Original Article

Evaluation of biological properties of *Rosa damascene* essential oil nanoemulsion in vitro

Saffari I[1], Motallebi-Moghanjoghi AA[1], Sharafati-Chaleshtori R[2*], Ataee M[1], Khaledi A[3]

1- Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.
3- Infectious Diseases Research Center, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.

Received: 2022/12/15 | Accepted: 2023/02/22

Abstract:

Background: In recent years, the use of herbal medicine, as a complementary and effective medicine, is increasing worldwide. The aim of this study was to investigate the properties of *Rosa damascene* essential oil nanoemulsion in vitro.
Materials and Methods: In this experimental study, rose flower was obtained from Barzok area of Kashan and its essential oil was prepared by steam distillation method. The components of the essential oil were identified by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS). After preparing essential oil nanoemulsion, the size and morphology of nanoemulsion were examined by zeta test and transmission electron microscope (TEM), respectively. Antioxidant activity and cytotoxicity were tested by DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) and MTT (HeLa cancer cells) methods, respectively. Antimicrobial activities against *Salmonella Typhimurium* were evaluated by disc diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal (MBC) by microdilution methods and prevention of biofilm formation.
Results: The most compounds of rose essential oil included Nonadecane (33.55%), Heneicosane (16.03%), Hexadecanal (7.78%) and Eicosane (3.39%). The stability of nanoemulsion was also equal to -47.5 mV. The size of nanoemulsion particles was also confirmed by TEM method. Essential oil nanoemulsion had no antioxidant activity. The MIC and MBC were 350 and 700 µg/ml, respectively. The percentage of biofilm reduction in MIC and MBC concentrations was 75 and 80%, respectively. The concentration of 5.47 µg/mL of nanoemulsion caused a decrease of 67% of living HeLa cells.
Conclusion: With attention to the antibacterial and anticancer properties of rose essential oil nanoemulsion, this compound can be suggested in the treatment of bacterial infections and cancer cells.

Keywords: Nanoemulsion, Rose Essential Oil, Antibacterial Activity, Anticancer Activity, Gas Chromatography

***Corresponding Author**
Email: sharafati.reza@gmail.com
Tel: 0098 913 185 0503
Fax: 0098 315 554 1112

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2023; Vol. 27, No 1, Pages 31-40

Please cite this article as: Saffari I, Motallebi-Moghanjoghi AA, Sharafati-Chaleshtori R, Ataee M, Khaledi A. Evaluation of biological properties of *Rosa damascene* essential oil nanoemulsion in vitro. ***Feyz*** 2023; 27(1): 31-40.

بررسی خواص بیولوژیکی نانوامولسیون اسانس گل سرخ (*Rosa damascena*) در شرایط آزمایشگاهی

ایمان صفاری[۱]، عباسعلی مطلبی مغانجوقی[۱]، رضا شرافتی چالشتری[۲*]، مریم عطائی[۱]، آزاد خالدی[۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان دارویی به‌عنوان یک روش درمانی مکمل و مؤثر در سرتاسر جهان در حال افزایش است. هدف از این پژوهش، بررسی خواص نانوامولسیون اسانس گل سرخ در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، گل سرخ از منطقه برزک کاشان تهیه شد و اسانس آن به‌روش تقطیر با بخار به‌دست آمد. اجزای موجود در اسانس به‌روش گازکروماتوگرافی طیف‌سنج جرمی شناسایی شدند. پس از تهیه نانوامولسیون اسانس جهت تأیید پایداری و اندازه ذرات آن از آزمون‌های زتا و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) استفاده شد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی و سمّیت سلولی به‌ترتیب با روش‌های DPPH (۱،۱- دی‌فنیل- ۲- پیکریل- هیدرازیل) و MTT (سلول‌های سرطان سرویکس هلا) بررسی شدند. خاصیت ضدمیکروبی علیه *سالمونلا تیفی‌موریوم* به‌روش‌های انتشار دیسک، حداقل غلظت مهاری (MIC) و کشندگی (MBC) و نیز میکرودایلوشن و ممانعت از تشکیل بیوفیلم بررسی شد.

نتایج: بیشترین اجزای اسانس گل سرخ شامل Nonadecane (۳۳/۵۵ درصد)، Heneicosane (۱۶/۰۳ درصد)، Hexadecanal (۷/۷۸ درصد) و Eicosane (۳/۳۹ درصد) بودند. میزان پایداری نانوامولسیون نیز برابر ۴۷/۵- میلی‌ولت بود. اندازه ذرات نانوامولسیون نیز به‌روش TEM تأیید شد. نانوامولسیون اسانس فاقد خاصیت آنتی‌اکسیدانی بود. حداقل غلظت مهاری و کشندگی علیه *سالمونلا تیفی‌موریوم* به‌ترتیب ۳۵۰ و ۷۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. به‌ترتیب درصد کاهش بیوفیلم ایجادشده در غلظت MIC و MBC برابر با ۷۵ و ۸۰ درصد بود. غلظت ۵/۴۷ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوامولسیون اسانس گل سرخ سبب کاهش ۶۷ درصدی سلول‌های زنده هلا شد.

نتیجه‌گیری: باتوجه به خاصیت ضدباکتریایی و ضدسرطانی نانوامولسیون اسانس گل سرخ، این ترکیب می‌تواند برای درمان عفونت‌های باکتریایی و سلول‌های سرطانی پیشنهاد شود.

واژگان کلیدی: نانوامولسیون، اسانس گل سرخ، خاصیت ضدباکتریایی، خاصیت ضدسرطانی، گازکروماتوگرافی

دوماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و هفتم، شماره ۱، فروردین - اردیبهشت ۱۴۰۲، صفحات ۴۰-۳۱

مقدمه

امروزه استفاده از ترکیب‌های گیاهی به‌دلیل منشأ طبیعی و خاصیت ضدمیکروبی علیه انواعی از میکروب‌های مقاوم به مواد شیمیایی و داروها روزبه‌روز در حال افزایش می‌باشد [۳-۱]. ترکیب‌های گیاهی شامل انواع عصاره‌ها و اسانس‌ها می‌توانند به بهبود سیستم ایمنی [۴] و فلور میکروبی دستگاه گوارش [۵]، افزایش مقاومت به استرس‌های مختلف [۶]، اثر بر بیان انواع ژن‌ها [۷] و افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بدن انسان کمک کنند [۸].

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم‌پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم‌پزشکی کاشان، کاشان، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

کاشان، دانشگاه علوم‌پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک

تلفن: ۰۹۱۳۱۸۵۰۵۰۳ **دورنویس:** ۰۳۱۵۵۵۴۱۱۱۲

پست الکترونیک: sharafati.reza@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۲۴ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۴۰۱/۱۲/۳

به‌جهت افزایش پایداری ساختار انواع ترکیب‌های مذکور، در حال حاضر، رویکرد به‌سمت ایجاد ساختارهای نانو می‌باشد. نانوامولسیون‌ها یک سیستم ذرات کلوئیدی هستند که از دو مایع ناهمگن، مانند مخلوط آب و روغن تشکیل شده‌اند [۹]. نانوامولسیون‌ها به‌دلیل سهولت در آماده‌سازی، اندازه ذرات کوچک، فراهم‌زیستی افزایش‌یافته، اثربخشی زیستی و پایداری جنبشی به‌عنوان حامل ایده‌آل برای انتقال مواد چربی‌دوست شناخته می‌شوند. همچنین به‌دلیل آب محدود در ساختارشان به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی در نظر گرفته می‌شوند. بنابراین آب در دسترس میکروارگانیسم‌ها وجود ندارد [۱۰]. نانوامولسیون‌ها سیستم‌های ترمودینامیکی و جنبشی پایدار (بدون هیچ‌گونه لخته‌سازی) با اندازه قطرات (۴۰۰-۲۰ نانومتر) و توزیع اندازه یکنواخت دارند و خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی آن‌ها نسبت به سایر امولسیون‌ها متفاوت است (۵۰۰ نانومتر >) [۱۱]. از نانوامولسیون‌ها در صنایع مختلف، ازجمله نفت و گاز [۱۲] کشاورزی و شیمیایی، غذایی و آرایشی – بهداشتی می‌توان استفاده کرد [۱۳]. اسانس گل سرخ یکی از مهم‌ترین فرآورده‌های به‌دست‌آمده از گل سرخ (*Rosa*

damascena) است. در کشورهای مختلف نیمکره شمالی؛ مانند ترکیه، بلغارستان، مراکش، ایران، مصر، فرانسه، چین و هند این گل کشت می‌شود که ایران یکی از بزرگ‌ترین تولیدکننده‌های آن در جهان است و مناطق عمده تولید در ایران؛ شامل کاشان، فارس، کرمان و آذربایجان هستند [۱۴]. مطالعات گذشته، حاکی از وجود پلی‌فنول‌ها به‌ویژه فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در عصاره و اسانس به‌دست‌آمده از این گل می‌باشند. پلی‌فنول‌ها در پیشگیری از بیماری‌های قلبی –عروقی، سرطان‌ها، پوکی استخوان، بیماری‌های عصبی و دیابت نقش دارند و این ترکیب‌ها در بدن توسط میکروارگانسیم‌های روده بزرگ متابولیزه می‌شوند [۱۵]. اسانس گل محمّدی از پرمصرف‌ترین اسانس‌ها برای تولید عطر و لوازم آرایشی – بهداشتی است. این اسانس دارای خواص ضددرد، خواب‌آور و ضدالتهابی است که می‌تواند به‌واسطه حضور سیترونلول، ژرانیول و نرول، به‌عنوان ترکیب‌های مهمّ گل سرخ باشد [۱۶]. Gerasimova و همکاران (۲۰۲۲)، اثرات سمّیت سلولی گلاب تهیه‌شده از گل سرخ بلغاری را بررسی کردند و نشان دادند که گلاب در تمامی غلظت‌های مورد استفاده در سلول لنفوسیت انسان اثر سمّیت ضعیفی نشان داده است [۱۷]. یک مطالعه دیگر نشان داده است که استنشاق بوی این گل بعد از عمل جراحی سبب کاهش درد در بیماران شده است که ناشی از حضور ترکیب‌های استریک، آلدئید و ترپنی است که از طریق تحریک مرکز بویایی در مغز سبب کاهش میزان استرس و اضطراب می‌شوند [۱۸]. اسانس گل سرخ به‌صورت موضعی برای درمان زخم‌ها و سوزش ناشی از آن‌ها نیز استفاده می‌گردد [۱۹]. در یک بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس گل سرخ علیه *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروجینوزا*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کروموباکتریوم ویولاسئوم* و *اروینیا کاتووار* نیز گزارش شده است [۲۰]. همچنین در مطالعه‌ای، بو کردن اسانس گل سرخ توسط بچه‌هایی با اختلال خواب، سبب بهبود کیفیت خواب آن‌ها شده بود [۲۱]. بنابراین باتوجه به این‌که خواص بیولوژیکی این اسانس در مطالعات گذشته به اثبات رسیده است، هدف از انجام این مطالعه، تولید و تأیید نانوامولسیون اسانس گل سرخ و همچنین شناسایی خواص ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی آن در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه، تجربی و با کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1401.274 مصوب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بود.

تهیه اسانس و شناسایی اجزا:

گل‌های گیاه گل سرخ در خردادماه سال ۱۴۰۱ در منطقه برزک کاشان جمع‌آوری و به شرکت زرین‌گلاب کاشان منتقل شدند. اسانس‌گیری به‌روش تقطیر با بخار و دیگ‌های تمام استیل صنعتی انجام شد. جهت شناسایی اجزای موجود در اسانس از دستگاه گازکروماتوگرافی Agilent 6890 مجهز به طیف‌نگار جرمی با ستونی به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر از نوع BPX5 استفاده شد. برای شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده اسانس، نمونه توسط هگزان-N رقیق و به‌مقدار ۱ میکرولیتر به دستگاه GC/MS تزریق شد و برنامه دمایی ستون به‌صورت ذیل تنظیم گردید: دمای ابتدای آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به‌مدت ۵ دقیقه، شیب حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ دقیقه توقف در این دما و زمان پاسخ ۷۵ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌متر در دقیقه استفاده گردید. طیف‌نگار جرمی مورداستفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. محدوده اسکن مس‌ها از ۴۰ تا ۵۰۰ تنظیم گردید. نرم‌افزار مورداستفاده Chemstation بود. شناسایی طیف‌ها به‌کمک شاخص بازداری و مقایسه آن‌ها با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیب‌های استاندارد و نیز اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت [۲۳،۲۲].

تهیه نانوامولسیون اسانس، تأیید پایداری و ریخت‌شناسی

جهت تهیه نانوامولسیون اسانس گل سرخ، ابتدا اسپن ۸۰ داخل اسانس به‌صورت قطره‌قطره اضافه شد. توین ۸۰ مخلوط‌شده با آب به محلول قبلی اضافه گردید و روی همزن مغناطیسی به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. سپس محلول نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک (مدل UP400S، شرکت هشلر آلمان) با توان ۴۰۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز قرار داده شد [۲۴]. به‌منظور تأیید پایداری ذرات نانوامولسیون از آزمون زتا و دستگاه HS, Nano series 30 ساخت شرکت Malvern انگلستان استفاده شد. همچنین جهت تأیید تولید ماده موردنظر و پی‌بردن به ساختار و ریخت‌شناسی آن، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مدل ZEIS 912 AB-100 KV به‌کار رفت [۲۵].

تعیین سمّیت سلولی

آزمون MTT، یک روش رنگ‌سنجی جهت اندازه‌گیری توان حیاتی سلول و اثرات سمّی داروها و مواد بر روی سلول‌ها است. رده سلول‌های سرطانی سرویکس (HeLa) از انستیتو پاستور

ایران تهیه شد. ۵ میلی‌گرم پودر MTT (شرکت Sigma-Aldrich، آمریکا) در ۱ میلی‌لیتر PBS (شرکت Gibco آمریکا) حل شد و توسط فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرون استریل گردید. سپس رده سلولی مذکور در پلیت ۹۶خانه‌ای ($۱۰^۴$ سلول در هر چاهک) با محیط کشت DMEM (شرکت Sigma- Aldrich، آمریکا) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله، کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. رقت‌های متوالی از نانوامولسیون اسانس گل سرخ از غلظت‌های ۲/۷۳ تا ۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شدند. پس از تخلیه محیط چاهک‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت به‌همراه ۲۰ میکرولیتر از هر رقت نانوامولسیون به هر چاهک اضافه شد. چاهک کنترل فقط حاوی سلول‌ها و محیط کشت بود. پلیت به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO_2 قرار گرفت. پس از آن، محتوای چاهک‌ها تخلیه و ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس چاهک‌ها تخلیه و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه گردید و پلیت‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از مخلوط‌کردن هر چاهک، پلیت‌ها توسط دستگاه خوانشگر الایزا (BioTek ELx800, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی گردید و نتایج جذب نوری ثبت شد. با استفاده از فرمول زیر درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید [۲۶]:

$$\text{درصد سلول‌های سالم} = \frac{\text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری کنترل}} \times 100$$

تعیین اثر ضدمیکروبی

جهت تعیین فعالیت ضدمیکروبی، باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC: 14028) از آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم‌پزشکی کاشان تهیه شد. سپس باکتری موردنظر جهت تهیه سوسپانسیون نیم‌مک‌فارلند به محیط کشت نوترینت براث منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. در ادامه سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم‌مک‌فارلند ($۱۰^۸$ CFU/mL ×۱/۵) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر با جذبی بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ تهیه شد. جهت تأیید غلظت نمونه، شمارش میکروبی نیز انجام گرفت.

به‌منظور بررسی اثر ضدمیکروبی از روش انتشار دیسک و برای تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و کشندگی (MBC) از روش میکرودیلوشن استفاده شد. ابتدا نانوامولسیون گل سرخ در DMSO ۵ درصد با غلظت‌های ۱/۸۷ تا ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس در زیر هود لامینار، ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت به دیسک‌های بلانک اضافه گردید. از سوسپانسیون نیم مک‌فارلند باکتری نیز یک سوآپ برداشته و در محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک آلمان) به‌صورت چمنی کشت داده شد. با روش استاندارد انتشار دیسک (کربی - بائر)، دیسک‌های آغشته به نانوامولسیون در فاصله استاندارد (۱/۵سانتی‌متری) از یکدیگر در محیط کشت قرار داده شدند. محیط کشت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و سپس قطر هاله عدم رشد باکتری برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در روش میکرودیلوشن، در هر چاهک پلیت الایزا، ابتدا ۹۵ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث و سپس ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک‌فارلند اضافه شد. درنهایت ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۲۳/۴۳ تا ۷۵۰ میکروگرم (محلول در DMSO ۵ درصد) نانوامولسیون اسانس گل سرخ به هر چاهک اضافه شد. چاهک‌های حاوی محیط مولر هینتون براث و سوسپانسیون باکتریایی به‌عنوان کنترل مثبت و محیط مولر هینتون براث بدون حضور باکتری به‌عنوان کنترل منفی بودند. سپس میکروپلیت به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شد. آخرین رقت نانوامولسیون در چاهکی که در آن کدورتی مشاهده نشد، به‌عنوان حداقل غلظت مهاری (MIC) در نظر گرفته شد [۲۷]. سپس ۱۰ میکرولیتر از غلظت MIC و ۲ برابر MIC در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. محیط کشت مربوط به غلظتی که هیچ‌گونه رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد [۲۸]. برای بررسی میزان تشکیل بیوفیلم، در هر چاهک پلیت الایزا، ۱۷۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث و سپس از سوسپانسیون معادل نیم‌مک‌فارلند باکتری ۲۰ میکرولیتر به آن‌ها اضافه شد. در ادامه ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های نیم‌برابر MIC، MIC و ۲ برابر MIC نانوامولسیون اسانس به چاهک‌ها اضافه شد. چاهک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت بدون باکتری و با حضور باکتری به‌ترتیب به‌عنوان کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته شد. میکروپلیت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از ۲۴ ساعت محلول رویی دور ریخته شد و در ادامه هر چاهک ۳ بار با ۳۰۰ میکرولیتر از PBS شستشو داده شد. باکتری‌های چسبیده‌شده با ۲۵۰ میکرولیتر از اتانول ۹۶ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه فیکس شدند. هر چاهک ۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله ۰/۲ درصد رنگ شد و درنهایت پلیت موردنظر شسته و خشک گردید. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر از گلاسیال استیک‌اسید ۳۳ درصد به هر چاهک اضافه و جذب نوری آن‌ها در ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. جهت گزارش درصد کاهش بیوفیلم از فرمول زیر استفاده شد [۲۸،۲۷]:

$$\text{درصد کاهش بیوفیلم} = [\frac{(\boldsymbol{c}-\boldsymbol{b})-(\boldsymbol{t}-\boldsymbol{b})}{(\boldsymbol{c}-\boldsymbol{b})}] \times 100$$

b: جذب نوری برای کنترل مثبت، c: جذب نوری برای کنترل منفی، t: جذب نوری برای نمونه‌های تیمارشده

خاصیت آنتی‌اکسیدانی

برای تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون اسانس از روش اندازه‌گیری ظرفیت رادیکالی ۱-۱-۲- پکریل هیدرازین (DPPH) استفاده شد. ابتدا محلول ۰/۱۳۵ میلی‌مولار از DPPH در متانول تهیه شد و ۱/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف نانوامولسیون (۱/۹۵۳ – ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در متانول) به ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول DPPH در لوله آزمایش اضافه گردید. محلول کنترل، حاوی ۱/۵ میلی‌لیتر متانول و غلظت‌های (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب) اسیدآسکوربیک به‌عنوان ماده استاندارد بود که به محلول DPPH اضافه شد. در انتها جذب محلول‌ها پس از ۳۰ دقیقه قرارگرفتن در محیط تاریک توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد و درصد ظرفیت رادیکالی نیز به‌وسیله فرمول زیر محاسبه گردید [۲۹]:

[۱- (جذب شاهد – میزان جذب نمونه) / میزان جذب کنترل] × ۱۰۰ =درصد ظرفیت رادیکالی

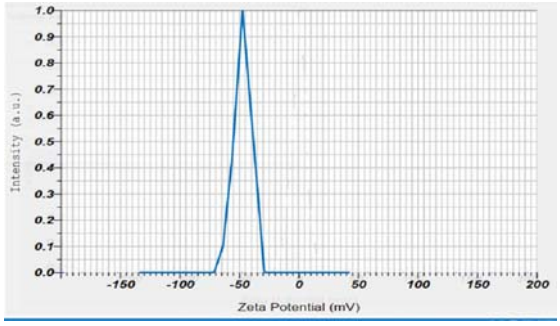
نتایج

براساس نتایج به‌دست‌آمده، کلّ اجزای شناسایی‌شده در اسانس گل سرخ، ۸۴/۰۱ درصد بود. بیشترین اجزای اسانس گل سرخ؛ شامل Nonadecane (۳۳/۵۵ درصد)، Heneicosane (۱۶/۰۳ درصد)، Hexadecanal (۷/۷۸ درصد) و Eicosane (۳/۳۹ درصد) بودند. در جدول شماره ۱، درصد اجزای شناسایی‌شده اسانس گل سرخ به‌روش گازکروماتوگرافی مجهز به طیف‌سنج جرمی قابل مشاهده است. نتایج پایداری نانوامولسیون اسانس گل سرخ با توجه به پتانسیل زتای ۴۷/۵- میلی‌ولت مورد تأیید بود (شکل شماره ۱). پتانسیل زتا برای نانوامولسیون باید بیشتر از ۳۰+ میلی‌ولت یا کمتر از ۳۰- میلی‌ولت باشد. در شکل شماره ۲، ریخت‌شناسی ذرات نانوامولسیون به‌روش TEM قابل مشاهده است. نتایج حاکی از تولید نانو قطرات با توزیع مناسب اسانس در محیط امولسیون می‌باشند.

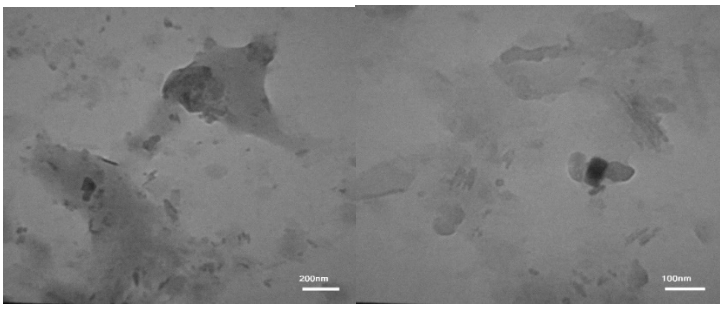
جدول شماره ۱- اجزای شناسایی‌شده اسانس گل سرخ به‌روش گازکروماتوگرافی مجهز به طیف‌سنج جرمی

ردیف	اجزا	نوع ترکیب	درصد
۱	α-Pinene	MH	۲/۵۶
۲	Sabinene	MH	۰/۱۴
۳	β-Pinene	MH	۰/۵۲
۴	Myrcene	MH	۰/۷۵
۵	α-Terpinene	MH	۰/۰۷
۶	ρ-Cymene	MH	۰/۰۶
۷	Limonene	MH	۰/۰۸
۸	Υ-Terpinene	MH	۰/۱۶
۹	Rose oxide(cis)	MO	۰/۱۰
۱۰	Nerol	MO	۰/۴۷
۱۱	Geranial	MO	۰/۱۶
۱۲	Citronellyl acetate	MO	۰/۴۶
۱۳	Neryl acetate	MO	۰/۶۱
۱۴	Methyl eugenol	MO	۰/۱۲
۱۵	Geraniol	MO	۱/۲۴
۱۶	β-Bourbonene	SH	۰/۲۷
۱۷	E-Caryophyllene	SH	۰/۹۵
۱۸	α-Guaiene	SH	۱/۳۹
۱۹	α-Humulene	SH	۱/۲۱
۲۰	Muurola-4(14),5-diene (cis)	SH	۳/۲۳
۲۱	α-Selinene	SH	۰/۳۱
۲۲	α-Bulnesene	SH	۱/۳۲
۲۳	δ-Cadinene	SH	۰/۰۹
۲۴	Farnezol (2z,6z)	SO	۱/۱۴
۲۵	Pentadecane	other	۰/۸۶
۲۶	Hexadecane	other	۰/۳۰

ردیف	اجزا	نوع ترکیب	درصد
۲۷	Heptadecane	other	۴/۲۰
۲۸	Hexadecanal	other	۷/۷۸
۲۹	Nonadecane	other	۳۳/۵۵
۳۰	Eicosane	other	۳/۳۹
۳۱	Heneicosane	other	۱۶/۰۳
۳۲	Octadecane	other	۰/۴۹
	MH: Monoterpene Hydrocarbons		۴/۳۴
	SH: Sesquiterpene Hydrocarbons		۸/۷۷
	MO: Oxygenated Monoterpenes		۳/۱۶
	SO: Oxygenated Sesquiterpenes		۱/۱۴
	Other		۶۶/۶
جمع کل			۸۱/۰۱

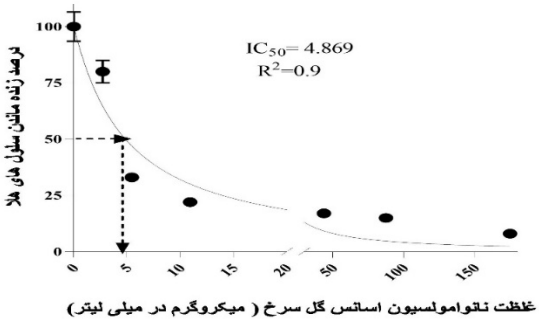


شکل شماره ۱- گراف پتانسیل زتای نانوامولسیون اسانس گل سرخ



شکل شماره ۲- ریخت‌شناسی ذرات نانوامولسیون به‌روش TEM در بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و ۲۰۰ نانومتر

میزان IC_{50} نانوامولسیون اسانس گل سرخ برای سلول‌های سرطانی سرویکس برابر با ۴/۸۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج درصد زنده‌ماندن سلول‌های هلا در نمودار شماره ۱ قابل مشاهده است. طبق نتایج به‌دست‌آمده، غلظت ۵/۴۷ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوامولسیون اسانس گل سرخ سبب کاهش شدید سلول‌های زنده هلا (۶۷ درصد) شد و همچنین با افزایش غلظت نیز سمّیت نانوامولسیون افزایش نشان داد. به‌طوری‌که در غلظت ۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر میزان زنده‌ماندن سلول‌ها فقط ۸ درصد بود.

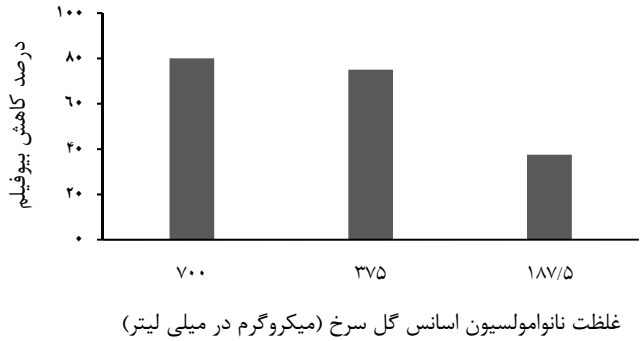


نمودار شماره ۱- IC_{50} و درصد زنده‌ماندن سلول‌های هلا متأثر از غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس گل سرخ

نتایج مربوط به خاصیت ضدمیکروبی نانوامولسیون اسانس گل سرخ در جدول شماره ۲ و نمودار شماره ۲ قابل مشاهده است. نتایج نشان دادند که با افزایش غلظت نانوامولسیون، قطر هاله عدم رشد و همچنین درصد کاهش بیوفیلم *سالمونلا تیفی‌موریوم*، افزایش داشت. بیشترین میزان قطر هاله رشد با ۸/۵ میلی‌متر در غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و بیشترین درصد کاهش بیوفیلم در غلظت ۷۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌میزان ۸۰ درصد بود. همچنین این نانوامولسیون فاقد خاصیت آنتی‌اکسیدانی بود.

جدول شماره ۲- خاصیت ضدمیکروبی نانوامولسیون اسانس گل سرخ علیه *سالمونلا تایفی‌موریوم*

	آزمون	نتایج
میکرودایلوشن	MIC (میکروگرم در میلی‌لیتر)	۳۷۵
	MBC (میکروگرم در میلی‌لیتر)	۷۰۰
دیسک دیفیوژن (قطر هاله رشد)	۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	۸/۵ میلی‌متر
	۷/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	۵ میلی‌متر
	۳/۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	۳/۵ میلی‌متر
	۱/۸۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	۲/۷ میلی‌متر
	جنتامایسین ۱۰ میکروگرم	۱۰ میلی‌متر



نمودار شماره ۲- درصد کاهش بیوفیلم *سالمونلا تایفی‌موریوم* متأثر از غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس گل سرخ

بحث

در این تحقیق خواص بیولوژیکی نانوامولسیون اسانس گل سرخ موردبررسی قرار گرفت. براساس آنالیز اجزای اسانس با گازکروماتوگرافی، عمده ترکیب اسانس گل سرخ را Nonadecane (۳۳/۵۵ درصد) و Heneicosane (۱۶/۰۳ درصد) تشکیل داده بودند. نتایج این مطالعه، مطابق با نتایج تحقیق بتولی و صفائی قمی بود. آن‌ها نشان دادند که بیشترین ترکیب اسانس گل سرخ ژنوتیپ زرد (طلایی) در ارتفاعات کاشان Heneicosane (۳۲ درصد) و Nonadecane (۳۰ درصد) بود. همچنین بیشترین و اصلی‌ترین جزء ترکیب‌های موجود در دو نوع ژنوتیپ صورتی پرپر و سفید گل سرخ هم سسکوئی‌ترپن Nonadecane و Heneicosane بود [۳۰]. در تصدیق نتایج این مطالعه، میرزایی و نجف‌پور انواع روش‌های استخراجی جهت شناسایی تغییرات ترکیب‌های اسانس گل سرخ را بررسی نمودند و نشان دادند که Nonadecane و Heneicosane به‌ترتیب رِنجی بین ۳۳/۱۱ تا ۴۴/۲۰ درصد و ۲۱/۳۱ تا ۳۷/۶۷ درصد داشتند. این اجزا، سنگین و مومی هستند و steroptens نامیده می‌شوند [۳۱]. تفاوت‌های مشاهده‌شده در تحقیقات گذشته روی اجزای اسانس می‌تواند ناشی از تفاوت ژنوتیپ‌های گل سرخ، روش‌های کشت و برداشت گل‌ها، آب‌وهوا، نحوه ذخیره‌سازی گل‌ها و روش تقطیر باشد [۳۳،۳۲]. اسانس‌ها با دارا بودن مولکول‌های فعال زیستی طبیعی به‌عنوان ترکیبات ضدمیکروبی جدید، نگهدارنده مواد غذایی و مؤثر برای درمان بیماری‌های عفونی استفاده می‌شوند. اسانس‌ها توسط سازمان غذا و داروی آمریکا و آژانس حفاظت از محیط زیست به‌عنوان مواد ایمن شناخته (GRAS) می‌شوند و دارای اثرات بیولوژیکی متنوعی هستند [۳۵،۳۴]. با این‌وجود، حلّالیت پایین و نوسانات بالای اسانس‌ها دو مانع اصلی برای استفاده از این ترکیبات در زمینه‌های مختلف است. روش‌های کپسوله و یا نانوامولسیونه کردن آن‌ها به‌جهت افزایش حلّالیت‌پذیری، پایداری در محیط و اثربخشی فزاینده مورد استفاده می‌باشد [۳۴]. در این مطالعه پس از تهیه نانوامولسیون اسانس و تأیید آن با آزمون زتا، مشاهده شد که این ترکیب دارای اثر ضدسرطانی علیه سلول‌های هلا بود. در

مطالعه‌ای اجزای موجود در اسانس‌ها؛ مانند nerolidol، thymol، geraniol، methylisoeugenol، eugenol و linalool دارای اثر کشندگی علیه سلول‌های HT-29 کلون بودند [۳۶]. در مطالعه Gerasimova و همکاران (۲۰۲۲)، هیچ‌گونه سمّیت سلولی هیدروسول گل سرخ بلغاری برای سلول‌های لنفوسیت انسانی در غلظت‌های ۶، ۱۱، ۱۴ و ۲۰ درصد و همچنین سلول‌های مغز استخوان موش در غلظت‌های ۱۱ و ۲۰ درصد گزارش نشد [۱۷]. در مطالعه Al-Oqail و همکاران (۲۰۲۱)، سمّیت سلولی عصاره‌های هگزانی و متانولی گل سرخ جمع‌آوری‌شده در عربستان، علیه سلول‌های سرویکس (HeLa)، اپیتلیال ریه (A-549) و سلول‌های پستان (MCF-7) بررسی شد. آن‌ها نشان دادند که بیشترین اثر دو نوع عصاره هگزانی و متانولی علیه سلول‌های هلا بود و به‌ترتیب IC_{50} برابر ۸۱۹/۶ و ۱۹۸/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند [۳۷]. در مطالعه دیگری اثرات سمّیت سلولی اسانس *R. alba* بلغاری را علیه سلول‌های لنفوسیت انسانی بررسی کردند و نتایج، حاکی از افزایش سمّیت سلولی با افزایش غلظت اسانس بود [۳۴]. در مطالعات دیگری اثرات ضدسرطانی عصاره گل سرخ گزارش شده است و مکانیسم اثر آن را در ارتباط با القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی، افزایش بیان ژن پروتئین BAK، کاهش فعالیت CDK2، مهار HMG-CoA ردوکتاز و مهار فعالیت اورنیتین دکربوکسیلاز دانسته‌اند [۳۹،۳۸]. مطالعات گذشته، اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های مختلف؛ مانند گل سرخ را علیه انواعی از باکتری‌ها مثل *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *پروتئوس ولگاریس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس ارئوس* و *استرپتوکوکوس پایوژنز* گزارش داده‌اند [۳۶-۳۳]. تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثرات ضدمیکروبی نانوامولسیون گل سرخ صورت نگرفته است. در جدول شماره ۲ این خاصیت علیه *سالمونلا تیفی‌موریوم* نشان داده شد. Shohayeb و همکاران، نشان دادند که میزان حداقل غلظت مهاری و کشندگی اسانس گل سرخ علیه باکتری‌های *S. Pyogenes*، *B. subtilis*، *S. aureus*، *M. phlei*، *P. aueruginosa* و *A. baumanni* به‌ترتیب برابر با ۰/۲۵، ۰/۲۵، ۰/۲۵، ۲، ۴ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۰/۵، ۲، ۴، ۴، ۸ و ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. آن‌ها MIC و MBC را برای *سالمونلا تیفی‌موریوم* به‌ترتیب ۴ و بیشتر از ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش دادند [۴۰]. نتایج مطالعه حاضر، حداقل غلظت مهاری و کشندگی را به‌ترتیب ۳۷۵ و ۷۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داد. بنابراین نانوامولسیون گل سرخ در مقایسه با اسانس آن دارای خاصیت ضدباکتریایی بیشتری است که مطابق با مطالعه Guliani و همکارانش می‌باشد [۴۱]. در بررسی دیگری اثر نانوامولسیون ژرانیول را به‌عنوان یک ترکیب موجود در اسانس‌ها علیه *استافیلوکوکوس ارئوس*، *اشریشیا کلی* و *لیستریا مونوسیتوژنز* نشان دادند [۴۲]. دلیل این امر می‌تواند خاصیت نانوامولسیون‌ها از نظر ترمودینامیکی برای هم‌جوشی با غشاهای لیپیدی باشد. این هم‌جوشی با جذب الکترواستاتیک بین بار کاتیونی امولسیون و بار آنیونی آن در باکتری افزایش می‌یابد و همین امر به لیز سلولی و مرگ پاتوژن منجر می‌گردد. با توجه به این‌که مکانیسم عملکرد نانوامولسیون‌ها اختلال غیراختصاصی غشای سلولی باکتریایی است، بنابراین نانوامولسیون‌ها به ایجاد سویه‌های مقاوم منجر نمی‌شود و استفاده از آن‌ها به‌عنوان یک عامل ضدمیکروبی و درمان امیدوارکننده به‌شمار می‌رود [۴۳،۳۱].

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، نانوامولسیون اسانس گل سرخ دارای خاصیت ضدسرطانی و ضدباکتریایی بود. با این‌وجود پیشنهاد می‌شود مطالعات میکروبی و سم‌شناسی نانوامولسیون گل سرخ در مدل‌های غذایی و حیوانی بررسی گردد تا بتواند به‌صورت کاربردی در صنایع غذایی (به‌جای نگهدارنده‌های شیمیایی) و دارویی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از زحمت‌های جناب آقای دکتر محمّد شایسته‌پور و همکاران مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک دانشگاه علوم‌پزشکی کاشان و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

[1] Papari moghadam fard M, Ketabchi S, Farjam MH. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of essential oil Ziziphus spina-Christ var aucheri grown wild in Iran. ***J Med Plants by- Products*** 2020; 9 (special): 69-73.

[2] Javid M, Aziz A, Azhar MF, Qayyum A. Antioxidant, antibacterial, phytochemical composition of leaves and roots extracts of Datura alba. ***Zeitschrift Fur Arznei-& Gewurzpflanzen*** 2017; 22(4): 165-8.

[3] Ramadan MM, El-Ghorab AH, Ghanem KZ. Volatile compounds, antioxidants, and anticancer activities of Cape gooseberry fruit (Physalis

peruviana L.): an in-vitro study. ***J Arab Society Med Res*** 2015; 10(2): 56.197-210.
[4] Guo FC, Kwakkel RP, Williams BA, Parmentier HK, Li WK, Yang ZQ, et al. Effects of mushroom and herb polysaccharides on cellular and humoral immune responses of Eimeria tenella-infected chickens. ***Poult Sci*** 2004; 83(7): 1124-32.
[5] Yang Y, Iji PA, Choct M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. ***Worlds Poult Sci J*** 2009; 65(1): 97-114.
[6] Basmacioglu H, Tokusoglu Ö, Ergül M. The effect of oregano and rosemary essential oils or alpha-tocopheryl acetate on performance and lipid oxidation of meat enriched with n-3 PUFA's in broilers. ***S Afr J Anim Sci*** 2004; 34(3).
[7] Fan B, Wang C, Song X, Ding X, Wu L, Wu H, et al. Corrigendum: Bacillus velezensis FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. ***Front Microbiol*** 2018; 10: 1279.
[8] Sharafati Chaleshtori R, Rafieian-Kopaei M, Salehi E. Bioactivity of Apium petroselinum and Portulaca oleracea essential oils as natural preservatives. ***Jundishapur J Microbiol*** 2015; 8(3): e20128.
[9] Javadzadeh Y, Bahari LA. Therapeutic nanostructures for dermal and transdermal drug delivery. ***In Nano Microscale Drug Delivery Systems*** 2017; 131-46.
[10] Ozogul Y, Yuvka İ, Ucar Y, Durmus M, Kösker AR, Öz M, et al. Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fillets during ice storage. ***LWT*** 2017; 75: 677-84.
[11] Rai VK, Mishra N, Yadav KS, Yadav NP. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. ***J Control Release*** 2018; 270: 203-25.
[12] Kumar N, Verma A, Mandal A. Formation, characteristics and oil industry applications of nanoemulsions: a review. ***J Pet Sci Eng*** 2021; 206: 109042.
[13] McClements DJ, Jafari SM. General aspects of nanoemulsions and their formulation. InNanoemulsions 2018 (pp. 3-20). Academic press.
[14] Baradaran GR, Aminaee MM, Assari MJ. Identification of fungal diseases of Rosa damascena in Kerman province of Iran. ***Arch Phytopathol Plant Prot*** 2012; 45(9): 1087-95.
[15] Solimine J, Garo E, Wedler J, Rusanov K, Fertig O, Hamburger M, et al. Tyrosinase inhibitory constituents from a polyphenol enriched fraction of rose oil distillation wastewater. ***Fitoterapia*** 2016; 108: 13-9.
[16] Li R, Wang K, Wang D, Xu L, Shi Y, Dai Z, et al. Production of plant volatile terpenoids (rose oil) by yeast cell factories. ***Green Chem*** 2021; 23(14): 5088-96.
[17] Gerasimova T, Jovtchev G, Gateva S, Topashka-Ancheva M, Stankov A, Angelova T, et al. Study on Cytotoxic and Genotoxic Potential of Bulgarian Rosa damascena Mill. and Rosa alba L. Hydrosols—In Vivo and In Vitro. ***Life*** 2022; 12(9): 1452.
[18] Surya M, Zuriati Z, Poddar S. Nursing aromatherapy using lavender with rose essence oil for post-surgery pain management. ***Enferm Clin*** 2020; 30: 171-4.
[19] Kashani LM, Memarzadeh MR, Hatami A, Shirzad M, Ahmadian-Attari MM. Comparison of two different traditional methods of rose oil preparation in terms of physicochemical factors. ***Traditional Integrative Med*** 2016; 69-74.
[20] Ulusoy S, Boşgelmez-Tınaz G, Seçilmiş-Canbay H. Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties of rose essential oil, hydrosol and absolute. ***Curr Microbiol*** 2009; 59(5): 554-8.
[21] Keyhanmehr AS, Movahhed M, Sahranavard S, Gachkar L, Hamdieh M, Afsharpaiman S, et al. The effect of aromatherapy with Rosa damascena essential oil on sleep quality in children. ***Res J Pharmacogn*** 2018; 5(1): 41-6.
[22] Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 Online ed. Texensis Publishing; 2017.
[23] McLafferty FW, Stauffer DB. The Wiley/NBS registry of mass spectral data. New York: Wiley; 1989. 1, 3139.
[24] Shahavi MH, Hosseini M, Jahanshahi M, Darzi GN. Optimization of encapsulated clove oil particle size with biodegradable shell using design expert methodology. ***Pakistan J Biotechnol*** 2015; 12(2): 149-60.
[25] Ding Z, Jiang Y, Liu X. Nanoemulsions-based drug delivery for brain tumors. ***InNanotechnology-based targeted drug delivery systems for brain tumors*** 2018; (pp. 327-58).
[26] Karimi Taheri Z, Aarabi MH, Nazari Alam A, Nejati M, Shayestehpour M, Gilasi HR, et al. Evaluating the Anti-proliferative Effects of Nanoemulsion Containing Licorice Extract and Lavender Essential Oil on Cancer. ***J Arak Uni Med Sci*** 2021; 24 (1): 84-97.
[27] Sharafati-Chaleshtori R, Sharafati-Chaleshtori F, Rafieian-kopaei M, Drees F, Ashrafi K. Comparison of the antibacterial effect of ethanolic walnut (juglans regia) leaf extract with chlorhexidine mouth rinse on Streptococcus mutans and sanguinis. ***J Islam Dent Assoc Iran*** 2010; 22(4): 211-7.
[28] Ghoshal G. Thyme essential oil nano-emulsion/Tamarind starch/Whey protein concentrate

novel edible films for tomato packaging. ***Food Control*** 2022; 138: 108990.
[29] Afolayan AJ, Jimoh FO, Sofidiya MO, Koduru S, Lewu FB. Medicinal Potential of the Root of Arctotis arctotoides. ***Pharm Biol*** 2007; 45(6): 486-93.
[30] Batooli H, Safaei-Ghomi J. Comparison of Essential Oil Composition of Flowers of Three Rosa damascena Mill. Genotypes from Kashan. ***J Med Plants*** 2012; 11 (42): 157-66.
[31] Mirza M, Najafpour Navaei MD. The effect of extraction time on essential oil composition of 4 genotype of Rosa damascene Mill. ***Eco-Phytochemical J Med Plants*** 2016; 4(2): 23-32.
[32] Nunes H, Miguel MG. Rosa damascena essential oils: a brief review about chemical composition and biological properties. ***Trends Phytochem Res*** 2017; 1(3): 111-28.
[33] Taghizadeh M, Ostad SN, Asemi Z, Mahboubi M, Hejazi S, Sharafati-Chaleshtori R, Rashidi A, Akbari H, Sharifi N. Sub-chronic oral toxicity of Cuminum cyminum L.'s essential oil in female Wistar rats. ***Regul Toxicol Pharmacol*** 2017; 88: 138-43.
[34] Gateva S, Jovtchev G, Chanev C, Georgieva A, Stankov A, Dobreva A, et al. Assessment of anti-cytotoxic, anti-genotoxic and antioxidant potentials of Bulgarian Rosa alba L. essential Oil. ***Caryologia*** 2020; 73(3).
[35] Chaleshtori FS, Chaleshtori RS. Antimicrobial activity of chitosan incorporated with lemon and oregano essential oils on broiler breast meat during refrigerated storage. ***Nutr Food Sci*** 2017; 47: 306-17.
[36] Thapa D, Richardson AJ, Zweifel B, Wallace RJ, Gratz SW. Genoprotective Effects of Essential Oil Compounds Against Oxidative and Methylated DNA Damage in Human Colon Cancer Cells. ***J Food Sci*** 2019; 84(7): 1979-85.
[37] Al-Oqail MM, Farshori NN, Al-Sheddi ES, Al-Massarani SM, Saquib Q, Siddiqui MA, Al-Khedhairy AA. Oxidative stress mediated cytotoxicity, cell cycle arrest, and apoptosis induced by Rosa damascena in human cervical cancer HeLa cells. ***Oxid Med Cell Longev*** 2021; 2021.
[38] Elson C.E. Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: protective roles in cancer and cardiovascular disease. ***J Nutr*** 1995; 125(6 Suppl): 1666S–72S.
[39] Mahboubi M. Rosa damascena as holy ancient herb with novel applications. ***J Tradit Complement Med*** 2015; 6(1): 10-6.
[40] Shohayeb M, Abdel-Hameed ES, Bazaid SA, Maghrabi I. Antibacterial and antifungal activity of Rosa damascena MILL. Essential oil, different extracts of rose petals. ***Int J Pharmacol*** 2014; 8(1):1-7.
[41] Guliani A, Verma M, Kumari A, Acharya A. Retaining the 'essence'of essential oil: Nanoemulsions of citral and carvone reduced oil loss and enhanced antibacterial efficacy via bacterial membrane perturbation. ***J Drug Deliv Sci Technol*** 2021; 61: 102243.
[42] Feng X, Feng K, Zheng Q, Tan W, Zhong W, Liao C, et al. Preparation and characterization of geraniol nanoemulsions and its antibacterial activity. ***Front Microbiol*** 2022; 13.
[43] Sharafati-Chaleshtori R, Mardani G, Rafieian-Kopaei M, Sharafati-Chaleshtori A, Drees F. Residues of oxytetracycline in cultured rainbow trout. ***Pak J Biol Sci*** 2013; 16(21): 1419-22.