بررسی فعالیت ضدمیکروبی نانوالیاف پلیمری با افزودنی عصارهٔ حنا

زهراسادات میره‌ای[1*]، مینو صدری[2] و علی سلیمی[3]

دریافت: ۱۳۹۴/۸/۱۷/ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲۴/ چاپ: ۱۳۹۵/۹/۳۰

[1]گروه آموزشی نانوفناوری پزشکی، دانشکدهٔ علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم‌دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[2]پژوهشکدهٔ فناوری‌زیستی، دانشگاه صنعتی مالک‌اشتر، تهران، ایران
[3]مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
[*]مسئول مکاتبات: zs.mirei@yahoo.com

چکیده. عامل اصلی رنگ قرمز- نارنجی حنا، مولکولی به نام لاوسون بوده که خاصیت ضدمیکروبی، ضدتومور، ضدالتهاب و ضددرد را نیز برعهده دارد. کیتوزان بیوپلیمری با خصوصیاتی از قبیل استحکام زیاد، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری، غیرسمی‌بودن و اثر ضدمیکروبی است. الکتروریسی فرآیندی جهت تهیه الیاف پلیمری با قطری زیر میکرون با تخلخل و نسبت سطح به حجم بالا است. در این پژوهش، الکتروریسی کیتوزان با افزودن عصارهٔ حنا و ایجاد نانوالیاف با خواص ضدمیکروبی تحت بررسی قرار گرفت. نانوالیاف با اندازه قطر و توزیع اندازه مناسب به‌وسیلهٔ الکتروریسی محلول پلیمری کیتوزان/ پلی اتیلن اکساید (Chit/PEO) با نسبت ۱۰/۹۰ ساخته‌شد. در ادامه، عصارهٔ حنا به‌عنوان افزودنی به محلول پلیمری اضافه‌شده و به‌وسیلهٔ دستگاه الکتروریسی به‌صورت نانوالیاف بر روی سطح موردنظر الکتروریسی شد. پس از بررسی مورفولوژی نانوالیاف توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی، خصوصیات ضدمیکروبی محلول‌های پلیمری و نانوالیاف حاصل بررسی شد. در بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی دیده‌شد که نانوالیاف Chit/PEO با درصد پایین عصاره، همانند نانوالیاف Chit/PEO بدون افزودن عصاره، نانوالیافی با اندازه قطر و توزیع اندازهٔ مناسب تشکیل می‌دهد. در مطالعات باکتریولوژیکی مشاهده‌شد که محلول‌های پلیمری کیتوزان حاوی ۱٪ عصارهٔ حنا، بهتر از محلول پلیمری کیتوزان بدون افزودن عصاره، موجب توقف رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اوریوس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آیروژینوزا* می‌شود.

واژه‌های کلیدی. الکتروریسی، کیتوزان، پلی اتیلن اکساید، لاوسون، اثرات ضدباکتری

Investigation of antimicrobial activity of polymer nanofibers using henna additive

Zahra Sadat Mirei[1*], Minoo Sadri[2] & Ali Salimi[3]

Received 08.11.2015/ Accepted 13.06.2016/ Published 20.12.2016

[1]Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Nova Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (IAUPS)
[2]Biotechnology Institue, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran
[3]Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
*Correspondent author: zs.mirei@yahoo.com

Abstract. Main agent orange-red coloured pigment of henna is a molecule called Lawson which is responsible for antimicrobial, anti-tumor, anti-inflammatory and analgesic activity. Chitosan is a biopolymer with high strength, biocompatibility and biodegradability, non-toxicity and antimicrobial properties. Electrospinning is a method of producing submicron polymeric fibers with high porosity and high surface/volume ratio. In this study, electrospinning of chitosan/polyethylene oxide (Chit/PEO) nanofibers with the addition of henna extract to create nanofibers with antimicrobial properties were examined. Nanofibers was constructed by electrospinning of polymeric solution with proper size and size distribution of Chit/PEO with a ratio 90/10. Then, *Lawsonia inermis* (henna) extract as an additive to Chit/PEO copolymer was added and electrospined on the surface. After characterization of nanofibers using SEM, the antimicrobial properties of polymeric solution and nanofibers were investigated. The scanning electron micrographs showed that Chit/PEO nanofibres with a low percentage of henna extract have suitable diameters and size distribution similar to Chit/PEO nanofibres without adding extract. In bacteriological studies, it was found that chitosan polymer solutions containing 1% of henna extract has bactericidal properties against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteries better than polymer chitosan solution without adding the extract.
Keywords. electro-spinning, chitosan, polyethylene oxide, lawson, antibacterial effect

مقدمه

نانوالیاف، رشته‌های نسبتاً کوتاه با قطر کمتر از ۱۰۰۰ نانومتر هستند که روی یک صفحه به صورت یک لایه ایجاد می‌شوند. هنگامی که قطر الیاف به نانومتر کاهش پیدا می‌کند، خصوصیات جالب‌توجهی در آن ظاهر می‌شود که ازجمله آن می‌توان به نسبت بسیار بالای سطح به حجم، تخلخل بالا، قابلیت انعطاف‌پذیری در گروه‌های عاملی سطح و عملکرد مکانیکی عالی (سختی و

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.4.2]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.210]

کشسانی) اشاره کرد (Reneker & Chun, 1996). معمولاً برای تولید نانوالیاف پلیمری از روش الکتروریسی استفاده می‌شود. این روش محلول‌های پلیمری یا پلیمرهای مذاب را با اعمال کشش به الیاف و با استفاده از برق با ولتاژ بالا به شکل الیاف نانومتری در می‌آورد (Jayaraman *et al.*, 2004). از طرفی، استفاده از فناوری نانو در تهیهٔ الیاف علاوه‌بر بهبود خواص، مقدار پلیمر مورداستفاده را باتوجه به هزینه آن و رویکرد اقتصادی پژوهش، کاهش خواهد داد.

بیوپلیمر کیتوزان، هتروپلی‌ساکاریدی پلی‌کاتیون با واحدهای گلوکزآمین و N استیل‌گلوکزآمین است که از دی‌استیلاسیون ناقص کیتین به‌دست می‌آید. کیتین فراوان‌ترین پلی‌ساکارید طبیعت بعد از سلولز است که در اسکلت حشرات و سخت‌پوستانی چون میگو و خرچنگ به‌وفور یافت می‌شود (Dai *et al.*, 2011). محتوای آمینه، عامل اصلی ایجاد تفاوت‌ها در ساختار و خواص فیزیکوشیمیایی کیتوزان است که توزیع آن تصادفی بوده و آن را برای تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین‌مولکولی و درون‌مولکولی آسان می‌سازد (Zhang *et al.*, 2010). ویژگی‌های زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، مخاط‌چسبی و داشتن خواص ضدباکتری و ضدقارچ و تسریع بهبود زخم، آن را برای کاربردهای دارویی، پزشکی و همچنین صنعتی ارزشمند ساخته است. اثر ضدمیکروبی کیتوزان به‌علت بی‌ثبات‌کردن غشای خارجی و نفوذپذیری غشای پلاسمایی میکروارگانیسم است (Dai *et al.*, 2010). کیتوزان در محیط نسبتاً اسیدی (۶/۵ تا ۶/۳) بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را دارد. چراکه در این محیط گروه‌های آمین پروتونه هستند و می‌توانند با مولکول‌های آنیونی موجود در سطح سلول واکنش دهند (Liu *et al.*, 2001).

ساختار سخت گلوکز آمیدی زنجیره، بارهای مثبت مولکول، ویسکوزیته بالای کیتوزان و قابلیت ایجاد پیوند هیدروژنی عوامل محدودکننده‌ای به‌شمار می‌روند که الکتروریسی کیتوزان خالص را با مشکل مواجه می‌کند (Jiang *et al.*, 2004). چون از کیتوزان به‌تنهایی نانوالیاف خوبی نمی‌توان تهیه کرد استفاده از پلیمری دیگر چون پلی‌اتیلن‌اکساید به‌مقدار کم، که بین زنجیره‌های کیتوزان قرار گرفته، از پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌های کیتوزان کاسته و پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌های پلیمر کیتوزان و پلیمر کمکی برقرار نماید، می‌تواند به‌عنوان پلاستی سایزر عمل نموده و فرآیند الکتروریسی محلول کیتوزان را تسهیل نماید (Li & Xia, 2004).

حنا (henna) با نام علمی *Lawsonia inermis* L. اثر ضدمیکروبی وسیع‌الطیفی در برابر باکتری‌ها خصوصاً باکتری‌های گرم مثبت، باکتری‌های خاص مقاومت چنددارویی، ویروس‌ها، قارچ‌ها، انگل‌ها، مایکوباکتریوم، کپک‌ها و مخمرها داشته (El-Hag *et al.*, 2007) و با داشتن خواصی چون تعدیل‌کنندهٔ ایمنی، آنتی‌اکسیدان، ضدانعقاد خون (Borade *et al.*, 2011)، التیام‌دهندهٔ زخم (Evangeline *et al.*, 2011)، ضددرد، ضدتب، ضدالتهاب (Alia *et al.*, 1995)، ضدامراض پوستی، قابض و ضدسرطان (Zumrutdal *et al.*, 2008) می‌تواند برای درمان بیماری‌های پوستی و بهبود زخم‌های عفونی مورد استفاده قرار گیرد. تحقیق درمورد فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف حنا نشان می‌دهد بهترین فعالیت ضدمیکروبی عصارهٔ حنا هنگامی به‌دست می‌آید که عصارهٔ اتانولی از برگ خشک حنا گرفته شود (Abulyazid *et al.*, 2013). عصارهٔ حنا دارای مانیتول، اسید تانیک، اسید گالیک، موسیلاژ و لاوسون است. مولکول اصلی رنگ قرمز-نارنجی حنا، لاوسون با ساختار ۲-هیدروکسی-۱و۴ نفتاکینون است که نقش خواص ضدمیکروبی حنا را نیز بر عهده دارد (Dev *et al.*, 2009). فعالیت ضدمیکروبی لاوسون به‌دلیل هیدروکسیل‌های متعدد آزاد آن است که توانایی ترکیب با کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های موجود در دیوارهٔ سلولی باکتری را دارد و می‌تواند با اتصال به جایگاه‌های آنزیم آنها را غیرفعال کند (Al-Rubiay *et al.*, 2008).

هدف ما در این پژوهش تهیهٔ نانوالیاف بیوپلیمر کیتوزان به همراه پلی‌اتیلن‌اکساید (PEO) با امتزاج عصارهٔ حنا به‌روش الکتروریسی، بررسی مورفولوژی الیاف و تعیین خصوصیات ضدمیکروبی آن است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش پودر پلیمر کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (۱۹۰ kDa) و درجهٔ دی‌استیلاسیون ۸۰-۷۵٪ (Sigma-Aldrich)، پودر پلیمر پلی‌اتیلن‌اکساید با وزن مولکولی g/mol

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.4.2]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.210]

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.4.2]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.210]

۹۰۰۰۰۰ (Sigma-Aldrich)، اسیداستیک‌گلاسیال با درجهٔ خلوص ۹۹/۸٪ و وزن مولکولی ۶۰/۰۵ g/mol (Merck)، توئین۸۰ (Merck)، عصارهٔ الکلی برگ حنا (باریج اسانس)، محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck)، باکتری *استافیلو-کوکوس اوریوس* (ATCC, 6538)، *اشریشیا کلی* (ATCC, 35401) و *سودوموناس آیروژینوزا* (ATCC, 27853) مورد استفاده قرار گرفت.

تهیهٔ محلول پلیمری Chit/PEO ۹۰:۱۰

محلول‌های ۳٪wt کیتوزان و ۳٪wt پلی‌اتیلن‌اکساید در اسید-استیک ۰/۵ مولار هر یک جداگانه تهیه شدند. سپس با نسبت ۹۰ به ۱۰ حجمی-حجمی (کیتوزان- PEO) مخلوط، و با افزودن ۰/۱٪ v/v توئین۸۰، در یک بالن ژوژه ریخته و درب آن را با پارافیلم بسته، به‌مدت سه‌ساعت بر روی استیرر (استیرر حرارتی-مغناطیسی مدل RET basic ساخت شرکت IKA آلمان) با سرعت ۵۰۰ rpm و دمای ۳۷°C هم‌زده شد تا محلولی یکنواخت به‌دست آید.

تهیهٔ محلول پلیمری حاوی عصارهٔ حنا

به محلول Chit/PEO ۹۰:۱۰، عصارهٔ حنا به نسبت‌های مختلف ۱، ۲ و ۳٪ وزنی اضافه‌شده و به‌مدت سه‌ساعت بر استیرر با سرعت ۵۰۰ rpm و دمای ۳۷°C قرار گرفت. در پایان به‌منظور حذف کامل حباب‌ها، محلول‌های تهیه‌شده به‌مدت دوساعت در دمای محیط استراحت داده‌شدند.

الکتروریسی محلول‌ها

الکتروریسی محلول Chit/PEO در حضور و عدم‌حضور عصارهٔ حنا با استفاده از دستگاه الکتروریس مدل ES1000 Electroris (شرکت فن‌آوران نانومقیاس، ایران) انجام گرفت. محلول موردنظر در سرنگ پلاستیکی ۵ میلی‌لیتری (با قطر داخلی ۱۳/۶ میلی‌متر) ریخته و به یک سوزن (نازل) از جنس فولاد ضد-زنگ نوک صاف با اندازهٔ 18-gauge متصل شد. فاصلهٔ سوزن تا صفحه جمع کننده ۱۰ سانتی‌متر و سرعت تزریق ۰/۳ µL/h در نظر گرفته شد. الکتروریسی به‌مدت چهارساعت و با اعمال ولتاژ ۲۰ kV صورت‌گرفت. در آخر به‌منظور حذف حلال باقیمانده، فویل آلومینیمی حاوی نانوالیاف به‌مدت دوساعت در دمای اتاق نگهداری شد.

تهیهٔ تصاویر SEM

شکل و قطر الیاف حاصل از روند الکتروریسی با استفاده از تصویربرداری با دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل Cam Scan MV2300 تعیین شد. آماده‌سازی سطح نمونه نانوالیاف برای تصویربرداری SEM، توسط دستگاه پوشش‌دهنده coater مدل E5200 AUTOSPUTER انجام شد. تعیین اندازه و میانگین قطر الیاف بااستفاده از نرم‌افزار Image J و Digimizer صورت گرفت.

تست آنتی بیوگرام برای نانوالیاف

ارزیابی کیفی فعالیت ضدباکتری با روش اصلاح‌شده کربی-بایر انجام شد (Kong & Jang, 2008). نانوالیاف به شکل دایره‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر برش داده و با الکل اتانول ۷۵٪ به‌مدت یک‌ساعت استریل می‌شود. پس از استریل‌شدن و خشک‌شدن نانوالیاف، آب مقطر بر آن ریخته تا اتانول آن کاملاً شسته شده و در زیر هود قرار گرفته تا خشک شود (Nie *et al.*, 2011). محیط کشت مولر هینتون آگار طبق پروتکل شرکت سازنده تهیه شد و پس از استریل‌شدن در ظرف پتری ریخته و فرصت داده شد تا به‌صورت جامد درآید. با استفاده از سوآپ‌های پنبه‌ای استریل، از سوسپانسیون‌های میکروبی با غلظت نیم مک‌فارلند از هر یک از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اوریوس*، *اشریشیا کلی* و یا *سودوموناس آیروژینوزا* بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت آگار، کشت یکنواخت چمنی انجام شد. بعد از آن، نمونه‌های نانوالیاف بر روی پلیت قرار داده شدند. نانوالیاف Chit/PEO به-عنوان شاهد مثبت و دیسک کاغذی بلانک تمیز به‌عنوان شاهد منفی آزمایش شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷-۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری شد.

تست آنتی‌بیوگرام برای محلول‌های پلیمری

محلول Chit/PEO ۹۰:۱۰، محلول Chit/PEO/Li، عصارهٔحنا (شاهد مثبت) و اسیداستیک ۵۰٪ (شاهد منفی)، هرکدام به دیسک‌های بلانک استریل با قطر ۵ میلی‌متر آغشته شده، در زیر هود کاملاً خشک شدند. سپس دیسک‌ها به کمک پنس استریل در فواصل معین از یکدیگر بر روی سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد آگار تلقیح شده به‌صورت کشت چمنی با باکتری-های گرم منفی *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آیروژینوزا* و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اوریوس*، قرار گرفته و پلیت‌ها در

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.4.2]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.210]

دمای ۳۷-۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه شدند. تمام آزمایش‌ها با شرایط یکسان (دما و زمان انکوباسیون، محیط کشت و غیره) انجام گرفت و حداقل ۳ بار تکرار شد (Patel *et al.*, 2015).

تعیین MIC و MBC به روش رقت لوله‌ای

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) به‌عنوان پایین‌ترین غلظتی تعریف می‌شود که برای توقف رشد باکتری‌ها در انتهای ۲۴ ساعت انکوباسیون نیاز است. این روش با توجه به دستورالعمل مؤسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) انجام شد (Patel *et al.*, 2015). رقت‌های مختلف نانوالیاف Chit/PEO/Li در محلول اولیه به‌ترتیب از ۰/۰۱ تا ۰/۲۲ µg/ml به لوله‌های آزمایش حاوی ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی در محیط کشت مولر-هینتون براث که دارای $1/5\times10^8$ CFU/ml باکتری *سودوموناس آیروژینوزا* بود، اضافه شد. یک لوله آزمایش حاوی محیط‌کشت و نانوالیاف (فاقد باکتری) به‌عنوان شاهد مثبت و یک لوله آزمایش دارای محیط‌کشت و باکتری به غلظت نیم-مک‌فارلند (بدون نانوالیاف) به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. تمام لوله‌های آزمایش تحت دمای ۳۷°C انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری، تحت‌بررسی قرار گرفتند. پایین-ترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نشد و کاملاً شفاف بود به عنوان MIC درنظر گرفته شد. محتوای لوله حاوی غلظت MIC و دو لوله ماقبل آن در پلیت محیط کشت جامد مولر-هینتون آگار کشت داده و برای تعیین MBC (حداقل غلظت باکتری‌کشی) به‌مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد (Umar *et al.*, 2013).

نتایج

بررسی ریزساختار نانوالیاف (SEM)

تصاویر SEM حاصل از الکتروریسی محلول Chit/PEO ۹۰:۱۰ بیان‌گر آن است که نانوالیافی صاف و کشیده، پیوسته و بدون گره با میانگین قطر ۲۹±۱۱۵ نانومتر ایجاد شده است (شکل ۱A). افزودن ۱٪ عصارهٔ حنا به محلول پلیمری Chit/PEO و الکتروریسی از آن تحت‌شرایط ذکرشده، نانوالیافی پیوسته، ازنظر قطر الیاف یکنواخت، فاقد گره و مطلوب با میانگین قطر ۱۸±۸۰ نانومتر ایجاد می‌نماید (شکل ۱B). نانوالیاف Chit/PEO/Li حاوی ۲٪ عصارهٔ حنا، الیافی چندقطری و غیریکنواخت، دارای گره و با میانگین قطر ۳۰±۵۳ نانومتر ایجاد می‌کند (شکل ۱C). نانوالیاف Chit/PEO/Li حاوی ۳٪ عصاره حنا، الیافی ترد و شکننده، غیریکنواخت و دارای گره با میانگین قطر ۱۶±۳۷ نانومتر است (شکل ۱D). از آنجا که نانوالیاف حاوی ۲٪ و ۳٪ عصارهٔ حنا الیافی دارای گره ایجاد می‌کند که ازلحاظ مورفولوژی نامطلوب هستند، برای ادامه کار از استفاده از آن صرف‌نظر کرده و تنها از فرمولاسیون حاوی ۱٪ عصارهٔ حنا در نانوالیاف که الیافی از نظر قطر و یکنواختی و مورفولوژی قابل‌قبول است استفاده شد.

آنتی بیوگرام نانوالیاف

نتایج تست آنتی‌بیوگرام نانوالیاف نشان داد بر روی سطح نانوالیاف Chit/PEO و نانوالیاف ۱٪Chit/PEO/Li هیچ کلنی باکتری ایجاد نشد، این درحالی بود که در هربار تکرار این آزمایش، هالهٔ عدم رشد درخور توجهی پیرامون نانوالیاف بر محیط کشت جامد آگار، تشکیل نشده بود.

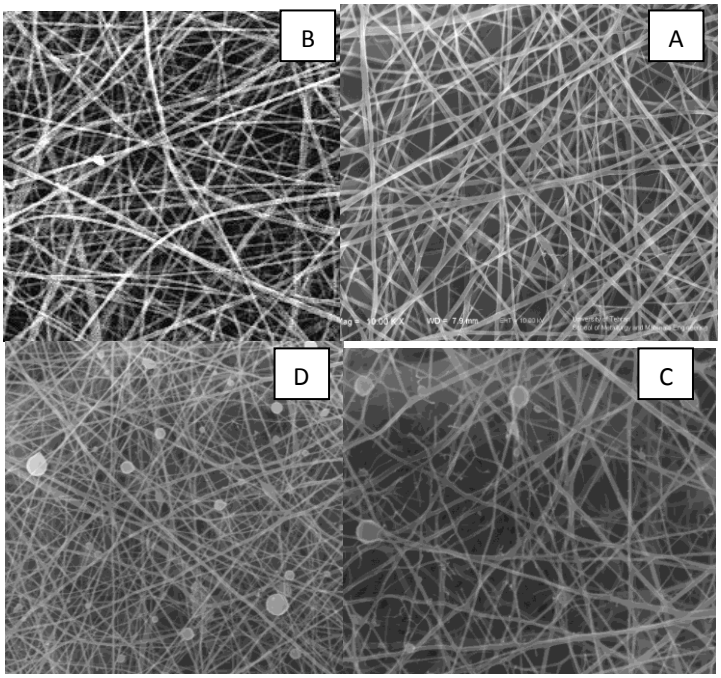
آنتی‌بیوگرام محلول‌ها

نتایج بررسی اثرات ضدباکتری دیسک‌های حاوی محلول‌های خشک‌شده برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس‌اوریوس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس‌آیروژینوزا*، در جدول ۱ آمده است. در نمونه اسیداستیک هالهٔ عدم رشدی مشاهده نشد. بدین‌ترتیب با خشک کردن محلول پلیمری، کل محتوای اسیداستیک تبخیر شده و اثر اسیداستیک در آزمایش‌های میکروبی حذف شد. لذا می‌توان ادعا کرد نتایج به‌دست آمده در جدول زیر، صرفاً به‌علت اثر پلیمر و ماده مؤثر عصارهٔ حنا، است. محلول پلیمری که حاوی ۱٪ عصارهٔ حنا بود، اثر ضدمیکروبی خوبی علیه باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های گرم منفی *سودوموناس آیروژینوزا* و *اشریشیا کلی* داشت.

این اثر ضدباکتری به مراتب قوی‌تر از اثر ضدباکتری محلول پلیمری کیتوزان فاقد عصارهٔ حنا بود. اثر ضدباکتری عصارهٔ حنا در برابر باکتری‌های گرم منفی مورد آزمایش کمتر ولی نزدیک به نتایج محلول پلیمری کیتوزان حاوی عصارهٔ حنا بود.

تعیین MIC و MBC نانوالیاف Chit/PEO/Li

مشاهده‌ها نشان داد حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) نانوالیاف



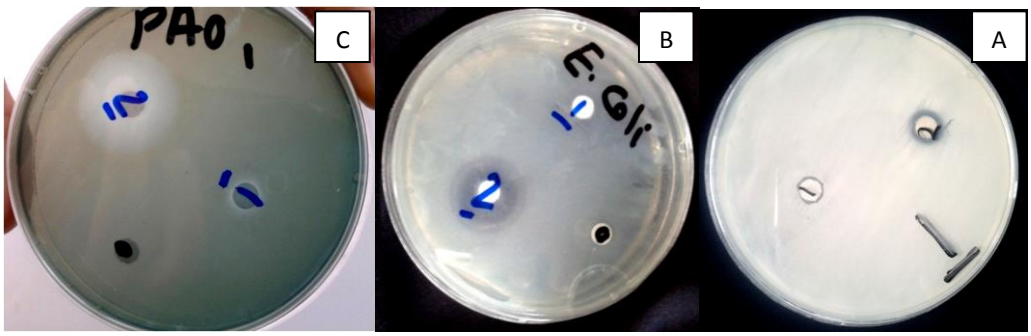
شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نانوالیاف پلیمری الکتروریسی‌شده. **A:** Chit/PEO ۹۰:۱۰، **B:** Chit/PEO/Li ٪۱، **C:** ٪۲ Chit/PEO/Li، **D:** ٪۳ Chit/PEO/Li.

Fig. 1. Scanning electron microscopy (SEM) photographs of electrospun polymeric nanofibers. **A:** Chit/PEO 90:10, **B:** Chit/PEO/Li 1%, **C:** Chit/PEO/Li 2%, **D:** Chit/PEO/Li 3%.

جدول ۱- نتایج بررسی‌های ضدباکتریایی محلول‌های خشک‌شده.

Table 1. Results of antibacterial activities of dried solutions.

نوع باکتری		گرم منفی		گرم مثبت
نام باکتری		*سودوموناس آیروژینوزا*	*اشریشیا کلی*	*استافیلوکوک اوریوس*
میانگین قطر هاله عدم رشد (mm)	عصارهٔ حنا (شاهد مثبت)	۱۷	۱۷	۱۶
	اسید استیک (شاهد منفی)	۰	۰	۰
	محلول Chit/PEO	۷	۶/۵	۷
	محلول Chit/PEO/Li ٪۱	۱۸	۱۸	۸



شکل ۲- نتایج تست آنتی‌بیوگرام برای دیسک‌های خشک‌شده محلول Chit/PEO (شمارهٔ ۱)، محلول Chit/PEO/Li (شمارهٔ ۲) و اسیداستیک (شمارهٔ ۰) بر باکتری‌های **A:** *سودوموناس آیروژینوزا*، **B:** *اشریشیا کلی* و **C:** *استافیلوکوکوس اوریوس*.

Fig. 2. Results of antibiogram test for dried solution discs of Cit/PEO (1), Chit/PEO/Li (2) and acetic acid (0) on: **A:** *Pseudomonas aeruginosa* , **B:** *Escherichia coli* and **C:** *Staphylococcus aureus.*

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.4.2]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.210]

Chit/PEO/Li برای باکتری *سودوموناس آیروژینوزا* برابر با ۰/۰۴ mg/ml بود. MBC این نانوالیاف نیز همین مقدار به‌دست آمد (MIC=MBC = ۰/۰۴ mg/ml).

بحث

طیف فعالیت میکروبی کیتوزان شامل قارچ‌های رشته‌ای، مخمرها و باکتری‌ها بوده، اغلب موجب مهار رشد باکتری‌ها می‌شود. فعالیت ضدمیکروبی طبیعی کیتوزان کمک می‌کند تا رشد باکتری‌های فرصت‌طلب که موجب عفونت‌های ثانویه می‌شود کنترل شود (Ma *et al.*, 2005). ماهیت پلی‌کاتیونی کیتوزان عامل اساسی در ایجاد برهم‌کنش با اجزای سطح با بار منفی بسیاری از قارچ‌ها و باکتری‌ها بوده که این باعث نشت مواد داخل سلولی و مرگ این سلول‌ها می‌شود (Lim & Hudson, 2003).

تهیهٔ نانوالیاف به‌وسیلهٔ الکتروریسی کیتوزان تنها در حضور پلیمر دوم امکان‌پذیر است. Bhattarai و همکاران (2005) از PEO به‌عنوان پلیمر کمکی در الکتروریسی کیتوزان استفاده کرده و توضیح دادند که تشکیل نانوالیاف کیتوزان شدیداً به نسبت جرمی Chit/PEO بستگی دارد. همچنین عنوان کردند که مشکل اصلی الکتروریسی کیتوزان، انحلال‌پذیری ضعیف کیتوزان و ویسکوزیتهٔ بالای محلول آبی آن است و PEO موجب کاهش ویسکوزیته محلول کیتوزان می‌شود و با برهم‌کنش با کیتوزان به‌وسیلهٔ پیوند هیدروژنی، محلول قابل ریسندگی در غلظت‌های بالاتر پلیمر ایجاد کرده که موجب کاهش ویسکوزیته محلول و افزایش در حلالیت کیتوزان می‌شود. Pakravan و همکاران (2011) توانستند نانوالیاف با قطر ۱۲۰-۶۰ نانومتر و فاقد گره از کیتوزان با دی‌استیلاسیون بالا در اسیداستیک ۵۰٪ در حضور محتوای پایین PEO (۱۰٪) ایجاد کنند. آنها افزایش دمای فرآیند را (۴۰ الی ۸۰°C) عاملی برای پایدارسازی جت و اصلاح توانایی ریسندگی محلول‌های کیتوزان بیان کردند. افزایش محتوای کیتوزان نسبت به PEO در محلول، از ۵۰٪ به ۹۰٪ موجب کاهش چشمگیر قطر نانوالیاف Chit/PEO می‌شود که به‌خاطر کاهش ویسکوزیته و افزایش رسانایی می‌باشد. نانوالیاف Chit/PEO با نسبت ۹۰:۱۰ پیوستگی خوبی را در محیط آبی از خود نشان داده، اثر ضدمیکروبی خوبی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی داشته است (Sadri *et al.*, 2012). در پژوهش حاضر، محلول پلیمری Chit/PEO با نسبت ۹۰:۱۰ نانوالیاف مناسبی ایجاد کرد.

گیاه حنا دارای فعالیت ضدمیکروبی در برابر طیف وسیعی از قارچ‌ها، درماتوفیت‌ها، باکتری‌ها، انگل‌ها، ویروس‌ها، تریپانوزوم و گال است که اثر خوبی در التیام زخم، سوختگی، امراض پوستی و التهاب دارد. Avci و همکاران (2013) با تولید نانوالیاف پلیمرهای مصنوعی PEO و PVA به‌همراه عصارهٔ حنا ازطریق الکتروریسی، اثر باکتری‌کشی آن را در مقابل *استافیلو-کوکوس اوریوس* و فعالیت باکتریوستاتیک در برابر *اشریشیا کلی* در غلظت ۲/۷۹ درصد وزنی حنا که درصد بهینه عصارهٔ حنا در محلول PEO و PVA بود مشاهده نمودند. افزودن عصارهٔ برگ حنا با نسبت ۱٪ به محلول پلیمری Chit/PEO و الکتروریسی از آن نه‌تنها نانوالیافی یکنواخت و فاقد گره به قطر میانگین ۸۰ نانو-متر ایجاد کرد، بلکه حضور لاوسون توانست اثر خوبی بر فعالیت ضدباکتری نانوالیاف کیتوزان به‌جای بگذارد. نتایج آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام محلول‌ها نشان داد که حضور درصد بسیار پایین از عصارهٔ حنا می‌تواند اثر ضدمیکروبی بسیار خوبی را در ترکیب Chit/PEO/Li ایجاد نماید. این اثر ضدمیکروبی در مورد باکتری‌های گرم منفی *سودوموناس آیروژینوزا* و *اشریشیا کلی* به-مراتب بیشتر از باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اوریوس* است؛ که این می‌تواند به خاطر محکم‌تر بودن دیوارهٔ سلولی باکتری‌های گرم مثبت باشد. درمورد باکتری‌های گرم منفی، سیستم Chit/PEO/Li اثر ضدباکتری بهتری را نسبت‌به هم عصارهٔ حنا و هم ترکیب پلیمری کیتوزان داشته‌است که اثر هم‌افزایی ترکیب حنا با کیتوزان را درمقایسه با پلیمر و حنای تنها تأیید می‌کند. Chit/PEO اثر مشابهی را بر باکتری گرم مثبت و منفی داشت. اثر ضد باکتری عصارهٔ حنا بر باکتری‌های گرم منفی با اختلاف کمی نسبت به باکتری گرم مثبت بیشتر بود.

براساس نتایج به‌دست آمده از بررسی اثرات ضد باکتری نانوالیاف به روش آنتی بیوگرام، نانوالیاف پلیمری کیتوزان حاوی عصارهٔ حنا یا فاقد آن، بر روی محیط کشت آگار اثر ضدباکتری از خود نشان نمی‌دهد. لذا محیط کشت جامد، محیط مناسبی برای

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.4.2]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.210]

بررسی ضدمیکروبی نانوالیاف نبوده، جهت بررسی اثرات ضدمیکروبی الیاف از روش رقیق‌سازی مایع استفاده شد. در این پژوهش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) نانوالیاف Chit/PEO/Li برای باکتری *سودوموناس آیروژینوزا* برابر بود با ۰/۰۴ mg/ml که این مقدار پایین‌تر از گزارش‌های دیگر ترکیبات ضدمیکروبی چون نانوغشای متخلخل نقره/اورگانو آلکوکسی سیلان با MIC برابر با ۰/۳ mg/ml (Umar *et al.*, 2013) و ترکیب پلیمر/AgBr با MIC معادل ۰/۶ mg/ml (Sambhy *et al.*, 2006) بود. همچنین پایین‌ترین غلظت باکتری‌کشی (MBC) برای این نانوالیاف عددی برابر با MIC و معادل ۰/۰۴ mg/ml بود.

نتیجه‌گیری

استفاده از عصارهٔ حنا در محلول پلیمری کیتوزان، خواص ضدباکتری محلول را خصوصاً در برابر باکتری‌های گرم منفی بررسی شده در پژوهش بهبود می‌بخشد. الکتروریسی از محلول پلیمری Chit/PEO/Li با نسبت عصارهٔ حنا ۱٪، نانوالیافی دارای ویژگی ضدباکتری با قطر میانگین ۸۰ نانومتر ایجاد می‌کند که ازلحاظ مورفولوژی و اندازهٔ قطر الیاف مطلوب است.

سپاسگزاری

از همکاری مدیر گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه بقیه‌الله و مسئولان آزمایشگاه قارچ-شناسی و میکروب‌شناسی این دانشگاه برای فراهم‌نمودن امکانات و تسهیلات لازم قدردانی می‌شود.

REFERENCES

Abulyazid, I., Mahdy, E.M. and Ahmed, R.M. 2013. Biochemical study for the effect of henna (*Lawsonia inermis*) on Escherichia coli. – Arabian J. Chem. 6: 265-273.

Al-Rubiay, K.K., Jaber, N.N., Al-Mhaawe, B. and Alrubaiy, L.K. 2008. Antimicrobial efficacy of henna extracts. – Oman Med. J. 23: 253-256.

Alia, B., Bashir, A. and Tanira, M. 1995. Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic effects of *Lawsonia inermis* L. (henna) in rats. – Pharmaco. 51: 356-363.

Avci, H., Monticello, R., and Kotek, R. 2013. Preparation of antibacterial PVA and PEO nanofibers containing *Lawsonia Inermis* (henna) leaf extracts. – J. Biomate. Sci. Polymer Edition 24: 1815-1830.

Bhattarai, N., Edmondson, D., Veiseh, O., Matsen, F.A. and Zhang, M. 2005. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. – Biomat. 26: 6176-6184.

Borade, A.S., Kale, B.N. and Shete, R.V. 2011. A phytopharmacological review on *Lawsonia inermis* (Linn.). – Int. J. Pharm. Life. Sci. 2: 536-541.

Dai, T., Huang, Y. Y., Sharma, S.K., Hashmi, J.T., Kurup, D.B. and Hamblin, M.R. 2010. Topical antimicrobials for burn wound infections. – Recent Patents on Anti-infective Drug Discov. 5: 124-151.

Dai, T., Tanaka, M., Huang, Y.Y. and Hamblin, M.R. 2011. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. – Expert. Rev. Anti. Infect. Ther. 9: 857-879.

Dev, V.G., Venugopal, J., Sudha, S., Deepika, G. and Ramakrishna, S. 2009. Dyeing and antimicrobial characteristics of chitosan treated wool fabrics with henna dye. – Carbohyd. Poly. 75: 646-650.

El-Hag, A., Al-Jabri, A. and Habbal, O. 2007. Anti-microbial properties of *Lawsonia inermis* (henna): a review. – Austr. J. Med. Herbalism 19: 114-125.

Evangeline, D., Shankar, R.B., Reddy, R.K. and Kumar, B. 2011. Formulation and evaluation of *Lawsonia intermits* paste. – Int. J. Resea. Pharmaceu. Biomed. Scien. 2: 687-690.

Jayaraman, K., Kotaki, M., Zhang, Y., Mo, X. and Ramakrishna, S. 2004. Recent advances in polymer nanofibers. – J. Nanoscie. and Nanotech. 4: 52-65.

Jiang, H., Fang, D., Hsiao, B., Chu, B. and Chen, W. 2004. Preparation and characterization of ibuprofen-loaded poly (lactide-co-glycolide)/poly (ethylene glycol)-g-chitosan electrospun membranes. – J. Biomat. Scie. Polymer Edition: 279-296.

Kong, H. and Jang, J. 2008. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. – Langmuir 24: 2051-2056.

Li, D. and Xia, Y. 2004. Direct fabrication of composite and ceramic hollow nanofibers by electrospinning. – Nano Let. 4: 933-938.

Lim, S.H. and Hudson, S.M. 2003. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. – J. Macromol. Scie., Part C: Polymer Reviews 43: 223-269.

Liu, X., Lin Guan, Y., Zhi Yang, D., Li, Z. and De Yao, K. 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. – J. Appl. Poly. Scie. 79:1324-1335.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.4.2]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.210]

Ma, Z., Kotaki, M., Inai, R. and Ramakrishna, S. 2005. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. – Tissue Eng. 11: 101-109.

Nie, H., Shen, X., Zhou, Z., Jiang, Q., Chen, Y., Xie, A. and Han, C.C. 2011. Electrospinning and characterization of konjac glucomannan/chitosan nanofibrous scaffolds favoring the growth of bone mesenchymal stem cells. – Carbohyd. Poly. 85: 681-686.

Pakravan, M., Heuzey, M.C. and Ajji, A. 2011. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. – Polymer 52: 4813-4824.

Patel, J., Cockerill, F., Alder, J., Bradford, P. and Eliopoulus, G. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S25. – Clinical and Laboratory Standards Institute, 226 pp, Wayne, PA.

Reneker, D.H. and Chun, I. 1996. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. – Nanotech. 7: 216-223.

Sadri, M., Maleki, A., Agend, F. and Hosseini, H. 2012. Retracted: Fast and efficient electrospinning of chitosan-poly (ethylene oxide) nanofibers as potential wound dressing agents for tissue engineering. – J. Appl. Poly. Sci. 126: 2077-2077.

Sambhy, V., MacBride, M.M., Peterson, B.R. and Sen, A. 2006. Silver bromide nanoparticle/polymer composites: dual action tunable antimicrobial materials. – J. Am. Chem. Soc. 128: 9798-9808.

Umar, S., Liu, Y., Wu, Y., Li, G., Ding, J., Xiong, R. and Chen, J. 2013. Highly potent silver-organoalkoxysilane antimicrobial porous nanomembrane. – Nanoscale Res. Lett. 8: 8-164.

Zhang, J., Xia, W., Liu, P., Cheng, Q., Tahi, T., Gu, W. and Li, B. 2010. Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. – Marine Drug. 8: 1962-1987.

Zumrutdal, M.E., Ozaslan, M., Tuzcu, M., Kalender, M.E., Daglioglu, K., Akova, A., Isık Didem Karagöz, I., Halil Kilic, I., Colak, O. and Köksal, F. 2008. Effect of *Lawsonia inermis* treatment on mice with sarcoma. – African J. Biotech. 7: 2781-2786.

*****

How to cite this article:

Mirei, Z.S., Sadri, M. and Salimi, A. 2016. Investigation of antimicrobial activity of polymer nanofibers using henna additive. Nova Biol. Rep. 3: 217-210.

میره‌ای، ز.س.، صدری، م. و سلیمی، ع. ۱۳۹۵. بررسی فعالیت ضدمیکروبی نانوالیاف پلیمری با افزودنی عصارهٔ حنا. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳: ۲۱۷-۲۱۰.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-08]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.4.2]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.210]