DOI: http://dx.doi.org/ 10.22104/JIFT.2021.5297.2077

فصلنامه فناوری‌های جدید در صنعت غذا، دوره ۹، شماره ۳، صفحه ۲۰۷-۱۹۵، بهار ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

بررسی پایداری، فعالیت ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی میکروامولسیون و نانوامولسیون اسانس رزماری

دینا شهرام پور[1*]، سید محمدعلی رضوی[2]

۱. استادیار، گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد
۲. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۸/۱۹، تاریخ آخرین بازنگری: ۱۴۰۰/۱۰/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۰)

چکیده

در این مطالعه میکرو امولسیون و نانوامولسیون‌های اسانس رزماری تحت تیمارهای مختلف فراصوت (۱۰min و ۵، ۲/۵، ۰) تهیه شدند. پایداری میکرو و نانو امولسیون‌های اسانس رزماری در طی یک ماه نگهداری در دمای ۴°C به روش اندازه‌گیری اندازه ذرات توسط DLS تعیین شد. فعالیت ضدمیکروبی میکرو و نانو امولسیون‌های اسانس رزماری به دو روش انتشار از چاهک و میکرودایلوشن علیه چهار باکتری بیماری‌زا ارزیابی شد. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدان آن‌ها به روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مورد آزمون قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش زمان تیمار فراصوت از ۰ به ۱۰ min، اندازه ذرات امولسیون از ۱۴۸/۰۴ nm به ۹۸/۱۴ nm کاهش یافت. در طی زمان نگهداری افزایش اندازه ذرات میکرو و نانوامولسیون-ها مشاهده شد. همچنین نتایج آزمون‌های ضدمیکروبی نشان داد که میکرو و نانو امولسیون‌های اسانس رزماری بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را علیه باکتری‌های گرم مثبت به ویژه *S. aureus* داشتند. در آزمون ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان IC50 میکرو و نانو امولسیون‌های اسانس رزماری به ترتیب ۳۶/۴۳ µg/ml و ۴۵/۸۶ تخمین زده شد. بر اساس نتایج این مطالعه، نانوامولسیون اسانس رزماری به‌عنوان ترکیب ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدان طبیعی جهت به‌کارگیری در مواد غذایی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسانس رزماری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدمیکروبی، نانوامولسیون.

* نویسنده مسئول: d.shahrampour@rifst.ac.ir

۱. مقدمه

با وجود افزایش سطح بهداشت در اکثر کشورها در سال‌های اخیر، بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری‌های غذایی همچنان به‌عنوان یکی از تهدیدات سلامتی در جهان شناخته می‌شوند. این بیماری‌ها سالانه منجر به بستری شدن و یا مرگ و میر هزاران نفر می‌گردند و بدین منظور تحقیقات زیادی جهت کنترل یا پیشگیری آن‌ها صورت گرفته است. تاکنون داروهای آنتی‌بیوتیک مؤثرترین روش مقابله با این عوامل میکروبی معرفی شده‌اند، اما استفاده گسترده و نا به جا از این داروها منجر به گسترش ظهور گونه‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک از دهه ۱۹۵۰ تا به امروز شده است [۲،۱]؛ بنابراین شناسایی عوامل ضدمیکروبی جدید برای مقابله با این چالش ضروری می‌باشد. همچنین با توجه به آگاهی مصرف‌کنندگان از مضرات مصرف نگه‌دارنده‌های شیمیایی مصنوعی و تمایل آن‌ها به مصرف مواد غذایی ایمن دارای ترکیبات طبیعی، تلاش‌های بسیاری برای یافتن نگهدارنده‌های طبیعی با خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی در حال انجام است. اسانس‌های گیاهی ازجمله ترکیبات طبیعی هستند که می‌توانند به‌عنوان نگهدارنده ضدمیکروبی در مواد غذایی استفاده شوند. اسانس‌ها متابولیت ثانویه، هیدروفوب، آروماتیک و فرار گیاهی هستند که به دلیل خواص عملکردی خوب مانند خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی در مطالعات بسیاری مطرح شده‌اند [۳].

رزماری گیاهی دارویی از خانواده نعناعیان است که به‌صورت درختچه‌های کوچک بادوام با ارتفاع ۵۰ cm تا ۱ m و دارای برگ‌های معطر و گل‌های کوچک آبی رنگ است. اسانس این گیاه به‌طور گسترده در سراسر جهان در صنایع بهداشتی و آرایشی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسانس رزماری به دلیل دارا بودن ترکیبات فنلی متعدد ازجمله دی ترپن‌ها، تری ترن‌ها، اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها از خواص آنتی-اکسیدانی و ضدمیکروبی بالایی در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها برخوردار است [۷-۴].

با وجود قابلیت زیاد اسانس‌ها، استفاده مستقیم از آن‌ها در مواد غذایی و محلول‌های آبی به دلیل فراریت، حلالیت پایین و تغییر ویژگی‌های حسی با محدودیت‌هایی همراه است. از طرف دیگر اسانس‌ها در معرض دما، نور و اکسیژن مستعد اکسیداسیون هستند که اثربخشی آن‌ها را کاهش می‌دهد. بر طبق تحقیقات انجام شده، تغییر شکل اسانس‌ها به فرم امولسیون، می‌تواند پایداری فیزیکی، حلالیت و همچنین فعالیت بیولوژیک اسانس‌ها را افزایش دهد. به طور کلی امولسیون‌ها را می‌توان از نظر اندازه ذرات به دو گروه میکروامولسیون و نانوامولسیون‌ها تقسیم نمود. نانوامولسیون-ها که از ترکیب روغن، آب و امولسیفایر با روش‌های مختلف انرژی بالا (مانند فراصوت) یا انرژی پایین (مانند برگشت فاز) تهیه می‌شوند، دارای اندازه ذراتی در دامنه ۱۰۰-۱ nm هستند. نانوامولسیون‌ها از یک فاز روغنی که در فاز آبی پراکنده می‌گردد تشکیل می‌شوند که قطره روغن توسط لایه میانی نازکی از مولکول‌های سورفاکتانت یا آمفیلیک احاطه می‌شود که به پایداری نانوامولسیون کمک می‌نماید[۸]. نانوامولسیون‌ها یکی از موفق‌ترین سیستم‌هایی هستند که به‌عنوان حامل ترکیبات لیپوفیل مانند داروها، طعم‌دهنده‌ها، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۰،۹]. به طورکلی کوچک شدن اندازه قطرات فاز روغنی اسانس در ساختار نانوامولسیون و افزایش سطح آن موجب افزایش کارایی و پایداری آن‌ها می‌شود. برای مثال مطالعه ناصر زاده و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که فعالیت ضدکپکی نانوامولسیون اسانس دارچین در بازداری از رشد کپک‌های عامل فساد توت‌فرنگی در سطح محیط کشت بیشتر از امولسیون آن بود [۱۱]. قره نقده و همکاران (۱۳۹۶) نیز فعالیت ضد باکتریایی بیشتر نانوامولسیون اسانس گیاه مریم‌گلی را در مقایسه با فرم آزاد آن را علیه باکتری‌های بیماری‌زا و عامل فساد غذایی گزارش کردند [۱۲]. عنایتی فرد و همکاران (۲۰۲۱) فعالیت ضدمیکروبی نانوامولسیون اسانس پونه کوهی را علیه چند باکتری بیماری‌زا و کپک و مخمر عامل فساد مشاهده کردند [۱۳]. مهربان و همکاران (۱۴۰۰) فعالیت ضدمیکروبی بیشتر نانوامولسیون اسانس سالویا خراسینیکا تهیه شده به روش انرژی بالا در مقایسه با میکروامولسیون آن را علیه باکتری‌های بیماری‌زا و کپک‌های عامل فساد توت‌فرنگی گزارش نمودند [۱۴]. در مطالعه‌ای دیگر در زمینه نانوامولسیون‌ها اسانس آویشن به روش برگشت فاز تهیه و

فعالیت ضد باکتریایی آن علیه دو باکتری *S. typhimurium* و *L. monocytogenes* در سطح محیط کشت ارزیابی شد [۱۵]. نتایج مطالعه چو و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که کاهش اندازه ذرات امولسیون اسانس دارچین به فرم نانوامولسیون موجب پراکندگی بهتر اسانس در ساختار فیلم پولالان و بهبود ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم شد [۱۶]. فرشی و همکاران (۲۰۱۷) نیز در پژوهشی تأثیر افزایش غلظت کازئینات سدیم و صمغ گوآر را بر پایداری اندازه ذرات امولسیون اسانس زیره را گزارش نمودند [۱۷]. براساس نتایج مشاهده شده در مطالعات مختلف نوع اسانس و غلظت آن، میزان سورفاکتانت و روش آماده‌سازی نانوامولسیون بر اندازه ذرات و پایداری آن در طی نگهداری و همچنین خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدان آن مؤثر می‌باشد. با توجه به اینکه در مورد اثر زمان تیمار فراصوت در توان ثابت بر اندازه ذرات و پایداری نانوامولسیون‌های اسانس رزماری در طی زمان نگهداری سرد اطلاعاتی در دسترس نیست، بر این اساس هدف از تحقیق حاضر، تولید نانوامولسیون اسانس رزماری و میکروامولسیون آن و ارزیابی پایداری آن‌ها در طی یک ماه نگهداری در یخچال و مقایسه فعالیت ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد اولیه

در این پژوهش توئین ۸۰ از شرکت مرک و DPPH از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شدند. اسانس رزماری نیز از شرکت گل قطره توس (مشهد، ایران)، محیط کشت نوترینت براث و نوترینت آگار از شرکت مرک (آلمان)، باکتری‌های *S. interitidis, S.aureus, L. monocytogenes* و *E.coli* از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

۲.۲. شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری

جهت شناسایی ترکیبات اسانس رزماری از دستگاه گازکروماتوگرافی متصل به دستگاه طیف سنج جرمی (GC-MS) استفاده شد.

۳.۲. تولید میکروامولسیون و نانوامولسیون اسانس رزماری

میکروامولسیون اسانس رزماری با مخلوط کردن غلظت‌های مختلف اسانس و توئین ۸۰ با نسبت v/v ۰/۵ :۱ و سپس افزودن به‌صورت قطره قطره به ۲۰ml آب مقطر (v/v ۱۰٪) و هموژنیزاسیون با سرعت ۸۰۰۰rpm به مدت 5min تهیه شد. جهت تهیه نانوامولسیون اسانس رزماری نیز مخلوط میکروامولسیون به مدت min ۲/۵، ۵ و ۱۰ تحت تیمار فراصوت (فرکانس KHz ۲۰، توان ۲۰۰V و دامنه s ۳۰) قرار گرفت [۱۶].

۴.۲. تعیین اندازه ذرات امولسیون‌های اسانس رزماری

اندازه ذرات میکرو و نانو امولسیون‌های اسانس رزماری توسط دستگاه پراکنش دینامیکی نور DLS[1] تعیین شد [۱۹].

۵.۲. تعیین پایداری امولسیون‌های اسانس رزماری

جهت تعیین پایداری امولسیون‌های اسانس رزماری، نمونه‌ها به مدت یک ماه در یخچال نگهداری و اندازه ذرات آن‌ها توسط دستگاه DLS هر هفته اندازه‌گیری شد. جهت بررسی اثر دما بالا بر پایداری فیزیکی امولسیون‌ها نیز به ترتیب هریک از نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای C ° ۵۰ قرار گرفت. همچنین جهت ارزیابی پایداری امولسیون‌ها در برابر سانتریفوژ، هریک از نمونه‌ها تحت سانتریفوژ (g ۶۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) قرار گرفت و دو فاز شدن آن‌ها به‌صورت چشمی بررسی شد [۱۶].

۶.۲. تعیین فعالیت ضدمیکروبی امولسیون‌های رزماری علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذایی

۱.۶.۲. فعال‌سازی باکتری‌ها

جهت فعال‌سازی اولیه هریک از باکتری‌ها، ابتدا کشت لیوفیلیزه خریداری شده آن‌ها به ۳۰ml محیط کشت مایع استریل تلقیح شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت تا ظهور کدورت مناسب که نشان از رشد باکتری دارد در گرمخانه °C ۳۷ قرار گرفت. برای فعال‌سازی مرحله دوم میزان

1. Dynamic Light Scattering Technique

۱۰۰ µl از کشت یک شبه باکتری به ۱۰ml محیط کشت تازه استریل منتقل شد و سپس گرمخانه گذاری به مدت یک شب انجام گرفت.

۲.۶.۲. روش انتشار از چاهک

در این آزمون ابتدا هریک از باکتری‌ها با غلظت 10^6CFU/ml در سطح محیط کشت جامد نوترینت آگار تلقیح شدند و سپس چاهک‌هایی با قطر ۶ میلی‌متر در محیط کشت ایجاد شد. میزان ۱۰۰µl از میکروامولسیون و نانوامولسیون‌های اسانس رزماری در داخل هر چاهک ریخته شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه پلیت‌ها به اینکوباتور با دمای ۳۷ °C منتقل شدند و بعد از ۲۴ ساعت هاله بازداری اطراف هر چاهک توسط خط کش اندازه‌گیری و اندازه آن به میلی‌متر ثبت شد.

۳.۶.۲. روش میکرودایلوشن

در این روش غلظت‌های سریالی از میکروامولسیون و نانوامولسیون‌های اسانس رزماری (۱۰ v/v٪) در محیط کشت مایع استریل نوترینت براث موجود در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه تهیه شد. سپس ۲۰µl سوسپانسیون هریک از باکتری‌ها با غلظت معادل 10^5 CFU/ml تلقیح شد. حجم هر چاهک معادل ۲۰۰µl در نظر گرفته شد. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ ° C در گرمخانه قرار گرفت. در این آزمون از چاهک‌هایی که تنها حاوی محیط کشت مایع و باکتری بودند به‌عنوان کنترل مثبت و چاهک‌هایی که حاوی محیط کشت و امولسیون اسانس رزماری بودند به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از طی مدت زمان مذکور چاهک‌هایی که به‌صورت میکروسکوپی فاقد کدورت باکتریایی بودند به‌عنوان حداقل غلظت بازداری (MIC) در نظر گرفته شدند. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) امولسیون‌های اسانس رزماری نیز میزان ۱۰ µl از چاهک‌های فاقد کدورت در سطح محیط کشت جامد نوترینت آگار کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت رشد باکتری بررسی شد. کمترین غلظت از امولسیون‌های اسانس رزماری که از رشد باکتری جلوگیری کردند به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد [۱۳].

۷.۲. تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی امولسیون‌های رزماری

برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی میکروامولسیون و نانوامولسیون‌های اسانس رزماری (۱۰ v/v٪) از روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH استفاده شد. بدین منظور ابتدا رقت سریالی از امولسیون‌ها در اتانول تهیه و سپس ۲۰۰µl از آن به ۲/۸ ml محلول DPPH (۰/۱ میلی مولار) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط در داخل کمد تاریک قرار گرفت. بعد از طی زمان مذکور جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ nm تعیین شد. در این آزمون از آب مقطر به‌عنوان کنترل استفاده شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH از طریق فرمول زیر محاسبه گردید و نمودار استاندارد برای تعیین IC50 میکروامولسیون و نانوامولسیون اسانس رزماری رسم شد. (IC50 یعنی غلظتی از اسانس که قادر به مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH می‌باشد.)

$$SC(\%) = A_{control} - A_{sample} / A_{control} \quad (۱)$$

SC(%): درصد مهار رادیکال DPPH، $A_{control}$: جذب کنترل، A_{sample}: جذب نمونه.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری

نتایج آنالیز ترکیبات اسانس رزماری توسط روش GC-MS در جدول (۱) نشان می‌دهد که در مجموع ۲۳ ترکیب مختلف در آن وجود دارد و ترکیبات عمده به ترتیب به آلفا پینن (۲۰/۴۹٪)، ۱، ۸- سینول (۱۸/۹۳٪)، آلکانفور (۱۵/۱۶٪)، لووربنون (۱۰/۶۷٪) اختصاص داشت. این ترکیبات جز مونوترپن‌ها هستند که خواص ضد باکتریایی، ضدکپکی و خواص درمانی و ضد التهابی آنها در مطالعات پیشین گزارش شده است [۲۰،۲۱]. تفاوت مشاهده شده در ترکیبات اسانس رزماری در مطالعه حاضر با سایر مطالعات احتمالاً به دلیل متفاوت بودن مرحله رشد گیاه، منطقه رشد گیاه، شرایط زراعی و محیطی می‌باشد. یدس و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای ۱، ۸- سینول و آلکانفور را به‌عنوان عمده ترکیبات شیمیایی موجود در واریته‌های مختلف گیاه رزماری جمع‌آوری شده از مناطق مختلف تونس معرفی

کردند [۲۲]. همچنین زائولی و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی دو گونه گیاه رزماری را مربوط به حضور مونوترپن‌هایی مانندآلفاپینن، ۱، ۸- سینول و آلکانفور دانستند [۲۳].

جدول (۱) ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری شناسایی شده با دستگاه GC/MS.

Table 1. Identified chemical components of rosemary essential oil by GC/MS.

کد **code**	نام ترکیب Component name	**RT**	**%Area SUM**
1	Cyclofenchene	3.868	0.48
2	**1R-α-pinene**	**4.044**	**20.49**
3	Camphene	4.35	8.75
4	3-Octanone	4.995	0.95
5	o-Cymene	5.836	1.58
6	β-Terpinyl acetate	5.932	1.22
7	**1,8-cineole**	**5.999**	**18.93**
8	cis-Linalool oxide	6.889	0.61
9	trans-Linalool oxide (furanoid)	7.276	0.76
10	Linalool	7.608	1.1
11	Cis-Verbenol	7.846	0.5
12	α- Campholenal	8.274	0.48
13	L-Pinocarveol	8.647	0.53
14	**Alcanfor**	**8.79**	**15.16**
15	trans-3-Pinanone	9.136	1.5
16	endo-Borneol	9.441	7.29
17	3-Pinanone, cis	9.536	0.45
18	α-Terpineol	10.073	1.51
19	**Levoverbenone**	**10.351**	**10.67**
20	Borneol formate	10.901	1.72
21	Grandlure II	11.41	0.53
22	Bornyl acetate	12.354	2.26
23	Caryophyllene oxide	19.76	0.69
24	----	11.227	0.46
25	----	11.546	0.53
26	----	24.77	0.85
	کل	--	100

۲.۳. اندازه ذرات امولسیون‌های اسانس رزماری

نتایج نشان داد که میانگین اندازه ذرات امولسیون اسانس رزماری بدون اعمال تیمار فراصوت ۳/۴۲ nm ±۱۴۸/۰۴ بود که این نمونه به‌عنوان تیمار میکروامولسیون در آزمون بعدی مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از تیمار فراصوت به طور معناداری باعث کوچک‌تر شدن اندازه ذرات امولسیون و تشکیل نانوامولسیون شد. علاوه بر این زمان فراصوت نیز تأثیر معناداری بر اندازه ذرات امولسیون داشت. با افزایش زمان تیمار فراصوت از ۲/۵ به ۱۰ دقیقه میانگین اندازه ذرات از ۵/۹۲ nm ±۱۳۲/۰۴ به ۴/۷۹ ±۹۸/۱۴ کاهش یافت. استفاده از ۱۰ دقیقه تیمار فراصوت اندازه ذرات امولسیون رزماری را به میزان ۳۳٪ کاهش داد. به طور مشابه هاشمی و همکاران (۲۰۱۷) گزارش نمودند که ۱۰ دقیقه تیمار فراصوت موجب کاهش اندازه ذرات امولسیون اسانس آویشن از ۲۱۰/۵ nm تا ۹۰/۹ شد [۲۴]. در مطالعه روبله و همکاران (۲۰۱۸) نانوامولسیون تیمول به دو روش انرژی پایین (تشکیل خود به خودی) و انرژی بالا (فراصوت) تولید شد نتایج نشان داد که استفاده از ۱۵ min فراصوت موجب ۹٪ کاهش اندازه ذرات نانوامولسیون شد [۱۹]. چو و همکاران (۲۰۲۰) نیز افزایش زمان تیمار التراسوند از ۲/۵ به ۱۰ دقیقه را نتیجه کاهش اندازه ذرات امولسیون دارای ۶٪ اسانس دارچین از ۲۳۱nm به ۶۰nm دانستند [۱۶]. اندازه

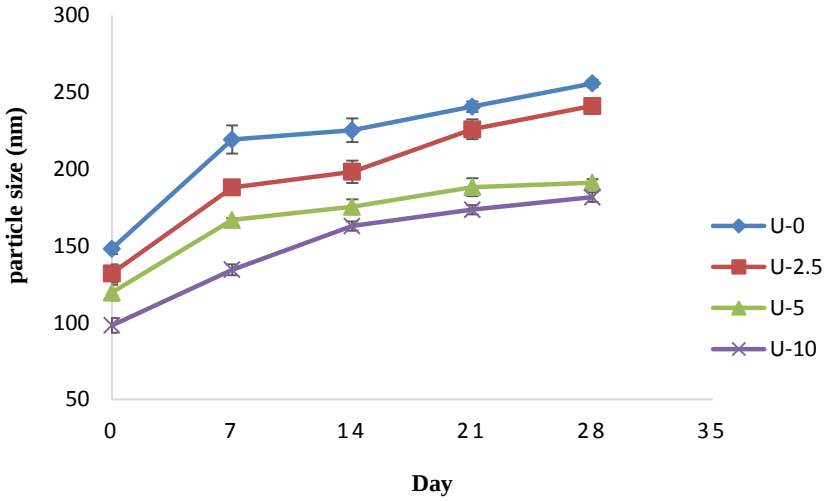
ذرات نانوامولسیون اسانس دارچین در مطالعه‌ای دیگر با غلظت مشابه در این پژوهش (v/v ۱۰٪) حدود nm ۱۱۵ گزارش شد که بیشتر از نتایج به دست آمده در مورد اسانس رزماری بود [۱۱]. در مطالعه اندازه ذرات نانوامولسیون ۵٪ اسانس آویشن شیرازی تهیه شده به روش برگشت فاز در مطالعه شهابی و همکاران (۱۳۹۵) حدود ۶۶/۵nm گزارش شد [۱۵]. خوشبوی لاهیجانی و همکاران (۱۳۹۸) جهت تهیه نانوامولسیون اسانس کورکومین از غلظت‌های مختلف اسانس (۱، ۳/۵ و ۵٪) در حضور ۵ گرم توئین ۸۰ و اسپین ۸۰ و روش برگشت فاز استفاده نمودند. نتایج نشان داد همگی تیمارها اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰nm دارند [۲۵]. تفاوت مشاهده شده در مطالعات مختلف در رابطه با اندازه ذرات نانوامولسیون‌ها به دلیل تفاوت در روش تهیه، نوع اسانس، غلظت اسانس و سورفاکتانت می‌باشد.

۳.۳. پایداری میکرو و نانوامولسیون‌های اسانس رزماری

برای سنجش پایداری نانو حامل‌ها از چند روش می‌توان استفاده کرد. ازجمله این روش‌ها اندازه‌گیری اندازه ذرات بعد از گذشت زمان، اندازه‌گیری پتانسیل زتا، اندازه‌گیری میزان رهایش نانو حامل در طول زمان و ارزیابی ظاهر نانو حامل از نظر دو فاز شدن یا تخریب ساختار به هر نحو با گذشت زمان را می‌توان نام برد. در بین موارد نامبرده شده، روش اندازه‌گیری اندازه ذرات رایج‌تر است [۱۲]. به‌منظور سنجش پایداری فیزیکی، اندازه ذرات میکروامولسیون و نانوامولسیون اسانس رزماری در طی چهار هفته نگهداری در یخچال توسط دستگاه DLS، اندازه‌گیری شد. بر طبق شکل (۱)، میانگین اندازه ذرات میکروامولسیون و نانوامولسیون تولیدی به ترتیب در روز اول برابر با nm ۴۲ /۳ ±۱۴۸/۰۴ و nm ۴/۷۹ ±۹۸/۱۴ بود. نتایج نشان داد که زمان نگهداری در پایداری امولسیون و نانوامولسیون تأثیرگذار است و با افزایش زمان نگهداری اندازه ذرات افزایش می‌یابد، به‌طوری که پس از چهار هفته میانگین اندازه ذرات میکروامولسیون و نانوامولسیون به ترتیب به nm ۲/۴۶±۲۵۰/۶۳ و ۳/۱۱nm± ۱۸۱/۶۱ افزایش یافت. نتایج ارزیابی پایداری امولسیون‌های اسانس رزماری پس از قرارگیری در برابر دما بالا به مدت ۴۸ ساعت نشان داد که میکروامولسیون و نانوامولسیون تهیه شده تحت تیمار min ۲/۵ فراصوت که دارای اندازه ذرات بزرگ‌تری بودند، دچار شکست شده و حالت خامه‌ای در سطح به‌صورت دو فاز تشکیل شده به‌صورت چشمی قابل مشاهده بود (شکل ۲). علاوه بر این سانتریفوژ بر ناپایداری سیستم‌های امولسیونی تهیه شده تأثیری نداشت. به طور مشابه در مطالعه‌ای دیگر قره نقده و همکارانش (۱۳۹۶) از روش فراصوت و غلظت‌های مختلف سورفاکتانت‌های توئین ۸۰ و اسپن ۸۰ جهت تهیه نانوامولسیون‌های اسانس مریم گلی استفاده کردند. نتایج بررسی پایداری نانوامولسیون نشان داد که اندازه ذرات در طول یک ماه نگهداری در دمای محیط از nm ۸۰ به ۱۶۰ در تمام تیمارها افزایش یافت[۱۲]. نتایج مطالعه روبله و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد که نانوامولسیون‌های حاوی ۱۰٪ تیمول پس از سانتریفوژ به مدت min ۳۰ در ۱۰۰۰۰g پایدار بوده و پدیده خامه‌ای شدن یا دوفاز شدن مشاهده نشد [۱۹]. هاشمی و همکاران (۲۰۱۷) نیز گزارش کردند که پس از ۷ روز نگهداری نانوامولسیون حاوی ۳٪ اسانس آویشن شیرازی در دمای محیط اندازه ذرات از nm ۸۴/۴ به ۱۰۳/۱۵ افزایش یافت، همچنین نانوامولسیون تولیدی در برابر ۳۰ دقیقه سانتریفوژ (۴۵۰۰rpm) پایدار بود [۲۴]. نانوامولسیون‌ها همانند امولسیون‌های متداول، سیستم‌های نسبتاً پایداری هستند و در اثر فرایندهای فیزیکوشیمیایی مختلف مانند تفکیک گرانشی[1]، انبوهش[2]، ادغام[3] و رسیدگی استوالد[4] دچار ناپایداری می‌شوند. برخلاف سایر سیستم‌های امولسیونی، نانوامولسیون‌ها در برابر پدیده‌های ادغام و تفکیک گرانشی قطرات پایدارتر بوده، ولی به دلیل کوچکی اندازه ذرات مستعد شکست در اثر رسیدگی استوالد و انبوهش هستند. استفاده از سورفاکتانت‌هایی مانند توئین ۸۰ با کاهش سرعت انتشار مولکول‌های فاز پراکنده، رسیدگی استوالد را کاهش می‌دهند. نانوامولسیون‌ها به دلیل کوچک بودن اندازه ذرات کشش سطحی بیشتری نسبت به میکروامولسیون‌ها داشته و از طرفی تمایل کمتری به جدایی فاز دارند و از لحاظ

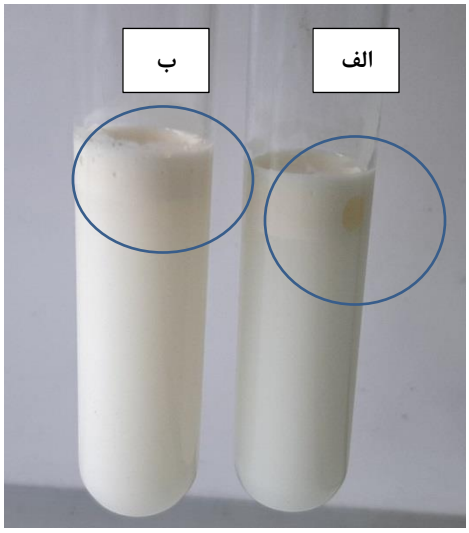
1. Gravitational Separation
2. Coalescence
3. Flocculation
4. Ostwald Ripening

سینتیکی پایدارترند. اصولاً نانوامولسیون‌ها، به واسطه اندازه ویژه، ظاهری شفاف یا نیمه شفاف دارند و به واسطه توزیع اندازه قطرات از گرانروی کم، پایداری بالا در برابر پدیده‌هایی ترسیب، خامه‌ای شدن، به هم پیوستن و لخته شدن برخوردارند و به همین دلایل امروزه برای کاربردهای صنعتی فراوانی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲۶].



شکل (۱) پایداری اندازه ذرات میکرو امولسیون و نانوامولسیون اسانس رزماری در طی یک ماه نگهداری در یخچال.
(U-0: امولسیون حاوی ۱۰٪ اسانس رزماری، U-2.5: امولسیون حاوی ۱۰٪ اسانس رزماری تحت تیمار فراصوت به مدت ۲/۵ دقیقه، U-5: امولسیون حاوی ۱۰٪ اسانس رزماری تحت تیمار فراصوت به مدت ۵ دقیقه، U-10: امولسیون حاوی ۱۰٪ اسانس رزماری تحت تیمار فراصوت به مدت ۱۰ دقیقه)

Fig 1. Particles size stability of microemulsion and nanoemulsion of rosemary essential oil during one month storage in refrigerator. (U-0: emulsion containing 10% rosemary essential oil, U-2.5: emulsion containing 10% rosemary essential oil under ultrasound treatment for 2.5 min, U-5: emulsion containing 10% rosemary essential oil under ultrasound treatment for 5 min, U- 10: emulsion containing 10% rosemary essential oil under ultrasound treatment for 10 min)



شکل (۲) پایداری امولسیون‌های اسانس رزماری پس از تیمار حرارتی. الف) میکروامولسیون حاوی ۱۰٪ اسانس رزماری ب) نانوامولسیون حاوی ۱۰٪ اسانس رزماری تحت تیمار ۲/۵ دقیقه فراصوت.

Fig 2. Stability of rosemary essential oil emulsions after heat treatment. A) Microemulsion containing 10% rosemary essential oil b) Nanoemulsion containing 10% rosemary essential oil under ultrasound treatment for 2.5 min.

۴.۳. فعالیت ضدباکتریایی میکرو و نانوامولسیون‌های اسانس رزماری

نتایج ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی امولسیون‌های مختلف تهیه شده اسانس رزماری علیه باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی در آزمون چاهک در جدول (۲) نمایش داده شده است. بر این اساس بیشترین قطر هاله بازداری علیه باکتری گرم مثبت *S. aureus*، ۳۶ mm بود که به نانوامولسیون اسانس رزماری تحت تیمار ۱۰ min فراصوت اختصاص داشت. به طور کلی نتایج نشان داد که باکتری‌های گرم منفی در برابر امولسیون‌های اسانس رزماری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت از مقاومت بیشتری برخوردار بودند. دلیل این امر حضور لایه غشای خارجی از جنس لیپوپلی ساکارید در باکتری‌های گرم منفی است که از غشا محافظت کرده و دسترسی ترکیبات ضدمیکروبی به آن را دشوار می‌کند. همچنین با افزایش زمان تیمار فراصوت و کوچک‌تر شدن اندازه قطرات اسانس در نانوامولسیون امکان انتشار آن‌ها در محیط کشت و فعالیت ضدمیکروبی بیشتر شد. نتایج ارزیابی حداقل غلظت بازداری و حداقل غلظت کشندگی میکرو و نانوامولسیون اسانس رزماری در جدول (۳) مشاهده می‌شود. بر این اساس بیشترین MIC و MBC (۳/۶ mg/ml) میکرو و نانوامولسیون اسانس رزماری علیه باکتری‌های گرم منفی *S. interitidis* و *E.coli* مشاهده شد. به‌علاوه باکتری *S. aureus* حساس‌ترین باکتری تعیین شد و MIC و MBC میکرو و نانوامولسیون اسانس رزماری علیه آن به ترتیب ۰/۹ mg/ml و ۱/۸ بود. در واقع فعالیت ضد میکروبی با ترکیب شیمیایی موجود در اسانس در ارتباط است که می‌توانند با هم اثر هم‌افزایی ایجاد کنند. در این مطالعه فعالیت ضدمیکروبی اسانس رزماری را می‌توان به حضور عمده ترکیبات شیمیایی مونوترپنوئیدی مانند آلفا پینن (۲۰/۴۹٪)، ۱،۸- سینول (۱۸/۹۳٪) و آلکانفور (۱۵/۱۶٪) نسبت داد. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها را محتوای آن‌ها با ماهیت لیپوفیلی تعیین می‌کند که باعث اختلال و ایجاد منافذ در غشای سیتوپلاسمی میکروبی می‌شود[۱۹]. در مطالعه شهابی و همکاران (۱۳۹۵) نانوامولسیون ۵٪ اسانس آویشن شیرازی به روش برگشت فاز تهیه شد و فعالیت ضد باکتریایی آن علیه دو باکتری بیماری‌زای *L. monocytogenes* و *S. typhimurium* در آزمون میکرودایلوشن مورد ارزیابی گرفت و حداقل غلظت کشندگی برای آن‌ها به ترتیب ۲/۵mg/ml و ۵ محاسبه شد [۱۵]. یدس و همکاران (۲۰۱۹) فعالیت ضدمیکروبی اسانس چهار گونه مختلف گیاه رزماری را علیه باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی شامل *P. aeruginosa*، *E.coli* و *E. faecalis* در آزمون انتشار از دیسک را به دلیل تفاوت در ترکیبات شیمیایی متفاوت ارزیابی کردند [۲۲]. نتایج ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی اسانس دو گونه گیاه رزماری در مطالعه زائولی و همکاران (۲۰۱۰) علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در آزمون انتشار از دیسک نشان داد که *E. coli* و *P. aeruginosa* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری‌ها علیه ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری بودند و قطر هاله بازداری مشاهده شده در پلیت آن‌ها به ترتیب ۱۸ mm و ۷ بود [۲۳]. در مطالعه‌ای دیگر که توسط حسن‌زاده آذر (۲۰۱۹) انجام شد، فعالیت ضد باکتریایی نانوامولسیون حاوی ۸٪ اسانس رزماری علیه گونه مختلف باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد. نتایج آزمون انتشار از دیسک نشان داد اختلاف معناداری بین فعالیت ضد باکتریایی نانوامولسیون وجود نداشت. همچنین بزرگ‌ترین قطر هاله بازداری علیه *S. enteritidis* و *L. monocytogenes* به ترتیب ۱۳/۵ mm و ۱۲/۱۳ به دست آمد که کمتر از مطالعه حاضر بود [۲۷]. عنایتی فرد و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه‌ای اثر ضدمیکروبی امولسیون و نانوامولسیون اسانس پونه کوهی را علیه باکتری‌های بیماری‌زا و کپک و مخمر عامل فساد به روش انتشار از چاهک و میکرودایلوشن بررسی کردند. نتایج نشان داد که تنها در پلیت حاوی باکتری گرم مثبت *S.aureus* هاله بازداری به قطر ۲۲/۳ mm و ۱۶/۸ به ترتیب توسط نانوامولسیون و امولسیون حاوی ۱۰mg/ml اسانس پونه کوهی مشاهده شد [۱۳]. امولسیون و نانوامولسیون اسانس پونه کوهی هیچ‌گونه فعالیت بازداری علیه باکتری گرم منفی *P. aeruginosa* نداشتند. مطابق نتایج مطالعه حاضر فعالیت ضدمیکروبی نانوامولسیون اسانس پونه کوهی بیشتر از امولسیون آن بود. همچنین بین امولسیون و نانوامولسیون اسانس پونه کوهی از نظر حداقل غلظت بازداری و کشندگی تفاوتی وجود نداشت و MIC و

MBC تعیین شده علیه دو باکتری *S.aureus* و *E. coli* به ترتیب mg/ml ۰/۳۱۲ و ۵ بود. به طور مشابه نتایج مطالعه مهربان و همکاران (۱۴۰۰) نشان داد که فعالیت بازداری میکرو و نانوامولسیون اسانس *سالویا خراسینیکا* علیه باکتری-های گرم مثبت بیشتر است و کمترین MIC (۱۲۵ µl/ml) علیه باکتری *B. cereus* مشاهده شد[۱۴]. تفاوت مشاهده شده در مورد اثرضدمیکروبی میکروامولسیون و نانوامولسیون اسانس‌ها در آزمون‌های یکسان در مطالعات مختلف احتمالاً به تفاوت روش تهیه امولسیون، غلظت اسانس موجود در امولسیون‌ها و تفاوت ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس‌ها مربوط می‌شود.

جدول (۲) فعالیت ضدمیکروبی میکروامولسیون و نانو امولسیون‌های اسانس رزماری علیه باکتری‌های بیماری‌زا در آزمون انتشار از چاهک.

Table 2. Antimicrobial activity of microemulsion and nanoemulsions of rosemary essential oil against pathogenic bacteria in well diffusion test.

نوع امولسیون اسانس رزماری **Rosemary essential oil emulsion type**	زمان تیمار فراصوت (دقیقه) **Ultrasound treatment time (min)**	گرم مثبت **Gram positive**		گرم منفی **Gram negative**	
		L. monocytogenes	*S.aureus*	*E. coli*	*S. interitidis*
نانوامولسیون **nanoemulsion**	**2.5**	26	34	23	22
	5	28	35	25	23
	10	31	36	26	26
میکروامولسیون **microemulsion**	**0**	25	32	23	23

جدول (۳) حداقل غلظت بازداری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) میکروامولسیون و نانوامولسیون اسانس رزماری علیه باکتری‌های بیماری‌زا.

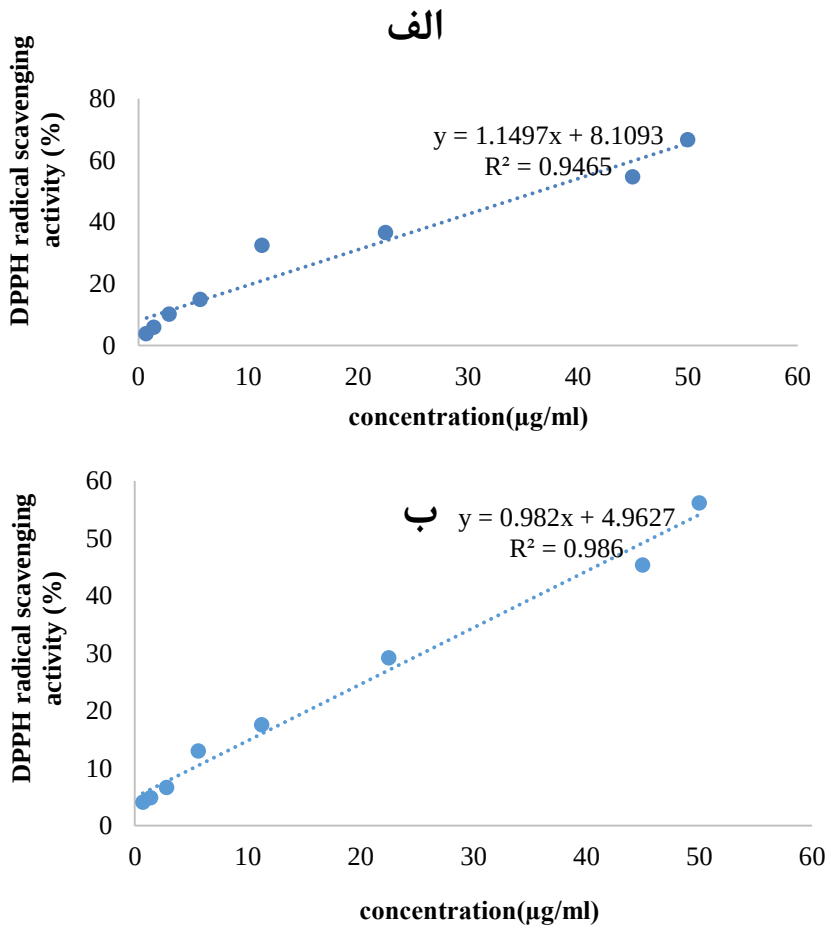
Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of microemulsion and nanoemulsions of rosemary essential oil against pathogenic bacteria.

نوع امولسیون اسانس رزماری **Rosemary essential oil emulsion type**	گرم مثبت **Gram positive**				گرم منفی **Gram negative**			
	L. monocytogenes		*S.aureus*		*E. coli*		*S. interitidis*	
	MIC(mg/ml)	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
نانوامولسیون **nanoemulsion**	1.8	3.6	0.9	1.8	3.6	3.6	3.6	3.6
میکروامولسیون **microemulsion**	1.8	3.6	1.8	1.8	3.6	3.6	3.6	3.6

۵.۳. فعالیت آنتی اکسیدانی میکرو و نانوامولسیون‌های اسانس رزماری

بر طبق شکل (۳)، با افزایش غلظت میکرو و نانوامولسیون-های اسانس رزماری، فعالیت مهارکنندگی در برابر رادیکال‌های آزاد DPPH افزایش یافت. میزان IC50 میکرو و نانوامولسیون‌های اسانس رزماری براساس نتایج حاصل از رسم نمودارهای استاندارد به ترتیب µg/ml ۳۶/۴۳ و ۴۵/۸۶ تخمین زده شد. منظور از IC50 در واقع غلظتی از میکرو یا نانوامولسیون اسانس رزماری است که قادر به مهار ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد DPPH می‌باشد، بنابراین هرچه کمتر باشد،

فعالیت آنتی‌اکسیدان بیشتر خواهد بود. فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس رزماری را می‌توان به حضور مونوترپن‌ها در ترکیب شیمیایی آن نسبت داد. در پژوهش‌های پیشین نیز به قابلیت آنتی اکسیدانی مونوترپن‌ها اشاره شده است [۲۹،۲۸]. در مطالعه‌ای دیگر، میزان IC50 اسانس گونه‌ای از اسانس رزماری بومی یوگوسلاوی ۷۷/۶ µg/ml تخمین زده شد که بیشتر از مطالعه حاضر بود [۳۰]. همچنین نتایج مطالعه زائولی و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس دو گونه رزماری جمع‌آوری شده از مناطق مختلف تونس متفاوت بود و میزان IC50 آن‌ها ۲۸/۵ µg/ml و ۶ تعیین شدند [۲۳]. میزان IC50 اسانس گیاه ریحان بومی هند و نانوامولسیون آن به ترتیب ۱۳/۲۱µg/ml و ۱۰/۴۷ گزارش شد [۳۱]. علیزاده و همکاران (۲۰۱۷) میزان IC50 اسانس شوید را ۱۱/۴۴ µg/ml تخمین زدند [۳۲]. ایرانی و همکاران (۱۴۰۰) نیز میزانIC50 نانوامولسیون حاوی ۵٪ اسانس درمنه کوهی را ۸۰ µg/ml گزارش کردند که نشان از کمتر بودن فعالیت آنتی اکسیدانی آن نسبت به نانوامولسیون مطالعه حاضر دارد [۳۳]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای اسانس‌ها به حضور ترکیبات فنولی در آنها مربوط است و اختلاف میان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاهان مختلف در مطالعات متعدد انجام شده به تفاوت محتوای فنولی آن‌ها ارتباط دارد. در واقع ترکیبات فنولی به‌عنوان یک دهنده هیدروژن نقش آنتی‌اکسیدانی خود را به خوبی ایفا می‌کنند [۳۴].



شکل (۳) فعالیت آنتی اکسیدانی (الف) میکروامولسیون و (ب) نانوامولسیون اسانس رزماری در روش مهار رادیکال آزاد DPPH.

Fig 3. antioxidant activity of microemulsion and nanoemulsions of rosemary essential oil in DPPH radical scavenging method.

۴. نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که مدت زمان تیمار فراصوت بر میانگین اندازه ذرات امولسیون‌های اسانس رزماری مؤثر است. نانوامولسیون تهیه شده تحت تیمار min ۱۰ فراصوت کوچک‌ترین اندازه ذرات را در ابتدا تولید و در طی یک ماه نگهداری در دمای یخچال را داشت. علاوه بر این نانوامولسیون اسانس رزماری تهیه شده در مقایسه با فرم میکروامولسیون آن از پایداری خوبی در برابر دما پایین و بالا و نیروی گریز از مرکز سانتریفوژ برخوردار بود. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی نانوامولسیون‌های اسانس رزماری در مقایسه با میکروامولسیون آن قابل توجه بود؛ بنابراین این نانوامولسیون‌ها می‌تواند به‌عنوان نگهدارنده طبیعی و جایگزین نگهدارنده شیمیایی در مواد غذایی پیشنهاد شوند که تحقیقات بیشتر در این زمینه را در آینده می‌طلبد.

منابع

[1] Caliendo, A. M., Gilbert, D. N., Ginocchio, C. C., Hanson, K. E., May, L., Quinn, T. C., ... & Infectious Diseases Society of America (IDSA). (2013). Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. *Arch Clin Infect Dis*., *57*(suppl_3), S139-S170.

[2] Nigam, A., Gupta, D., & Sharma, A. (2014). Treatment of infectious disease: beyond antibiotics. *Microbiol res*, *169*(9-10), 643-651.

[3] Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities–Potentials and challenges. *Food Cont*, *47*, 381-391.

[4] Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2012). A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *J. Food Eng.*, *111*(2), 343-350.

[5] Malakootian M, Hatami B. Survey of Chemical Composition and Antibacterial Activity of Rosmarinus Officinalis Essential oils on Escherichia Coli and Its Kinetic. (2013). *TB.; 12* (1) :1-13. [in Persian]

[6] Khadem, M., Almasi, H., Meshkini, S. (2017). Effect of bacterial cellulose based active film containing Rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oil and ZnO nanoparticles on chemical, microbial and nutritional properties of ready to eat pomegranate arils during cold storage. *J Food Res*, *27*(4), 103-119. [in Persian]

[7] Soncu, E. D., Arslan, B., Ertürk, D., Küçükkaya, S., Özdemir, N., & Soyer, A. (2018). Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Turkish fermented sausages (sucuk) coated with chitosan-essential oils. *LWT*, *97*, 198-204.

[8] Borrin, T. R., GEOrges, E. L., Moraes, I. C. F., & Pinho, S. C. (2016). Curcumin loaded nanoemulsions produced by the emulsion inversion point (EIP) method: An evaluation of process parameters and physicochemical stability. *J Food Eng.*, *169*, 1–9.

[9] Rao, J., & McClements, D. J. (2011). Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. *Food Hydro*, *25*, 1413–1423.

[10] Weiss, J., Decker, E., McClements, D., Kristbergsson, K., Helgason, T., & Awad, T. (2008). Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophys*, *3*(2), 146–154.

[11] Naserzadeh, Y., Mahmoudi, N., Pakina, E. 2019. Antipathogenic effects of emulsion and nanoemulsion of cinnamon essential oil against Rhizopus rot and grey mold on strawberry fruits. *Foods Raw Mater.*, *7* (1), 210-216.

[12] Gharenaghadeh, s., samadlouie, h., sowti, m., & gharenaghadeh, s. (2017). nano emulsion formulation from essential oil of salvia hypoleuca and investigation of its anti microbial and physicochemical properties. *JFST.; 70*(14), 337-348. [in Persian]

[13] Enayatifard, R., Akbari, J., Babaei, A., Rostamkalaei, S. S., Hashemi, S. M. H., & Habibi, E. (2021). Anti-Microbial Potential of Nano-Emulsion form of Essential Oil Obtained from Aerial Parts of Origanum Vulgare L. as Food Additive. *Adv Pharm Bull*, *11*(2), 327.

[14] Mehraban, A., Vazifedoost, M., didar, Z., Haddadkhodaparast, M., Mehraban Sang Atash, M. (2021). In-Vitro evaluation of antimicrobial activity of microemulsion and nanoemulsion of Salvia chorassanica essential oil against pathogenic and food spoilage microorganisms. *J Food Micro*.[in press]. [in Persian]

[15] Shahabi, N., Tajik, H., moradi, M., Forough, M. (2016). Antibacterial properties of Zataria multiflora Boiss. essential oil nanoemulsion formed by emulsion phase inversion. *J Food Microbiol*, 3(3), 45-56. [in Persian]

[16] Chu, Y., Cheng, W., Feng, X., Gao, C., Wu, D., Meng, L., ... & Tang, X. (2020). Fabrication, structure and properties of pullulan-based active films incorpo-

rated with ultrasound-assisted cinnamon essential oil nanoemulsions. *Food Packag Shelf Life*, 25, 100547.

[17] Farshi, P., Tabibiazar, M., Ghorbani, M., & Hamishehkar, H. (2017). Evaluation of antioxidant activity and cytotoxicity of cumin seed oil nanoemulsion stabilized by sodium caseinate-guar gum. *Pharm Sci, 24(4)*, 293-300.

[18] Fattahi, R., Ghanbarzadeh, B., Dehghannya, J., Hosseini, M., & Falcone, P. M. (2020). The effect of Macro and Nano-emulsions of cinnamon essential oil on the properties of edible active films. *Food Sci Nutr, 8*(12), 6568-6579.

[19] Robledo, N., Vera, P., López, L., Yazdani-Pedram, M., Tapia, C., & Abugoch, L. (2018). Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. *Food Chem, 246*, 211-219.

[20] Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food Bioproc Tech*., 4(6), 849-875.

[21] Aali E, Mahmoudi R, Kazeminia M, Hazrati R, Azarpey F. (2017). Essential oils as natural medicinal substances: review article. *Tehran Univ Med J.; 75* (7) :480-489. [in Persian]

[22] Yeddes, W., Nowacka, M., Rybak, K., Younes, I., Hammami, M., Saidani-Tounsi, M., & Witrowa-Rajchert, D. (2019). Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Rosemary Essential Oils as Gelatin Edible Film Component. *Food Sci Tech Res, 25*(2), 321-329.

[23] Zaouali, Y., Bouzaine, T., & Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two Rosmarinus officinalis L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food chem toxicol, 48*(11), 3144-3152.

[24] Hashemi Gahruie, H., Ziaee, E., Eskandari, M. H., & Hosseini, S. M. H. (2017). Characterization of basil seed gum-based edible films incorporated with Zataria multiflora Eo nanoemulsion. *Carbo Poly, 166*, 93–103.

[25] KhoshbouyLahidjani, L., Ahari, H., & Sharifun, A. (2019). Production of Curcuma longa essential oil nanoemulsion by Emulsion phase inversion method and evaluation of its physicochemical properties in refrigerator condition. J Comparative Pathobiol, 16(3), 2859-2876. [in Persian]

[26] McClements, D. J., & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Crit Rev Food Sci Nutr, 51*(4), 285-330.

[27] Hassanzad Azar, H., Ghafari, A., Yousefizadeh, S., Fathollahi, M., & Aminzare, M. (2019). Antimicrobial Effects of the Nanoemulsion of Rosemary Essential Oil against Important Foodborne Pathogens. *JHEHP., 5*(2), 79-85.

[28] Aghraz, A., Wanner, J., Schmidt, E., Aitdra, L., Aitsidibrahim, M., Tabanca, N., ... & Larhsini, M. (2016). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and insecticidal activities of essential oil from a Moroccan endemic plant: Bubonium imbricatum. *Nat Prod Commun., 11*(11), 1934578X1601101123.

[29] Babahmad, R. A., Aghraz, A., Boutafda, A., Papazoglou, E. G., Tarantilis, P. A., Kanakis, C., ... & Ouhammou, A. (2018). Chemical composition of essential oil of Jatropha curcas L. leaves and its antioxidant and antimicrobial activities. *Ind Crops Prod, 121*, 405-410.

[30] Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Ćebović, T., Vukmirović, S., & Mikov, M. (2014). Antioxidant activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement Altern Med., 14*(1), 1-9.

[31] Sundararajan, B., Moola, A. K., Vivek, K., & Kumari, B. R. (2018). Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of Ocimum basilicum L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (Culex quinquefasciatus). *Microb Pathog, 125*, 475-485.

[32] Behbahani, B. A., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Mohebbi, M. (2017). Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with Anethum graveolens essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *Int J Biol Macromol, 94*, 515-526.

[33] Irani M, Homayouni Tabrizi M, Ardalan T. (2021).evaluation of in vitro antibacterial and antioxidant activity of nanoemulsions synthesized by artemisia aucheri boiss essential oil. *stud med sci.; 32* (2) :134-143.[in Persian]

[34] Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M. Ü. N. E. V. V. E. R., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A. T. A. L. A. Y., ... & Ozkan, H. İ. C. A. B. İ. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. longifolia. *Food chem, 103*(4), 1449-1456.

Research Article

Evaluation of stability, antimicrobial and antioxidant activity of micro-emulsion and nanoemulsion of rosemary essential oil

Dina Shahrampour[1*], Seyed Mohammad Ali Razavi[2]

1.Assistant Professor, Department of Food Safety and Quality Control, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract
In this study, microemulsions and nanoemulsions of rosemary essential oil were prepared under different ultrasound treatments (0, 2.5, 5 and 10 min). The stability of macro- and nanoemulsions of rosemary essential oil during one month of storage at 4 °C was determined through particle size measurement by DLS method. The antimicrobial activity of macro- and nanoemulsions of rosemary essential oil was evaluated by two methods of well diffusion and microdilution against four pathogenic bacteria. Also, their antioxidant potential was tested by DPPH free radical scavenging activity. The results showed that with increasing the ultrasound treatment time from 0 to 10 minutes, the emulsion droplets size decreased from 148.04 nm to 98.14 nm. An increase in micro-emulsion and nanoemulsions particle size was observed during storage. The results of antimicrobial tests also showed that macro and nanoemulsions of rosemary essential oil had the highest antimicrobial activity against gram-positive bacteria, especially *S. aureus*. In the antioxidant activity evaluation test, the IC50 index of macro- and nanoemulsions of rosemary essential oil were estimated to be 36.43 and 45.86 g/ml, respectively. Based on the results of this study, the nanoemulsion of rosemary essential oil is suggested as a natural antimicrobial and antioxidant compound for using in foods.

Keywords: Rosemary essential oil, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Nanoemulsion.

[*]Corresponding author: d.shahrampour@rifst.ac.ir