

## بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوالیاف پلیمری با افزودنی عصاره حنا

زهراسادات میره‌ای<sup>۱\*</sup>، مینو صدری<sup>۲</sup> و علی سلیمی<sup>۳</sup>

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

گروه آموزشی نانوفناوری پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

\*مسئول مکاتبات: zs.mirei@yahoo.com

**چکیده.** عامل اصلی رنگ قرمز- نارنجی حنا، مولکولی به نام لائوسون بوده که خاصیت ضد میکروبی، ضد تومور، ضد التهاب و ضد درد را نیز برعهده دارد. کیتوزان بیوپلیمری با خصوصیات از قبیل استحکام زیاد، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری، غیرسمی بودن و اثر ضد میکروبی است. الکترورسی فرآیندی جهت تهیه لیاف پلیمری با قطری زیر میکرون با تخلخل و نسبت سطح به حجم بالا است. در این پژوهش، الکترورسی کیتوزان با افزودن عصاره حنا و ایجاد نانوالیاف با خواص ضد میکروبی تحت بررسی قرار گرفت. نانوالیاف با اندازه قطر و توزیع اندازه مناسب به وسیله الکترورسی محلول پلیمری کیتوزان/ پلی اتیلن اکساید (Chit/PEO) با نسبت ۱۰/۹۰ ساخته شد. در ادامه، عصاره حنا به عنوان افزودنی به محلول پلیمری اضافه شده و به وسیله دستگاه الکترورسی به صورت نانوالیاف بر روی سطح مورد نظر الکترورسی شد. پس از بررسی مورفولوژی نانوالیاف توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی، خصوصیات ضد میکروبی محلول‌های پلیمری و نانوالیاف حاصل بررسی شد. در بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی دیده شد که نانوالیاف Chit/PEO با درصد پایین عصاره، همانند نانوالیاف Chit/PEO بدون افزودن عصاره، نانوالیافی با اندازه قطر و توزیع اندازه مناسب تشکیل می‌دهد. در مطالعات باکتریولوژیکی مشاهده شد که محلول‌های پلیمری کیتوزان حاوی ۱٪ عصاره حنا، بهتر از محلول پلیمری کیتوزان بدون افزودن عصاره، موجب توقف رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آبروزینوزا* می‌شود.

**واژه‌های کلیدی.** الکترورسی، کیتوزان، پلی اتیلن اکساید، لائوسون، اثرات ضد باکتری

## Investigation of antimicrobial activity of polymer nanofibers using henna additive

Zahra Sadat Mirei<sup>1\*</sup>, Mino Sadri<sup>2</sup> & Ali Salimi<sup>3</sup>

Received 08.11.2015/ Accepted 13.06.2016/ Published 20.12.2016

<sup>1</sup>Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Nova Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (IAUPS)

<sup>2</sup>Biotechnology Institute, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

<sup>3</sup>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 nanofibers with a low percentage of henna extract have suitable diameters and size distribution similar to Chit/PEO nanofibers 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* bacteria better than polymer chitosan solution without adding the extract.

**Keywords.** electro-spinning, chitosan, polyethylene oxide, lawson, antibacterial effect

## مقدمه

جالب توجهی در آن ظاهر می‌شود که از جمله آن می‌توان به نسبت بسیار بالای سطح به حجم، تخلخل بالا، قابلیت انعطاف‌پذیری در گروه‌های عاملی سطح و عملکرد مکانیکی عالی (سختی و

نانوالیاف، رشته‌های نسبتاً کوتاه با قطر کمتر از ۱۰۰۰ نانومتر هستند که روی یک صفحه به صورت یک لایه ایجاد می‌شوند. هنگامی که قطر لیاف به نانومتر کاهش پیدا می‌کند، خصوصیات

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 ضد میکروبی 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 تعدیل‌کننده ایمنی، آنتی‌اکسیدان، ضد انعقاد خون (Borade et al., 2011)، التیام-دهنده زخم (Evangeline et al., 2011)، ضد درد، ضد التهاب (Alia et al., 1995)، ضدامراض پوستی، قابض و ضد سرطان (Zumrutdal et al., 2008) می‌تواند برای درمان بیماری‌های پوستی و بهبود زخم‌های عفونی مورد استفاده قرار گیرد. تحقیق درمورد فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف حنا نشان می‌دهد بهترین فعالیت ضد میکروبی عصاره حنا هنگامی به-دست می‌آید که عصاره اتانولی از برگ خشک حنا گرفته شود (Abulyazid et al., 2013). عصاره حنا دارای مانیتول، اسید تانیک، اسید گالیک، موسیلاژ و لاوسون است. مولکول اصلی رنگ قرمز-نارنجی حنا، لاوسون با ساختار ۲-هیدروکسی-۱-۴ نفتا کینون است که نقش خواص ضد میکروبی حنا را نیز بر عهده دارد (Dev et al., 2009). فعالیت ضد میکروبی لاوسون به دلیل هیدروکسیل‌های متعدد آزاد آن است که توانایی ترکیب با کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های موجود در دیواره 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 تهیه نانوالیاف بیوپلیمر کیتوزان به همراه پلی‌اتیلن‌اکساید (PEO) با امتزاج عصاره حنا به روش الکتروریسی، بررسی مورفولوژی الیاف و تعیین خصوصیات ضد میکروبی آن است.

### مواد و روش‌ها

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

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 تهیه الیاف علاوه بر بهبود خواص، مقدار پلیمر مورد استفاده را با توجه به هزینه آن و رویکرد اقتصادی پژوهش، کاهش خواهد داد.

بیوپلیمر کیتوزان، هتروپلی ساکاریدی پلی کاتیون با واحدهای گلوکز آمین و N استیل گلوکز آمین است که از دی‌استیلاسیون ناقص کیتین به دست می‌آید. کیتین فراوان‌ترین پلی ساکارید طبیعت بعد از سلولز است که در اسکلت حشرات و سخت پوستانی چون میگو و خرچنگ به وفور 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 بین مولکولی و درون-مولکولی آسان می‌سازد (Zhang et al., 2010). ویژگی‌های زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، مخاط‌چسبی و داشتن خواص ضد باکتری و ضد قارچ و تسریع بهبود زخم، آن را برای کاربردهای دارویی، پزشکی و همچنین صنعتی ارزشمند ساخته است. اثر ضد میکروبی کیتوزان به علت بی‌ثبات کردن غشای خارجی و نفوذپذیری غشای پلاسمایی میکروارگانیسم است (Dai et al., 2010). کیتوزان در محیط نسبتاً اسیدی (۶/۵ تا ۶/۳) بیشترین فعالیت ضد میکروبی 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 به شمار می‌روند که الکتروریسی کیتوزان خالص را با مشکل مواجه می‌کند (Jiang et al., 2004). چون از کیتوزان به تنهایی نانوالیاف خوبی نمی‌توان تهیه کرد استفاده از پلیمری دیگر چون پلی‌اتیلن‌اکساید به مقدار کم، که بین زنجیره‌های کیتوزان قرار گرفته، از پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌های کیتوزان کاسته و پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌های

شکل و قطر الیاف حاصل از روند الکترورسی 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 AUTOSPUNTER انجام شد. تعیین اندازه و میانگین قطر الیاف با استفاده 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٪ به مدت 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 هیتون آگار طبق پروتکل شرکت سازنده تهیه شد و پس از استریل‌شدن در ظرف پتری ریخته و فرصت داده شد تا به صورت جامد درآید. با استفاده از سوآپ‌های پنبه‌ای استریل، از سوسپانسیون‌های میکروبی با غلظت نیم مک‌فارلند از هر یک از باکتری‌های استافیلوکوکوس اوریوس، اشیریشیا کلی و سودوموناس آیروزینوزا 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 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری شد.

### تست آنتی بیوگرام برای محلول‌های پلیمری

محلول Chit/PEO ۹۰:۱۰، محلول Chit/PEO/Li، عصاره حنا (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 به صورت کشت چمنی با باکتری‌های گرم منفی اشیریشیا کلی و سودوموناس آیروزینوزا و باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اوریوس، قرار گرفته و پلیت‌ها در

۹۰:۱۰ (Sigma-Aldrich)، اسیداستیک گلاسیال با درجه خلوص ۹۹/۸٪ و وزن مولکولی ۶۰/۰۵ g/mol (Merck)، توئین ۸۰ (Merck)، عصاره الکلی برگ حنا (باریج اسانس)، محیط کشت مولر هیتون آگار (Merck)، باکتری استافیلوکوکوس اوریوس (ATCC, 6538)، اشیریشیا کلی (ATCC, 35401) و سودوموناس آیروزینوزا (ATCC, 27853) مورد استفاده قرار گرفت.

### تهیه 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 توئین ۸۰، در یک بالن ژوژه ریخته و درب آن را با پارافیلیم بسته، به مدت سه ساعت 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 به دست آید.

### تهیه محلول پلیمری حاوی عصاره حنا

به محلول Chit/PEO ۹۰:۱۰، عصاره حنا به نسبت‌های مختلف ۱، ۲ و ۳٪ وزنی اضافه شده و به مدت سه ساعت بر استیرر با سرعت ۵۰۰ rpm و دمای ۳۷°C قرار گرفت. در پایان به منظور حذف کامل حباب‌ها، محلول‌های تهیه‌شده به مدت دوساعت در دمای محیط استراحت داده شدند.

### الکترورسی محلول

الکترورسی محلول Chit/PEO در حضور و عدم حضور عصاره 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 اندازه 18-gauge متصل شد. فاصله سوزن تا صفحه جمع‌کننده ۱۰ سانتی‌متر و سرعت تزریق ۰/۳ μL/h در نظر گرفته شد. الکترورسی به مدت چهارساعت و با اعمال ولتاژ ۲۰ kV صورت گرفت. در آخر به منظور حذف حلال باقیمانده، فویل آلومینیومی حاوی نانوالیاف به مدت دوساعت در دمای اتاق نگهداری شد.

### تهیه تصاویر SEM

نانومتر ایجاد می‌نماید (شکل ۱B). نانوالیاف Chit/PEO/Li حاوی ۲٪ عصاره حنا، الیافی چندقطری و غیریکنواخت، دارای گره و با میانگین قطر  $53 \pm 30$  نانومتر ایجاد می‌کند (شکل ۱C). نانوالیاف Chit/PEO/Li حاوی ۳٪ عصاره حنا، الیافی ترد و شکننده، غیریکنواخت و دارای گره با میانگین قطر  $37 \pm 16$  نانومتر است (شکل ۱D). از آنجا که نانوالیاف حاوی ۲٪ و ۳٪ عصاره حنا الیافی دارای گره ایجاد می‌کند که از لحاظ مورفولوژی نامطلوب هستند، برای ادامه کار از استفاده از آن صرف‌نظر کرده و تنها از فرمولاسیون حاوی ۱٪ عصاره حنا در نانوالیاف که الیافی از نظر قطر و یکنواختی و مورفولوژی قابل قبول است استفاده شد.

#### آنتی بیوگرام نانوالیاف

نتایج تست آنتی‌بیوگرام نانوالیاف نشان داد بر روی سطح نانوالیاف Chit/PEO/Li و نانوالیاف Chit/PEO/Li/۱ هیچ کلنی باکتری ایجاد نشد، این در حالی بود که در هر بار تکرار این آزمایش، هاله 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 *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آیروزینوزا*، در جدول ۱ آمده است. در نمونه اسیداستیک هاله عدم رشدی مشاهده نشد. بدین ترتیب 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 عصاره حنا، است. محلول پلیمری که حاوی ۱٪ عصاره حنا بود، اثر ضد میکروبی خوبی علیه باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های گرم منفی *سودوموناس آیروزینوزا* و *اشریشیا کلی* داشت.

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

#### تعیین MIC و MBC نانوالیاف Chit/PEO/Li

مشاهده‌ها نشان داد حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) نانوالیاف

دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت 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).

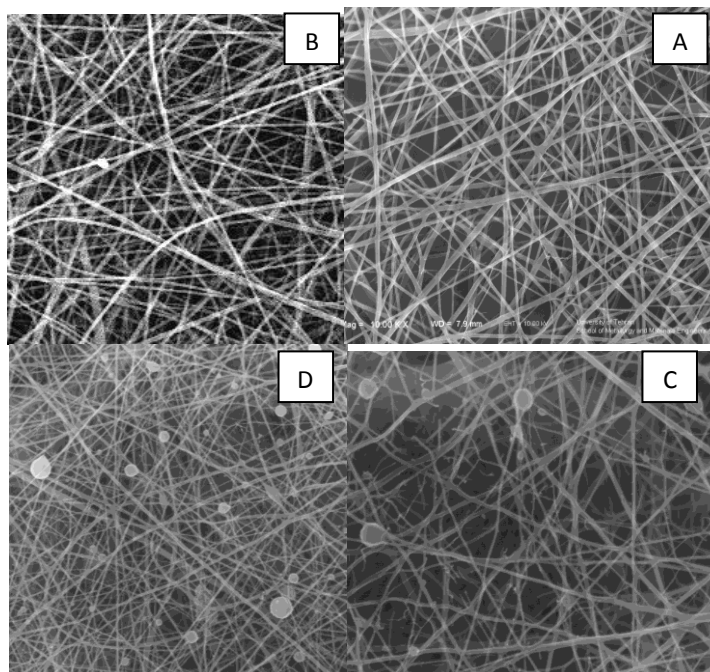
#### تعیین MIC و MBC به روش رقت لوله‌ای

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 به ترتیب از ۰/۰۱ تا  $0.22 \mu\text{g/ml}$  به لوله‌های آزمایش حاوی ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی در محیط کشت مولر-هینتون برآث که دارای  $1.0 \times 10^8$  CFU/ml باکتری *سودوموناس آیروزینوزا* بود، اضافه شد. یک لوله آزمایش حاوی محیط کشت و نانوالیاف (فاقد باکتری) به‌عنوان شاهد مثبت و یک لوله آزمایش دارای محیط کشت و باکتری به غلظت نیم-مک‌فارلند (بدون نانوالیاف) به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. تمام لوله‌های آزمایش تحت دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری، تحت بررسی قرار گرفتند. پایین‌ترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نشد و کاملاً شفاف بود به عنوان MIC در نظر 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 باکتری کشی) به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه شد (Umar et al., 2013).

#### نتایج

##### بررسی ریزساختار نانوالیاف (SEM)

تصاویر SEM حاصل از الکترونیسی محلول Chit/PEO ۹۰:۱۰ بیان‌گر آن است که نانوالیافی صاف و کشیده، پیوسته و بدون گره با میانگین قطر  $115 \pm 29$  نانومتر ایجاد شده است (شکل ۱A). افزودن ۱٪ عصاره حنا به محلول پلیمری Chit/PEO و الکترونیسی از آن تحت شرایط ذکر شده، نانوالیافی پیوسته، از نظر قطر الیاف یکنواخت، فاقد گره و مطلوب با میانگین قطر  $80 \pm 18$



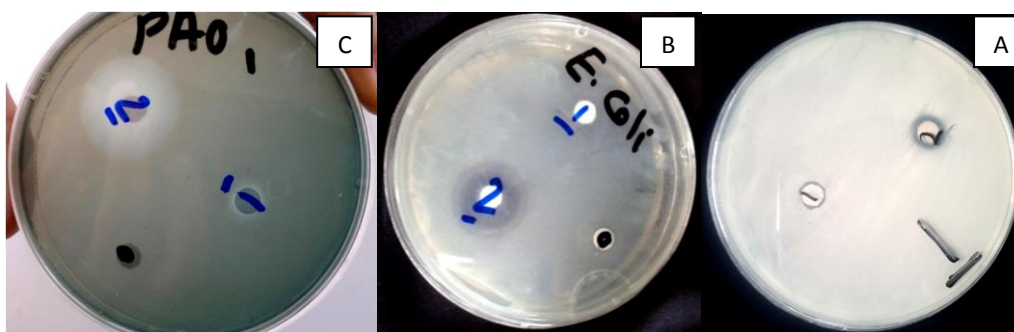
شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نانوالیاف پلیمری الکتروسی شده. A: Chit/PEO 90:10، B: Chit/PEO/Li 1%، C: Chit/PEO/Li 2%، D: Chit/PEO/Li 3%.

**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.

گرم مثبت	گرم منفی		نوع باکتری	
	استافیلوکوک اورئوس	اشریشیا کلی	سودوموناس آیروزینوزا	نام باکتری
۱۶	۱۷	۱۷	عصاره حنا (شاهد مثبت)	میانگین قطر هاله عدم رشد (mm)
۰	۰	۰	اسید استیک (شاهد منفی)	
۷	۶/۵	۷	محلول Chit/PEO	
۸	۱۸	۱۸	محلول Chit/PEO/Li 1%	



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

**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*.

خود نشان داده، اثر ضد میکروبی 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 ضد میکروبی 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 به همراه عصاره حنا از طریق الکتروریسی، اثر باکتری‌کشی آن را در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس* و فعالیت باکتریوستاتیک در برابر *اشریشیا کلی* در غلظت ۲/۷۹ درصد وزنی حنا که درصد بهینه عصاره حنا در محلول PEO و PVA بود مشاهده نمودند. افزودن عصاره برگ حنا با نسبت ۱٪ به محلول پلیمری Chit/PEO و الکتروریسی از آن نه تنها نانوالیافی یکنواخت و فاقد گره به قطر میانگین ۸۰ نانومتر ایجاد کرد، بلکه حضور لاوسون توانست اثر خوبی بر فعالیت ضد باکتری نانوالیاف کیتوزان به جای بگذارد. نتایج آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام محلول‌ها نشان داد که حضور درصد بسیار پایین از عصاره حنا می‌تواند اثر ضد میکروبی بسیار خوبی را در ترکیب Chit/PEO/Li ایجاد نماید. این اثر ضد میکروبی در مورد باکتری‌های گرم منفی *سودوموناس آیروزینوزا* و *اشریشیا کلی* به مراتب بیشتر از باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* است؛ که این می‌تواند به خاطر محکم‌تر بودن دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت باشد. در مورد باکتری‌های گرم منفی، سیستم Chit/PEO/Li اثر ضد باکتری بهتری را نسبت به هم عصاره حنا و هم ترکیب پلیمری کیتوزان داشته است که اثر هم‌افزایی ترکیب حنا با کیتوزان را در مقایسه با پلیمر و حنا تنها تأیید می‌کند. Chit/PEO اثر مشابهی را بر باکتری گرم مثبت و منفی داشت. اثر ضد باکتری عصاره حنا بر باکتری‌های گرم منفی با اختلاف کمی نسبت به باکتری گرم مثبت بیشتر بود.

بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی اثرات ضد باکتری نانوالیاف به روش آنتی‌بیوگرام، نانوالیاف پلیمری کیتوزان حاوی عصاره حنا یا فاقد آن، بر روی محیط کشت آگار اثر ضد باکتری از خود نشان نمی‌دهد. لذا محیط کشت جامد، محیط مناسبی برای

Chit/PEO/Li برای باکتری *سودوموناس آیروزینوزا* برابر با  $0.04 \text{ mg/ml}$  بود. MBC این نانوالیاف نیز همین مقدار به دست آمد ( $\text{MIC}=\text{MBC} = 0.04 \text{ mg/ml}$ ).

## بحث

طیف فعالیت میکروبی کیتوزان شامل قارچ‌های رشته‌ای، مخمرها و باکتری‌ها بوده، اغلب موجب مهار رشد باکتری‌ها می‌شود. فعالیت ضد میکروبی طبیعی کیتوزان کمک می‌کند تا رشد باکتری‌های فرصت طلب 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).

تهیه نانوالیاف به وسیله الکتروریسی کیتوزان تنها در حضور پلیمر دوم امکان پذیر است. Bhattarai و همکاران (2005) از PEO به عنوان 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، انحلال پذیری ضعیف کیتوزان و ویسکوزیته بالای محلول آبی آن است و PEO موجب کاهش ویسکوزیته محلول کیتوزان می‌شود و با برهم‌کنش با کیتوزان به وسیله 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 به خاطر کاهش ویسکوزیته و افزایش رسانایی می‌باشد. نانوالیاف Chit/PEO با نسبت ۹۰:۱۰ پیوستگی خوبی را در محیط آبی از

## 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.
- Avei, H., Monticello, R., and Kotek, R.** 2013. Preparation of antibacterial PVA and PEO nanofibers containing *Lawsonia Inermis* (henna) leaf extracts. – *J. Biomater. 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. – *Biomater.* 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. – *Carbohydr. 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. Nanoscience 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. Biomater. 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 Lett.* 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.
- بررسی ضد میکروبی نانوالیاف نبوده، جهت بررسی اثرات ضد میکروبی الیاف از روش رقیق‌سازی مایع استفاده شد. در این پژوهش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) نانوالیاف Chit/PEO/Li برای باکتری *سودوموناس آیروزینوزا* برابر بود با ۰/۰۴ mg/ml که این مقدار پایین‌تر از گزارش‌های دیگر ترکیبات ضد میکروبی چون نانوغشای متخلخل نقره/اورگانو آلکوکسی سیلان با MIC برابر با ۰/۳ mg/ml (Umar et al., 2013) و ترکیب پلیمر AgBr/MIC با معادل ۰/۶ mg/ml (Sambhy et al., 2006) بود. همچنین پایین‌ترین غلظت باکتری کشی (MBC) برای این نانوالیاف عددی برابر با MIC و معادل ۰/۰۴ mg/ml بود.

## نتیجه‌گیری

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

## سپاسگزاری

از همکاری مدیر گروه میکروبی‌شناسی و ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه بقیه‌الله و مسئولان آزمایشگاه قارچ-شناسی و میکروبی‌شناسی این دانشگاه برای فراهم نمودن امکانات و تسهیلات لازم قدردانی می‌شود.

- 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. – *Carbohydr. 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 Eliopoulos, 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 ضد میکروبی نانوالیاف پلیمری با افزودنی عصاره حنا. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳: ۲۱۷-۲۱۰.