential oil was 43 and 30 nm, respectively. The results of the antibacterial effects of nanoemulsions showed that the nanoemulsion containing 10 percent essential oil (v/v), with a volume of 30 μ l, and the nanoemulsion containing 30 percent essential oil (v/v), with a volume of 20 μ l, had approximately 50 percent inhibitory effect (IC₅₀) on the growth of *E. coli* DH5 α . Also, the primary essential oil showed approximately 50 percent inhibition (IC₅₀) on bacterial growth in 20 μ l.

Conclusion: According to the stability of the produced thyme essential oil nanoemulsions, it can be concluded that the antibacterial effects of this compound have increased compared to the original essence.

Keywords: Antimicrobe, *Thymus vulgaris* plant, Nanotechnology, IC₅₀



نانوامولسیون کردن اسانس آویشن توسط مخلوط امولسیونه کننده ها و ارزیابی فعالیت

ضد باکتری علیه *E.coli* DH5a

فاطمه شاکری^۱، فاطمه مرادیان^{۲*}، پویان مهربان جوبنی^۳، مهران رستمی^۴

^۱کارشناسی ارشد، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، مازندران، ایران.

^۲دانشیار، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، مازندران، ایران.

(*نویسنده مسئول: f.moradian@sanru.ac.ir)

^۳استادیار، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، مازندران، ایران.

^۴دانشیار، گروه پژوهشی نانوفناوری رنگ و پوشش، پژوهشگاه صنایع رنگ، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۶

چکیده

مقدمه: در مطالعه حاضر، نانوامولسیون اسانس آویشن (*Thymus vulgaris*) تهیه شد و ویژگی های آن به روش دستگاهی بررسی شد و اثرات ضد باکتری *Escherichia coli* DH5a بررسی شد.

روش‌ها: ابتدا میکروامولسیون اولیه در فاز روغنی تهیه و سپس با التراسوند به نانو امولسیون تبدیل شد. میزان بار سطحی، ویسکوزیته، اندازه ذرات و مورفولوژی نانوامولسیون اسانس توسط دستگاه پتانسیل زتا، DLS و میکروسکوپ الکترونی TEM مورد بررسی قرار گرفت. اثر نانوامولسیون تهیه شده بر روی رشد باکتری /شرشیاکلی به صورت کلنی کانت ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پتانسیل زتای نانوامولسیون حاوی ۱۰ و ۳۰ درصد اسانس، به ترتیب برابر با ۱۱/۵ - ۱۱/۱ mV بود. مورفولوژی نانوذرات هر دو نمونه به صورت کروی یکدست و میانگین اندازه نانوذرات نانوامولسیون دارای ۱۰ و ۳۰ درصد اسانس، به ترتیب ۴۳ و ۳۰ نانومتر بود. نانوامولسیون حاوی ۱۰ درصد اسانس (v/v)، با حجم ۳۰ میکرولیتر و نانوامولسیون حاوی ۳۰ درصد اسانس (v/v)، با حجم ۲۰ میکرولیتر، تقریباً ۵۰ درصد اثر مهارکنندگی (IC₅₀) بر رشد باکتری *E. coli* DH5a داشتند. همچنین اسانس اولیه بر روی رشد باکتری در ۲۰ میکرولیتر تقریباً ۵۰ درصد مهار (IC₅₀) را نشان داد.

نتیجه‌گیری: باتوجه به پایداری نانوامولسیون‌های اسانس گیاه آویشن تولیدشده، می‌توان نتیجه گرفت که اثرات ضد باکتریایی این ترکیب در مقایسه با اسانس اولیه افزایش یافته است.

کلیدواژه‌ها: ضد میکروب، گیاه آویشن، نانوتکنولوژی، IC₅₀

مقدمه

در گیاهان ترکیبات فعال زیادی وجود دارد که اثرات دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زای باکتریایی و ویروسی نشان می‌دهد [1]. این ترکیبات شیمیایی مشتق شده از گیاهان به صورت اسانس‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و ترکیبات فنلی به طور گسترده به عنوان نگهدارنده در غذاهای فرآوری شده، داروها، درمان‌های بیولوژیکی و طبیعی مورد بررسی قرار گرفته‌اند و توانایی آنها در مهار رشد میکروبی، اکسیداسیون و واکنش‌های آنزیمی در برخی مطالعات گزارش شده است [2]. اسانس‌ها یا روغن‌های ضروری از جمله متابولیت‌های ثانویه مهم در گیاهان هستند که اثرات قوی ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد قارچی از خود نشان می‌دهند [3]، [4]. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها به نسبت اجزای اصلی آنها (ترپنوئیدها، فنولیک‌ها و ترکیبات آلدئیدی) و نوع میکروارگانیسمی که ممکن است مهار یا غیرفعال کنند، مرتبط است [5].

آویشن گیاهی با نام علمی *Thymus vulgaris* از تیره نعنائیان که به صورت بوته‌ای دیده می‌شود و ساقه‌های منشعب آن از کرک‌های سفیدرنگ پوشیده شده است. بخش هوایی گیاه آویشن دارای اسانس، ترکیبات ساپونینی، تانن و فنل‌ها می‌باشد. تیمول و کارواکرول به عنوان جز اصلی و هیدروکربن‌های مونوترپنی مانند پارا-سیمن، الکل‌ها مانند لینالول و آلفا-ترپینن ترکیبات اصلی اسانس گیاه آویشن را تشکیل می‌دهند [6]. اسانس گیاه آویشن در طب سنتی و مدرن برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های تنفسی (سرفه، برونشیت و آسم) مورد استفاده قرار می‌گیرد و دارای خواص ضد درد، ضد عفونی کننده، ترشح عرق، ایجاد ادرار، تونیک عضله قلب، جلوگیری از گرفتگی و مسدود شدن شریان‌ها، درمان عفونت دستگاه ادراری و کاهش کلسترول خون است [7]. همچنین اسانس آویشن باعث تحریک حافظه، درمان لثه، درد دندان، التهاب دهان، حنجره و نای می‌شود. تحقیقات اثبات کرده است که اسانس‌های موجود در آویشن باعث کاهش آمیب و باکتری‌های کولون و با هضم و جذب اسیدهای چرب سبب افزایش وزن بدن می‌شود.

استفاده مستقیم از اسانس‌ها با توجه به فرار بودن و حلالیت بسیار پایین در آب و ترکیبات قطبی، اثربخشی آنها را کاهش می‌دهد. روغن‌های ضروری به صورت خالص به دلیل حلالیت بسیار پایین در حلال‌های قطبی، دارا بودن ترکیبات فرار و اکسیده شدن در برابر اکسیژن و نور گزینه‌ی مناسبی برای استفاده در صنایع غذایی، آرایشی-بهداشتی و دارویی نیستند بنابراین به صورت نانوامولسیون می‌توانند در صنایع مختلف به عنوان عامل ضد باکتریایی طبیعی جایگزین مناسبی برای مواد شیمیایی و سنتزی باشند. استفاده از روش‌های امولسیون و نانوامولسیون کردن اسانس‌ها سبب افزایش زمان نگهداری ترکیبات فرار، حلالیت اسانس و فراهمی زیستی آنها می‌شود و از اکسیداسیون آنها در طول ذخیره سازی به میزان زیادی جلوگیری می‌کند [8]. امولسیون‌ها بخشی از یک گروه کلی از سیستم‌های دو فاز به نام کلوئیدها هستند. میکروامولسیون‌ها (ME) و نانوامولسیون‌ها (NE) ساده‌ترین راه برای فرمولاسیون و مدیریت هستند و می‌توان آنها را با هزینه کم به دست آورد. امروزه استفاده از روش نانو امولسیون برای کپسوله کردن، محافظت و انتقال ذرات به خصوص با خاصیت چربی دوستی به عنوان مواد مغذی، داروها، طعم دهنده‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، ویتامین‌ها و مواد ضد میکروبی، برای استفاده در غذا، دارو، شیمی کشاورزی و صنایع دیگر توجه بسیاری را به خود جلب کرده است [9]. نانوامولسیون‌ها برخلاف میکروامولسیون‌ها، تحت تأثیر تغییرات فیزیکی و شیمیایی از جمله دما و pH قرار نمی‌گیرند و برای تهیه آنها به مقدار کمتری از سورفکتانت نیاز است از این رو، نانوامولسیون‌ها برای کاربردهای مختلف مناسب تر از میکروامولسیون‌ها هستند [10]. با توجه به فعالیت ضد میکروبی گیاه آویشن و استفاده فراوان در طب سنتی و صنایع غذایی، به نظر می‌رسد تهیه نانوامولسیون حاوی امولسیفایر اسانس گیاه آویشن با شرایط جذب آسان‌تر، سازگاری مناسبی با سیستم‌های زیستی داشته باشد و همچنین پایداری ترکیبات اسانس را که در برابر اکسیژن هوا نیز اکسیده شده و خواص خود را از دست می‌دهند، افزایش می‌دهد. از این رو هدف از این مطالعه، تهیه نانوامولسیون مناسب از اسانس استخراج شده از گیاه دارویی آویشن و بررسی پایداری فیزیکی نانو اسانس تهیه شده و مقایسه اثر ضد میکروبی آن بود.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده سازی اسانس گیاه آویشن

گیاه آویشن با نام علمی (*Thymus vulgaris*) از مزرعه پرورش آویشن در منطقه یانه سر بهشهر استان مازندران جمع آوری شد و با شماره هرباریومی (SANRU-H1104) در هرباریوم گیاهان دارویی پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری ثبت شد. استخراج اسانس گیاه آویشن بعد از خشک کردن در دمای ۳۰ درجه به روش تقطیر با آب و توسط دستگاه کلونجر صورت گرفت. بدین منظور ۷۰ گرم خرد شده گیاه آویشن در داخل بالن ژوژه با ۱۴۰۰ میلی لیتر مخلوط شد و پس از برقرار شدن جریان آب سرد، فرآیند تقطیر و اسانس‌گیر به مدت ۲ ساعت انجام گرفت. اسانس به دست آمده در دمای منفی ۲۰ درجه و در تیوپ ضد نور نگهداری شد.

آنالیز دستگاهی اسانس با دستگاه GC-Mass

به منظور بررسی پروفایل ترکیبات اسانس گیاه آویشن از دستگاه GC-Mass مدل Agilent 7890 A، کویل شده با طیف سنج جرمی مدل Agilent MSD-5975C و یک آشکارساز یونیزاسیون شعله (FID) همراه با آشکارساز انتخابی جرمی چهار قطبی Agilent MSD-5977B و ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. پارامترهای عملیاتی شامل هلیوم به عنوان گاز حامل (۱ میلی لیتر در دقیقه)، دمای اینجکتور ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای آون پس از ۳ دقیقه از ۵۰ به ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. در ابتدا سرعت گرمایش ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه بود تا اینکه سیستم به دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد رسید. متعاقباً سرعت تا دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد به ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش یافت و پس از ۵ دقیقه زمان نگهداری، سرعت گرمایش به ۱۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه رسید تا به دمای ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد رسید. گرمایش با یک دوره ایزوترمی ۲۰ دقیقه دنبال شد. نمونه‌های اسانس تزریق شده در هگزان و در غلظت ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر رقیق و یک میکرولیتر از محلول به نسبت تقسیم ۳۰ به ۱ تزریق شد. تنظیم آشکارساز جرمی به صورت انرژی یونیزاسیون ۷۰ eV، دمای منبع یونی ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد، زمان اسکن ۱ ثانیه، محدوده جرمی m/z ۶۰۰-۴۰ بود. شناسایی ترکیبات اسانس بر اساس زمان‌های خروج (RT) و درصد ترکیبات خارج شده و تشخیص طیف‌ها با کتابخانه W9N11.L و NIST14.L انجام شد.

تهیه میکرو و نانو امولسیون اسانس گیاه آویشن و تعیین خصوصیات فیزیکی آن

اولین مرحله در تهیه نانوامولسیون روغن در آب (O/W)، تهیه یک میکروامولسیون O/W است. برای تهیه فاز روغنی ابتدا ۲۰ درصد توئین ۸۰ (v/v) را درون بشر ریخته و سپس اسانس خالص ۳۰ درصد (v/v) به صورت قطره ای به آن تحت همزدن یکنواخت توسط همزن مغناطیسی اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه توسط همزن با دور ۵۰۰۰ rpm مخلوط شدند. SDS (۱ درصد) را در آب مقطر حل کرده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm با هم مخلوط شدند، سپس به محلول SDS، اسانس با دو درصد متفاوت یکی ۱۰ درصد و دیگری ۳۰ درصد (فاز روغنی) به صورت قطره ای اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm باهم مخلوط شدند. برای تهیه میکرو امولسیون همگن، از هموژنایزر پروب دار (IKA T18, Germany) استفاده شد. در این مرحله مخلوط تهیه شده به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm باهم مخلوط شده و نمونه به دست آمده به حالت یک دست درآمد. میکروامولسیون تهیه شده با اسانس ۱۰ درصد و ۳۰ درصد (فاز روغنی)، توسط دستگاه اولتراسونیکیتور پالس های ۷۰ هرتز در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اولتراساند شد. زمان هر پالس ۳۰ ثانیه و زمان استراحت بین هر پالس ۳۰ ثانیه بود. در این دستگاه تبدیل یک جریان الکتریکی به یک ارتعاش مکانیکی سبب همگن شدن محلول شد. جهت تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانو امولسیون ها بار سطحی نمونه ها توسط دستگاه Zeta potential analyzer (Horiba SZ-100, Japan) و مورفولوژی آنها توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی TEM (EM900 Zeiss, Germany) تعیین شد.

کشت باکتری *E.coli* DH5 α و شمارش باکتری

ابتدا باکتری *E.coli* DH5 α در محیط لوریا برتانی (LB) مایع در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت به صورت شبانه کشت و سپس رقت سازی سریالی باکتری از 10^{-1} تا 10^{-10} صورت گرفت. ۱۰ پلیت حاوی محیط کشت کلنی کانت آگار آماده و از هر رقت، ۱۰۰ میکرولیتر باکتری رقیق شده برداشته و بر روی پلیت ها کشت چمنی شدند. پلیت های کشت

داده شده در آنکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از رشد کلنی های باکتری بر روی پلیت، تعداد کلنی های تشکیل شده در هر پلیت شمارش و تعداد کلنی ها برای هر رقت از باکتری تعیین گردید.

بررسی پایداری نانومولسیون ها و اثر ضد باکتری آن پس از گذشت ۳۰ روز

جهت بررسی میزان پایداری نانومولسیون ها، پس از گذشت ۳۰ روز از نگهداری آن ها، میزان رشد کلنی های باکتری ها بررسی شدند. برای این آزمون، از نانومولسیون حاوی ۱۰ درصد اسانس با حجم های ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ و برای ۳۰ درصد اسانس شامل حجم های ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکرولیتر تهیه و درون پلیت حاوی باکتری /شرشیاکلی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند.

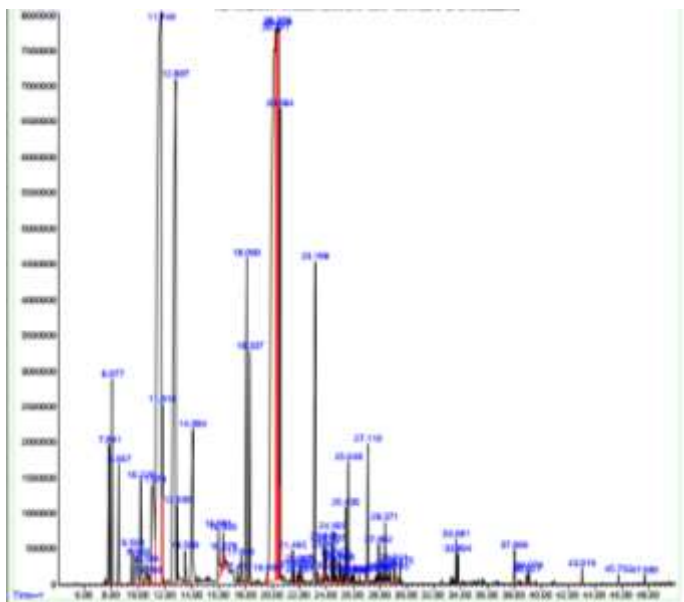
بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس گیاه آویشن بر روی باکتری *E.coli* DH5a

جهت مقایسه اثرات ضد باکتریایی اسانس و نانومولسین های تولید شده گیاه آویشن حجم های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس آویشن رقیق شده در DMSO برای نانومولسیون حاوی ۱۰ درصد و برای ۳۰ درصد اسانس حجم های ۵، ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ میکرولیتر درون محیط کشت کلنی کانت حل و درون پلیت اضافه شد سپس باکتری /شرشیاکلی با رقت 10^{-6} کشت شدند.

بررسی پایداری نانومولسیون ها و اثر ضد باکتری آن پس از گذشت ۳۰ روز

نتایج و بحث

طیف اسپکترام و نوع ترکیبات موجود در اسانس آویشن پس از آنالیز با دستگاه GC-Mass به ترتیب در شکل ۱ و جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که از بین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس به ترتیب مونوترپن های اکسیژنه، هیدروکربن های مونوترپنی، هیدروکربن های سزکوئی ترپنی و سزکوئی ترپن های اکسیژنه بیشترین مقدار درصد اسانس را نشان می دهند. ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس شامل پاراسیمن (۲۳/۳ درصد)، تیمول (۲۲/۹۳ درصد)، گاما ترپنین (۱۰/۶۱ درصد) و کارواکرول (۵/۳۱ درصد) بود.



شکل ۱- طیف ترکیبات شناسایی شده اسانس با دستگاه کروماتوگرافی گازی

Figure 1- The spectrum of the identified compounds of essence with gas chromatography

جدول ۱- برخی از ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن.

Table 1- Some chemical compounds of thyme essence.

Number	compounds	Relative percentage of concentration	Elution time
1	α -Thujene	1.01	7.84
2	α -Pinene	1.32	8.07
3	Camphene	0.75	8.56
4	β -Pinene	0.29	9.56
5	1-Octen-3-ol	0.58	9.95
6	β -Myrcene	1.11	10.22
7	α -Pellandrene	0.31	10.59
8	α -Terpinene	2.44	11.07
9	p-Cymene	23.3	11.75
10	1,8-Cineol	0.45	11.81
11	γ -Terpinene	10.61	12.80
12	p-Menth-8-en-1-ol	0.39	12.93
13	α -Terpinolene	0.21	13.50
14	Linalool	2.05	14.08
15	endo-Borneol	0.45	15.97
16	α -Terpineol	0.2	17.66
17	Thymyl Methyl Ether	2.67	18.09
18	Carvacrol Methyl Ether	1.46	18.33
19	Thymol	22.93	20.23
20	Carvacrol	5.31	20.43
21	Caryophyllene	3.28	23.19
22	4(5)-acetyl-2-(2,2-dimethylpropyl)-1H	0.26	23.85
23	Humulene	0.19	23.94
24	Geranyl propionate	0.18	24.40
25	γ - Muurolene	0.27	24.50
26	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)	0.42	25.42
27	δ -Cadinene	0.7	25.64
28	Caryophyllene oxide	0.99	27.10
29	τ -Cadinol	0.32	28.37
30	Heneicosane	0.26	38.00
Total		85	

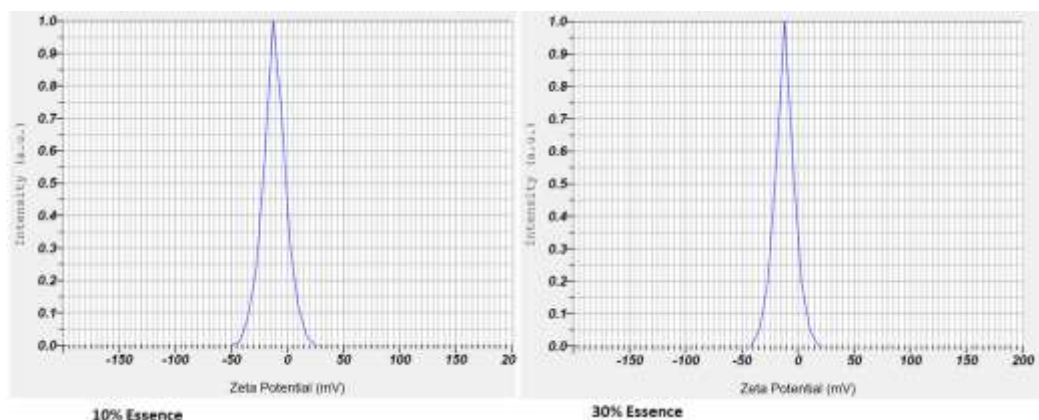
مقادیر پتانسیل زتای نانوامولسیون‌های تازه تهیه شده در جدول ۲ آورده شده است و نمودار مربوط به آن در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که پتانسیل زتا پس از گذشت زمان منفی تر شده و در همان محدوده قابل قبول (۱۰۰- تا ۱۰۰+) باقی مانده است که نشان دهنده حفظ پایداری نانوامولسیون‌ها است.

جدول ۲- مقادیر پتانسیل زتای نانوامولسیون‌های تازه تهیه شده و پس از نگهداری به مدت ۳۰ روز

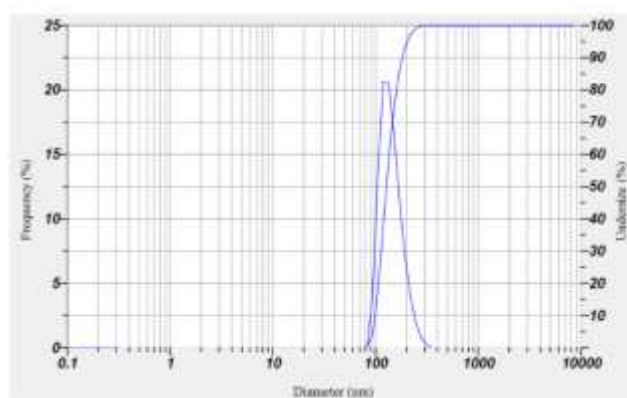
Table 2- Zeta potential values of freshly prepared nanoemulsions and after storage for 30 days

Zeta potential after 30 days (mV)	Zeta potential(mV)	Nanoemulsion
-50.9	-11.5	Nanoemulsion with 10% essential oil
-76.4	-11.1	Nanoemulsion with 30% essential oil

همچنین نتیجه حاصل از آنالیز DLS مربوط به نانوامولسیون حاوی ۳۰ درصد اسانس تازه تهیه شده نشان داد که سوسپانسیون تهیه شده توزیع یکنواختی داشت و اندازه تخمینی نانوذره ۳۴/۴ نانومتر برآورد شده بود (شکل ۳).

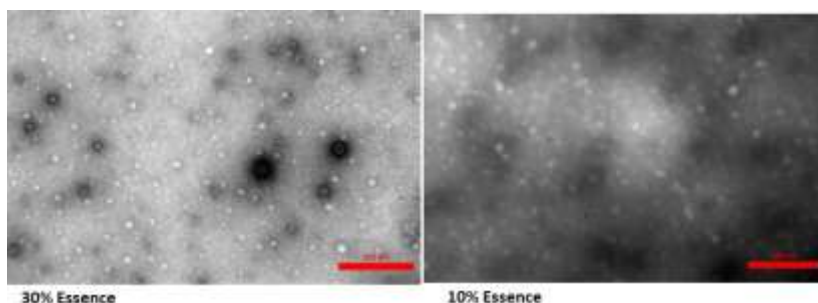


شکل ۲- پتانسیل زتای نانوامولسیون های تازه تهیه شده از اسانس ۱۰ و ۳۰ درصد
 Figure 2- Zeta potential of newly prepared nanoemulsions from 10 and 30% essence



شکل ۳- نمودار DLS نانوامولسیون حاوی ۳۰ درصد اسانس
 Figure 3- DLS diagram of nanoemulsion containing 30% essence

ویژگی های مورفولوژیکی نانوامولسیون های تازه تهیه شده توسط میکروسکوپ TEM مشاهده شد (شکل ۴). تصاویر TEM مربوط به ذرات نانوامولسیون های تهیه شده نشان داد که ذرات به صورت یکنواخت با شکل کروی بودند و میانگین اندازه ذرات برای نانوامولسیون حاوی ۱۰ و ۳۰ درصد اسانس به ترتیب ۴۳ و ۳۰ نانومتر بود.

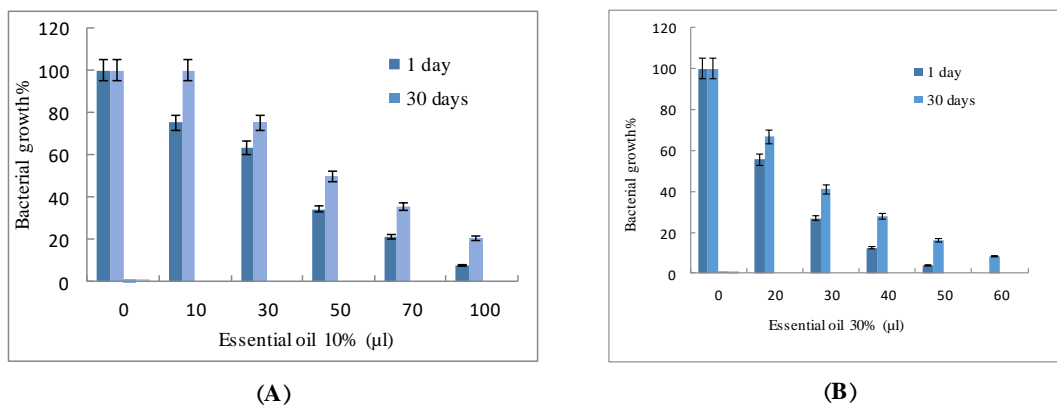


شکل ۴- تصویر مربوط به نانوامولسیون های تازه تهیه شده ۱۰ و ۳۰ درصد با میکروسکوپ TEM
 Figure 4- Image related to newly prepared 10 and 30 percent nanoemulsions with TEM microscope

نتایج اثر ضدباکتریایی نانوامولسیون حاوی ۱۰ درصد اسانس تازه تهیه شده بر روی باکتری *E.coli* DH5a نشان دادند که در حجم های ۰، ۵، ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس، میزان رشد پس از شمارش تعداد کلنی های رشد یافته باکتری به ترتیب، ۱۰۰، ۹۳، ۷۴، ۶۱، ۳۱، ۲۱، ۸ و ۰ درصد بود (شکل ۵). همچنین با کاهش درصد غلظت اسانس اثرات ضدباکتریایی نانوامولسیون نسبت به نانوامولسیون حاوی ۳۰ درصد اسانس کم تر بوده است. نانوامولسیون ۱۰ درصد در حجم ۵ میکرولیتر کمترین اثرمهار (MIC) را داشت و در حجم ۲۵ میکرولیتر تقریباً ۵۰ درصد مهار (IC₅₀) را نشان داده است. همچنین در مقایسه آماری با آزمون

دانکن، تمامی حجم‌ها نسبت به کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). نتایج اثر ضدباکتریایی نانوامولسیون حاوی ۳۰ درصد اسانس تازه تهیه شده بر روی باکتری *E. coli* DH5 α نشان داد که در حجم‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس، میزان رشد پس از شمارش تعداد کلنی‌های رشد یافته باکتری به ترتیب، ۱۰۰، ۸۶، ۷۱، ۵۵، ۲۷، ۱۲، ۰، ۰ و ۵۰ درصد بود (شکل ۵). نانوامولسیون ۳۰ درصد در حجم ۵ میکرولیتر کمترین اثر مهار (MIC) را داشت و در حجم ۲۰ میکرولیتر ۵۰ درصد مهار (IC_{50}) را نشان داده است. در حجم بالای ۵۰ میکرولیتر بیشترین اثر کشندگی را نشان داده است. همچنین در مقایسه آماری با آزمون دانکن، تمامی حجم‌ها نسبت به کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$).

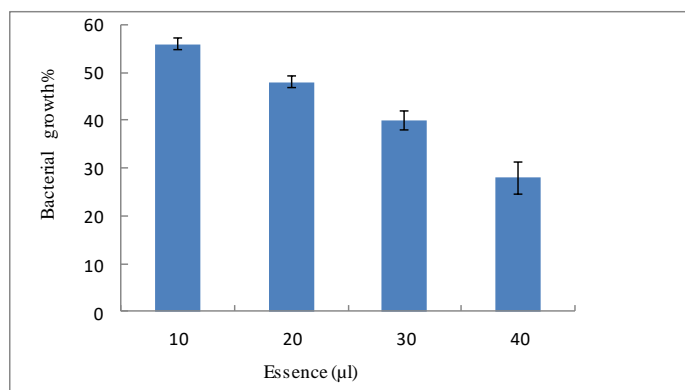
باکتری *E. coli* DH5 α توسط نانوامولسیون‌ها پس از ۳۰ روز نگه‌داری در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد، تیمار شدند و نتایج نشان داد که در نانوامولسیون حاوی ۱۰ درصد اسانس در حجم‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ میکرولیتر به ترتیب برابر با ۷۵، ۴۹، ۳۵، ۲۰ و ۰ درصد نانوامولسیون ۳۰ درصد با حجم‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ میکرولیتر، میزان رشد باکتری به ترتیب برابر با ۶۶، ۴۱، ۲۸، ۱۶ و ۸ درصد بود (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه اثر ضد باکتریایی نانوامولسیون‌های تهیه شده. الف) نانوامولسیون ۱۰ درصد و ب) نانوامولسیون ۳۰ درصد اسانس، بین نانوامولسیون تازه تهیه شده و پس از ۳۰ روز نگه‌داری در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد. میله‌های روی هر یک از ستون‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد است. مقایسه زمان‌های روز یک و سی با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد به صورت مستقل بررسی شد.

Figure 5- Comparison of antibacterial effect of prepared nanoemulsion. A) 10% nanoemulsion and B) 30% nanoemulsion essence, nanoemulsion between newly prepared nanoemulsion and after 30 days storage at -20 °C. Bars on each column shows standard deviation. Comparison of the times in day one and thirty was independently studied with Duncan's test at the probability level of 5 percent

نتایج اثر اسانس آویشن بر میزان رشد باکتری *E. coli* DH5 α نشان داد که در حجم‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر از اسانس خالص تعداد کلنی‌های رشد یافته باکتری به ترتیب، ۵۶، ۴۸، ۴۰ و ۲۸ درصد بود (شکل ۶). نتایج نشان دادند که اسانس در حجم ۱۰ میکرولیتر کمترین اثر مهار (MIC) و در حجم ۲۰ میکرولیتر تقریباً ۵۰ درصد مهار (IC_{50}) را نشان داد. همچنین در مقایسه با نتایج مربوط به نانوامولسیون‌ها مشخص شد که در حجم‌های ۱۰ و ۲۰ میکرولیتر از اسانس، اثر مهار اسانس بالاتر بود، اما در حجم‌های ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر اسانس، اثر مهار نانوامولسیون‌ها بیشتر از اسانس بود. در بررسی ویسکوزیته نانوامولسیون‌ها، ویسکوزیته نمونه‌ها پس از گذشت ۲۴ ساعت و ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳). ویسکوزیته تمامی نمونه‌ها در طول زمان تغییر قابل توجهی نداشت.



شکل ۶- نمودار مربوط به میزان رشد باکتری تیمار شده توسط اسانس رقیق شده با DMSO. میله‌های روی هر یک از ستون‌ها نشان دهنده خطای استاندارد است

Figure 6- The graph related to the growth rate of bacteria treated with an essence diluted with DMSO. Bars on each column shows standard deviation

جدول ۳- مقادیر مربوط به تغییرات ویسکوزیته نانوامولسیون‌ها بر اساس mPa.s

Table 3- The values related to changes in the viscosity of nanoemulsions based on mPa.s

Nanoemulsion	10%	30%
freshly prepared	0.898	0.898
After 30 days	0.899	0.895

در مطالعه حاضر، با توجه به خواص ضدباکتریایی اسانس آویشن و اهمیت و نقش ترکیبات موجود در آن مانند ترکیبات فنلی، هیدروکربن‌های مونوترپنی و الکل‌ها، و اثرگذاری بالای آن در غلظت‌های بسیار کم بر روی باکتری *E. coli* جهت حفظ پایداری و اثر بخشی طولانی تر به صورت نانوامولسیون تهیه شد.

اسانس آویشن از جمله ده اسانس معروف است که دارای خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی است. آویشن محتوی ۰/۸ تا ۲/۶ درصد (معمولاً ۱ درصد) اسانس است که قسمت اعظم آن را ترکیبات فنلی (۲۰ تا ۸۰ درصد)، هیدروکربن‌های مونوترپنی مثل پاراسایمن و گاما ترپینن، و الکل‌ها مانند لینالول و آلفا ترپینن تشکیل می‌دهد [11]. تیمول ترکیبی فنلی و مهم‌ترین ماده مؤثره آن بوده و ترکیب مهم دیگر آن کارواکرول است [11]. ترکیبات اصلی موجود در اسانس گیاه آویشن شامل پاراسایمن (۲۳/۳ درصد)، تیمول (۲۲/۹۳ درصد)، گاما ترپینن (۱۰/۶۱ درصد) و کارواکرول (۵/۳۱ درصد) بود. لین و همکاران، ترکیبات موجود در اسانس آویشن را بررسی کردند و ترکیبات فنلی مانند تیمول، اوژنول و کارواکرول در مقایسه با سایر ترکیبات موجود در اسانس‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی بود [12].

خاصیت آبگریزی اسانس‌ها، فرار بودن، اکسیداسیون سریع و بی‌ثباتی شیمیایی منجر به استفاده از روش‌های مختلفی از جمله تهیه نانوامولسیون شده است. پارامترهای فرایند تهیه نانوامولسیون مانند فشار همگن‌سازی، غلظت سورفکتانت و نسبت روغن به آب به طور قابل توجهی بر مقادیر قطر هیدرودینامیکی و پراکندگی فازها در نانو امولسیون‌ها تأثیر می‌گذارد. همچنین خواص فیزیکی فاز روغنی و ماهیت لایه سورفکتانت تأثیر قابل توجهی بر تشکیل و تثبیت نانوامولسیون دارد [13]. در مطالعه حاضر برای تهیه میکروامولسیون روغن در آب از سورفکتانت غیر یونی توپین و یونی SDS استفاده شد که محلول در آب است و سبب امتزاج بخش روغنی با بخش آبی امولسیون می‌گردد. سورفکتانت توپین ۸۰ جهت فرمولاسیون سیستم‌های کلوئیدی مبتنی بر روغن‌های ضروری است، زیرا ثابت شده است که فرمولاسیون پایداری را بدون نیاز به یک کوسورفکتانت ارائه می‌دهد و از آن جایی که برای تثبیت قطرات به مقدار کمتری سورفکتانت نیاز است، استفاده از آن بسیار به صرفه و سودمند است. SDS یک سورفکتانت آنیونی است، که کشش سطحی محلول‌های آبی را کاهش می‌دهد تا یک لایه انعطاف‌پذیر به دست آید. در طول فرآیند امولسیون‌سازی، سورفکتانت یونی به سرعت در سطح مشترک روغن و آب جذب می‌شود و از تجمع قطرات جلوگیری می‌کند و سبب پایداری امولسیون تهیه شده می‌شود. در این مطالعه از نسبت‌های ۱ درصد توپین ۸۰ برای نانوامولسیون ۱۰ درصد و ۲ درصد برای نانوامولسیون ۳۰ درصد استفاده شد. میزان SDS استفاده شده به عنوان یک امولسیفایر باردار، ۰/۵ درصد برای نانوامولسیون ۱۰ درصد و ۱ درصد برای نانوامولسیون ۳۰ درصد بود. نانوامولسیون ۳۰ درصد به دلیل بیشتر بودن غلظت اسانس به میزان بیشتری

از امولسیفایر نیاز دارد تا حلالیت و پایداری آن افزایش یابد. افزایش میزان سورفکتانت باعث افزایش میزان امولسیونه شدن اسانس می‌شود که تاثیر مستقیم بر اندازه ذرات و پایداری آن دارد [14].

نسبت روغن به سورفکتانت، روغن به آب یک معیار اساسی برای تشکیل و پایداری قطرات است [15]. روغن‌ها و اجزای چربی دوست را می‌توان در قطرات نانو محصور کرد، تا از ملکول‌های زیست فعال حساس و تجزیه پذیر در برابر شرایط محیطی محافظت کند، آزادسازی آن‌ها را کنترل کند، فراهمی زیستی آن‌ها را افزایش دهد و دستکاری یا ترکیب آن‌ها را در فرمول‌های آبی تسهیل کند. علاوه بر این، نانوامولسیون سازی می‌تواند ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی روغن‌های ضروری را حفظ کرده، و تبدیل محلول‌ها به پودرهای ریز را ممکن سازد تا طعم‌های نامطلوب را در صورت مصرف خوراکی بپوشاند و همچنین می‌تواند به عنوان حامل دارو یا حلال عمل کند یا به دلیل خواص دارویی خود تنها جزء فاز روغنی باشد [16]. یکی از روش‌های محافظت از خواص روغن‌های ضروری کپسوله کردن آن‌ها است و یک جایگزین جالب برای کپسوله کردن آن‌ها، امولسیون کردن است، زیرا این تکنیک دارای قابلیت بالایی برای نگهداری از ترکیبات فرار است، حلالیت اسانس و فراهمی زیستی اسانس‌ها را افزایش می‌دهد و از اکسیداسیون آن‌ها در طول ذخیره سازی به میزان زیادی جلوگیری می‌کند [8]. عنایتی فرد و همکاران در سال ۲۰۲۰، نانوامولسیون‌هایی با نسبت‌های مختلف سورفکتانت و اسانس تهیه کردند. آن‌ها نشان دادند که در تهیه امولسیون‌ها استفاده از توئین ۸۰ نسبت به توئین ۲۰ و اسپن ۸۰ بازدهی بالاتری داشت و اندازه ذرات به طور قابل توجهی کاهش یافت [17]. نانو امولسیون تهیه شده در این پژوهش پایدار بوده به طوری که پس از گذشت ۳۰ روز از نگهداری همچنان پتانسیل زتای آن منفی باقی ماند. پتانسیل زتا میزان اختلاف پتانسیل الکتریکی بین لایه لغزشی و پتانسیل در فاصله دور از ذره است. میزان پتانسیل زتا با چگالی بار سطحی نانو ذرات رابطه دارد. دلیل اصلی پایداری کلوئیدها، وجود بار سطحی روی ذرات است. این بارهای هم نام باعث می‌شوند تا ذرات یکدیگر را دفع کنند. این نیروی دافعه باعث می‌شود تا ذرات نتوانند به یکدیگر بپیوندند و تشکیل تجمع‌های بزرگ‌تر را بدهند و ناپایدار شوند. از این رو هرچه میزان بار سطحی ذرات کلویید بیشتر باشد کلویید پایدارتر است و ذرات آن دیرتر متراکم می‌شود و یا رسوب می‌کند. مقادیر پتانسیل زتا معمولاً در محدوده +۱۰۰ تا -۱۰۰ میلی ولت هست [18]، [19]. نمونه‌های ایده‌آل باید دارای رسانایی پایین‌تر از ۱ mS/cm داشته باشد که در نمونه‌های تازه تهیه شده نیز ویسکوزیته کم‌تر از ۱ بوده است و ویسکوزیته آن پس از گذشت ۳۰ روز تغییر نکرد. اگر رسانایی پس از نگهداری در دمای اتاق ثابت بماند، می‌توان آن را به عنوان نشانه‌ای از پایداری بدون وارونگی فاز نسبت داد [20]. هنگامی که وارونگی فاز رخ می‌دهد، رسانایی به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد [21]. در پژوهش حاضر از روش انرژی بالا برای تهیه نانوامولسیون استفاده شد. روش‌های انرژی بالا مبتنی بر استفاده از دستگاه‌های مکانیکی از جمله میکروسیال‌کننده‌ها، هموژنایزهای با فشار بالا یا دستگاه‌های اولتراسونیک (فرا صوت) هستند، که قادر به تولید مقادیر زیادی انرژی هستند که قطرات کوچک امولسیون را ایجاد می‌کنند، بنابراین، با افزایش مقدار انرژی ورودی، اندازه ذرات کاهش می‌یابد [22]. اندازه نانو ذرات تشکیل شده در هر دو غلظت ۱۰ و ۳۰ درصد زیر ۱۰۰ نانومتر بود که به خوبی اندازه در سطح نانو حفظ کرده است. نانوامولسیون سازی با دستگاه اولتراسوند در مقایسه با روش‌های دیگر، از موثرترین روش‌های به دست آوردن نانوامولسیون‌های پایدار با خواص ضد باکتریایی است [23]. Gosh و همکاران در سال ۲۰۱۳، جهت تهیه نانوامولسیون با استفاده از امواج اولتراسوند، اندازه قطرات را به حداقل رساند [24].

نانو امولسیون‌های تهیه شده در این مطالعه خواص ضد باکتری خود را در مقایسه با اسانس حفظ کرده اند و این نتیجه نشان داده که نانوامولسیونه کردن آن‌ها مانع از خاصیت ضد باکتری اسانس نشده است. حتی پس از گذشت ۳۰ روز از تهیه نانوامولسیون‌ها نیز خواص ضد باکتری از خود نشان دادند. همچنین در باکتری‌های تیمار شده با توئین ۸۰ و SDS، این سورفکتانت‌ها هیچ تاثیری بر روی مهار یا زنده مانگی باکتری‌ها نداشت که نشان می‌دهد تنها نانو اسانس است که باعث مهار رشد باکتری شده است. دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی شامل یک لایه پپتیدوگلیکان نازک و یک غشای بیرونی متشکل از دولایه فسفولیپیدی است که تقریباً نفوذ ناپذیر است و دسترسی به غشای سلولی را محدود می‌کند. قطرات کوچک نانوامولسیون‌ها قادرند اسانس‌ها را به سطح غشای سلولی بیاورد، دسترسی به سلول‌های میکروبی را افزایش دهد و اختلال در غشای سلولی را ممکن می‌سازد [25]. اتصال قطرات نانوامولسیون‌ها به غشای سلولی باکتری باعث کاهش غلظت اسیدهای چرب اشباع و تغییر پروفایل فسفولیپیدها در غشاء و ایجاد تغییرات ساختاری در غشاء، کاهش ATP داخل سلولی و همچنین افزایش ATP خارج سلولی می‌شود [26]. ادغام قطرات امولسیفایر با دو لایه فسفولیپیدی غشای سلولی باعث آزادسازی هدفمند اسانس در محل‌های مورد نظر می‌شود. مطالعات پیشین نشان داده اند که علی‌رغم اندازه نانو ذرات مشابه، استفاده از سورفکتانت‌های مختلف منجر به فعالیت ضد میکروبی متفاوتی می‌شود.

علاوه بر این، فعل و انفعالات خاص بین امولسیفایر و غشای سلولی نیز برای افزایش فعالیت ضد میکروبی اسانس نیز گزارش شده است [27]. انتشار پایدار اسانس ها از ذرات نانوامولسیون، مدت زمان فعالیت اسانس ها را طولانی تر می کند. ذرات نانوامولسیون به عنوان مخزن عمل می کند و با ملکول های اسانس در تعادل دینامیکی بین فاز پراکنده و فاز آبی است [25].

نتیجه گیری

نانوامولسیون های تهیه شده در این تحقیق، خاصیت ضدباکتریایی بالایی بر روی کشت باکتری /شرشیاکلی از خود نشان داد و نانوامولسیونه کردن اسانس مانع از خاصیت ضدباکتریایی آن نشد. همچنین با توجه به آنالیز های انجام شده و بررسی مورفولوژی آن ها، از نظر پایداری، اندازه ذرات و خواص فیزیکی و شیمیایی مناسب بود و علاوه بر این، پایداری و کارایی آن ها با نکه داری در دمای 4 درجه سانتی گراد حفظ شده بود. باتوجه به پایداری نانوامولسیون های اسانس گیاه آویشن تولیدشده، می توان نتیجه گرفت که اثرات ضد باکتریایی این ترکیب در مقایسه با اسانس اولیه افزایش یافته است. بر اساس نتایج این مطالعه، در غلظت های بالاتر اسانس، نانوامولسیون خواص فیزیکی شیمیایی و ضدباکتریایی بهتری نسبت به غلظت های کمتر اسانس نانوامولسیونی نشان داد. همچنین در درصد بیشتری از اسانس نانوامولسیون در غلظت های بالاتر تیمار، خواص ضد باکتریایی بهتر از اسانس خالص بود. با توجه به استقبال روزافزون در استفاده از اسانس های گیاهی در جهت کاهش اثرات ثانویه، کاهش هزینه ها و نقش گسترده آن ها، استفاده از نانوامولسیون اسانس ها می تواند تحول و قدم بزرگی در صنایع مختلف از جمله داروها، تغذیه و عطرها و خوشبو کننده ها باشد.

اعلام تعارض منافع

نویسنده گان این مقاله اعلام می کنند که در رابطه با انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده اند و منافی تجاری در این راستا وجود ندارد.

سپاسگزاری

نویسندگان پژوهش حاضر از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری جهت فراهم نمودن تسهیلات و حمایت مالی قدردانی می نمایند.

منابع

- [1] Sundararajan B., Moola A.K., Vivek K. and Kumari B.R. (2018). Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*). *Microbial Pathogenesis*, 125, 475-85.
- [2] Singh G., Kapoor I., Singh P., de Heluani C.S., de Lampasona M.P. and Catalan C.A. (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food Chemical Toxicology*, 46 (10), 3295-302.
- [3] Ferreira J. P., Alves D., Neves O., Silva J., Gibbs P. A. and Teixeira P. C. (2010). Effects of the components of two antimicrobial emulsions on food-borne pathogens. *Food Control*, 21 (3), 227-230.
- [4] Lingan K. (2018). A review on major constituents of various essential oils and its application. *Translational Medicine*, 8 (1000201), 2161-1025.
- [5] Fisher K. and Phillips C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer. *Trends in Food Science and Technology*, 19 (3), 156-164.
- [6] Antih J., Houdkova M., Urbanova K. and Kokoska L. (2021). Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* L. essential Oil Vapours and their GC/MS analysis using solid-phase microextraction and headspace sampling techniques. *Molecules*, 26 (21), 6553.
- [7] Javed H., Erum Sh., Tabassum S. and Ameen F. (2013). An overview on medicinal importance of *Thymus vulgaris*. *Journal of Asian Scientific Research*, 3 (10), 974-982.
- [8] Mahfoudhi N., Ksouri R. and Hamdi S. (2016). Nanoemulsions as potential delivery systems for bioactive compounds in food systems: Preparation, characterization, and applications in food industry. *Emulsions*, Academic Press, 365-403Pp. Cambridge.
- [9] Acosta E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 14 (1), 3-15.
- [10] McClements D.J. and Rao J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51 (4), 285-330.

- [11] Singletary K., (2016). Thyme; History, Applications, and Overview of Potential Health Benefits. *Nutrition Today*, 51 (1),40-50.
- [12] Lin P. C., Lee J. J. and Chang I. J. (2016). Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24 (3), 464-470.
- [13] Wooster T. J., Golding M. and Sanguansri P. (2008). Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir*, 24 (22), 12758-12765.
- [14] Zhang Y., Shang Z., Gao C., Du M., Xu S., Song H. and Liu T. (2014). Nanoemulsion for solubilization, stabilization, and in vitro release of pterostilbene for oral delivery. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*, 15 (4), 1000-1008.
- [15] Das A. K., Nanda P. K., Bandyopadhyay S., Banerjee R., Biswas S. and McClements D. J. (2020). Application of nanoemulsion-based approaches for improving the quality and safety of muscle foods: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19 (5), 2677-2700.
- [16] Saberi A.H., Fang Y. and McClements D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 39,1 95-102.
- [17] Enayatifard R., Akbari J., Babaei A., Rostamkalaei S.S., Hashemi S. M.H. and Habibi E. (2021). Anti-Microbial Potential of Nano-Emulsion form of Essential Oil Obtained from Aerial Parts of *Origanum Vulgare* L. as Food Additive. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 11 (2), 327.
- [18] Costa T.A. Morsy C.M. Matos M. Amorim M.E. Pintado A.P. Gomes J.A. and Teixeira V.M. (2009). Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for oral hygiene applications, in: XVIIth International Conference on Bioencapsulation, September 24-26, Groningen, Netherlands.
- [19] Pangi Z. and Beletsi A. (2003). Evangelatos K. PEG-ylated nanoparticles for biological and pharmaceutical application. *Advance Drug Delivery Reviews*, 24, 403-19.
- [20] Talegaonkar S. and Negi L.M. (2015). Nanoemulsion in drug targeting. Targeted drug delivery: concepts and design, Springer, 433-459Pp. Cham, Switzerland.
- [21] Junyaprasert V. B. and Morakul B. (2015). Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10 (1), 13-23.
- [22] Jasmina H., Džana O., Alisa E., Edina V. and Ognjenka R. (2017). Preparation of nanoemulsions by high-energy and lowenergy emulsification methods. CMBEBIH, Springer, 317-322Pp. Singapore.
- [23] Rodríguez-Rojo S., Varona S., Núñez M. and Cocero M. J. (2012). Characterization of rosemary essential oil for biodegradable emulsions. *Industrial Crops and Products*, 37 (1),137-140.
- [24] Gosh V., Mukherjee A. and Chandrasekaran N. (2013). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonic Sono-chemistry*, 20, 338-344.
- [25] Donsi F. (2018). Applications of nanoemulsions in foods Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization, eds S. M. Jafari and D. J. McClements . MA: Academic Press, 349-377Pp. Cambridge.
- [26] Di Pasqua R., Betts G., Hoskins N., Edwards M., Ercolini D. and Mauriello G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (12), 4863-4870.
- [27] Salvia-Trujillo L., Rojas-Graü M.A., Soliva-Fortun, R. and Martín-Belloso O. (2014). Formulation of Antimicrobial Edible Nanoemulsions with Pseudo-Ternary Phase. *Experimental Design. Food and Bioprocess Technology*, 3022-3032.