مقایسه ی آثار آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریالی و سمیت سلولی عطرمایه و نانوامولسیون عطرمایه ی میخک

آتنا وفائی ملک‌آبادی[۱]، احسان کریمی[۱]، احسان اسکوئیان[۲]

۱) گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد ، دانشگاه آزاد اسلامی ، مشهد، ایران

۲) پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۱۴ **تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۳/۲۹**

چکیده

مقدمه: گیاهان دارویی یکی از تولیدات مهم در بخش کشاورزی و دارویی است. تأثیرگذاری مفید و ارزان بودن گیاهان دارویی، سازگاری با محیط‌زیست و آثار جانبی محدود گیاهان دارویی، نرخ استفاده از گیاهان دارویی را در سال‌های اخیر افزایش داده است. از دیرباز، عصاره‌های گیاهان مانند گیاه میخک در پزشکی، عطرسازی و به‌عنوان افزودنی‌ها در آشپزی استفاده می‌شدند؛ بنابراین، هدف از مطالعهٔ حاضر، بررسی و مقایسهٔ آثار آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و خاصیت ضدسرطانی عطرمایه و نانوامولسیون میخک است.

مواد و روش‌ها: فعالیت آنتی‌اکسیدانی عطرمایه و نانوامولسیون میخک با روش سنجش فعالیت مهاری رادیکال‌های DPPH (۲،۲–دی‌فنیل–۱–پیکریلیدرازیل) و ABTS (۲ و ۲ʹ–آزینو– بیس –۳– اتیل بنزتیازولین–۶– سولفونیک اسید) اندازه‌گیری شد. با تهیهٔ محیط کشت و سوسپانسیون از چهار باکتری پاتوژن از نوع گرم مثبت شامل استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و باکتری‌های گرم منفی ازجمله اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا و روش اندازه‌گیری قطر هالهٔ مهار رشد، خواص ضدباکتریایی عطرمایه و نانوامولسیون میخک ارزیابی گردید. علاوه بر این، آثار سمیت سلولی عطرمایه و نانوامولسیون میخک با تیمار غلظت‌های متفاوت ۱۵/۶، ۳۱/۲، ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، روی سلول سرطانی MCF7 با روش رنگ‌آمیزی MTT بررسی شد.

یافته‌های پژوهش: نانوامولسیون میخک در مقایسه با عطرمایه، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی مناسبی دارد و تأثیر معناداری بر مهار رادیکال‌های آزاد داشت. میزان مهار رادیکال‌های آزاد (IC_{50}) نانوامولسیون عطرمایهٔ میخک با روش DPPH و ABTS به ترتیب ۶۷/۲۹ و ۷۸/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. عطرمایه و نانوامولسیون میخک بر روی هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و منفی آزمایش‌شده در این پژوهش، اثر مهاری داشت؛ همچنین تست سمیت بیانگر تأثیر بیشتر نانوامولسیون میخک در از بین بردن سلول‌های سرطانی پستان در مقایسه با عطرمایهٔ میخک است.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه در محیط invitro نشان داد که نانوامولسیون میخک آثار آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریالی و ضدسرطانی نیرومندتری در مقایسه با عطرمایهٔ میخک دارد که می‌تواند برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های مرتبط با ایجاد گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن به‌کار رود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، آنتی‌باکتریال، آنتی‌کنسر، نانوامولسیون، عطرمایه میخک

[۱]نویسندهٔ مسئول: گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

Email: ***ehsankarimi@mshdiau.ac.ir***; ***ehskarimi59@gmail.com***

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

امروزه، داروهای گیاهی برگرفته از سیستم درمانی سنتی، نقش مهمی در نظام بهداشتی و سلامتی پیدا کرده است. در دهه‌های اخیر، گیاهان دارویی به علت عوارض جانبی محدودتر در درمان بیماری‌ها و سلامت بیشتر نسبت به داروهای سنتزی و مصنوعی، پذیرش گسترده‌تری پیدا کرده‌اند. از نظر دارویی، گیاهان گوناگون فعالیت ضدباکتری، ضدویروس و قارچ‌کش دارند. آن‌ها در ترمیم‌کننده‌ها و برای حفظ مواد غذایی استفاده می‌شوند و به‌عنوان ضد بی‌حسی، ضدمیکروبی، ضداسپاسم، آرام‌بخش و ضددرد موضعی به‌کار می‌روند (1). گیاهان دارویی به سبب کاربردهای بالقوه به‌عنوان ترکیبات دارویی و تغذیه، از اهمیت بسیاری برخوردار هستند. عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی گیاهان دارویی ممکن است به وجود داروهای زیستی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نسبت داده شود (2). *Syzygium aromaticum* که تحت عنوان میخک نیز شناخته می‌شود، گیاهی متعلق به خانواده *Myrtaceae* و بومی جزایر مالوکو در اندونزی است؛ اما در سال‌های اخیر، در مزارع مناطق و اقلیم‌های متفاوت جهان کشت‌شده است (1). میخک گیاهی معطر با فواید متعدد است. رایحهٔ میخک دلپذیر و درعین‌حال تند است و می‌توان از آن برای خوشبو کردن وسایل و کمد استفاده کرد؛ همچنین میخک استفاده دارویی نیز دارد و در غذاهای خاصی مانند کیک‌های معطر، طعم خوبی ایجاد می‌کند (3). این گیاه در صنایع عطرسازی از نظر تجاری استفاده می‌شود و همین‌طور یکی از چاشنی‌هایی است که ظرفیت بالایی به‌عنوان نگه‌دارنده در بسیاری از غذاها به‌ویژه در فرآوری گوشت به‌عنوان آنتی‌اکسیدان و با خاصیت ضدمیکروبی جایگزین نگه‌دارنده‌های شیمیایی دارد. *Syzygium aromaticum* همچنین از دیرباز، در صنایع دخانیات، مواد غذایی و آشامیدنی استفاده می‌شد (1,4). به‌طورکلی، رایج‌ترین قسمت‌های *Syzygium aromaticum* برگ، گل و ساقه است و به‌صورت تجاری گیاهانی خشک هستند که در صنایع غذایی به‌عنوان چاشنی و در صنایع دارویی برای درمان بیماری بری‌بری، درد شکم، ناتوانی جنسی، سرماخوردگی، سرفه، بیماری‌های چشمی، درد دندان و اختلالات گوارشی مانند نفخ استفاده می‌شوند (4,5). ترکیبات فعال بیولوژیکی موجود در گیاهان دارویی توسط علوم فیتوشیمیایی و فیتوفاژماکولوژیکی شناخته می‌گردد (6). ترکیبات فیتوشیمیایی، ترکیبات آلی استخراج‌شده از گیاهانی است که با کاهش خطرات بیماری‌های مزمن و سرطان‌ها مرتبط است. عملکردهای مختلفی برای ترکیبات فیتوشیمیایی توضیح داده‌شده است؛ ازجمله تنظیم انکوژن و بیان‌کنندهٔ سرکوبگر تومور در سلول‌های سرطانی؛ همچنین ترکیبات فیتوشیمیایی نقش مهمی در القای بازدارندگی چرخهٔ سلولی و آپوپتوز دارند (7). از نظر دارویی، میخک به‌عنوان منبع اصلی مولکول‌های فنولی مانند اسیدهای هیدروکسی بنزوئیک، فلاونوئیدها، هیدروکسی فنیل پروپن‌ها، اسیدهای هیدروکسی سینامیک و یوژنول ($C_{10}H_{12}O_2$) به‌شمار می‌رود که مهم‌ترین ترکیب بیولوژیک فعال در گیاه میخک – شناخته‌شده است و همین‌طور مشتقات گالیک‌اسید مانند تانن‌های هیدرولیزشونده که در گیاه تازه یافت می‌شود. علاوه بر این، میخک دربردارندهٔ فلاونوئیدهایی به نام کوئرستین و کائمپرفرول و فنولیک‌اسیدهایی مانند اسیدهای فرولیک، کافئیک، الاژیک و سالیسیلیک است. گیاه میخک دربردارندهٔ ۱۸ درصد از روغن ضروری است که شامل یوژنول، یوژنول استات و بتا- کاریوفیلنو است. روغن میخک ماده‌ای بی‌رنگ یا زرد کم‌رنگ است و از نظر بو و طعم با میخک متمایز است (1,8). تقریباً ۷۲-۹۰ درصد از عطرمایهٔ استخراج‌شده از میخک یوژنول دارد و سایر ترکیبات اساسی روغن میخک عبارت‌اند از: وانیلین، اسید کراتوگولیک، اسید گالوتانیک و همچنین فلاونوئیدهایی مانند رامنتین و یوژنیتین و تری‌ترپنوئیدهایی مانند اسید اولانولیک از ترکیبات میخک به‌شمار می‌آیند (3). روغن باکیفیت میخک از گیاهانی به‌دست می‌آید که دربردارندهٔ یوژنول، بتا- کاریوفیلن و یوژنول استات به‌عنوان ترکیبات اصلی هستند. ترکیب عطرمایه ممکن است بسته به عوامل ژنتیکی، شرایط آب و هوایی و تکنیک‌های کشت متفاوت باشد (9). این ترکیبات زیستی فعال شامل

تانن‌ها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها که از گیاهان استخراج می‌شوند، بسیار محلول در آب هستند؛ اما جذب اندک این مواد به علت سختی برای عبور از غشای لیپیدی و اندازهٔ بزرگ مولکولی، به کاهش دسترسی زیستی و کارایی آن‌ها منجر می‌شود (6). در سال‌های اخیر، استراتژی‌های نوین درمانی بر پایهٔ فناوری‌های نانو به‌عنوان جایگزینی برای شیمی‌درمانی ظهور پیدا کرده‌اند. از میان انواع مختلف محصولات نانو، نانوامولسیون‌ها مزایای مختلفی برای داروهای ضدسرطانی دارند و به‌واسطهٔ آن‌ها می‌توان غلظت داخل سلولی داروها را افزایش داد و بنابراین، سمیت سلولی شیمی‌درمانی کاهش می‌یابد (10). فرمولاسیون نانوامولسیون‌ها برای ترکیبات محلول ضعیف، با طیف وسیعی از آثار درمانی ازجمله خواص ضد تکثیر، ضدمیکروبی و ضد قارچی و همچنین آنتی‌اکسیدانی به‌کار می‌رود (11). تعدادی از سامانه‌های پیشرفته انتقال دارو به‌طور گسترده در سراسر جهان بررسی شده است. به‌طورکلی، یک نانوذره به‌عنوان هر ماده‌ای با قطر ۱–۱۰۰ نانومتر تعریف می‌شود، درحالی‌که از دید دارویی انتقال دارو، از یک نانوذره به هر مادهٔ کروی با قطر ۱–۱۰۰۰ نانومتر یاد می‌شود. نانوذرات از نانوکریستال‌ها، نانوامولسیون و نانوذرات به‌عنوان حامل مواد دارویی تشکیل شده‌اند. درواقع، نانوامولسیون‌ها، امولسیون با اندازهٔ قطرات نانوسکوپی هستند که به علت ظرفیت حل شدن آن می‌توانند دسترسی زیستی دارو را بهبود بخشند (12). بر اساس اندازه و ثبات قطرات، امولسیون‌ها به دسته‌های امولسیون درشت، میکرومولسیون و نانوامولسیون طبقه‌بندی می‌شوند (13). نانوامولسیون‌ها یک سیستم ذرات کلوئیدی در محدودهٔ اندازهٔ کمتر از میکرون هستند که به‌عنوان حامل مولکول‌های دارویی عمل می‌کنند. سه نوع نانوامولسیون وجود دارد که می‌تواند تشکیل شود: الف. روغن در نانوامولسیون آب که در آن روغن در فاز آبی مداوم پراکنده می‌شود؛ ب. آب در نانوامولسیون روغن که در آن قطرات آب در فاز روغن مداوم پراکنده می‌شوند و پ. نانوامولسیون پیوستهٔ دوسویه. تفاوت اصلی میان امولسیون و نانوامولسیون در اندازه و شکل ذرات پراکنده در مرحلهٔ پیوسته است (14).

فرمولاسیون نانوامولسیون‌ها به استفاده از دو مایع غیرقابل‌برگشت و یک امولسیفایر نیاز دارد. یکی از مایعات غیرقابل‌برگشت باید دارای چربی و دیگری ماده‌ای طبیعی باشد که فاز پراکنده و آبی را تشکیل می‌دهد (13). ویژگی نانوامولسیون‌ها شامل وضوح نوری، سازگاری زیستی، خاصیت غیر ایمونوژن بودن، زیست‌تخریب‌پذیری، کپسوله کردن دارو، انتشار پایدار و کنترل‌شده، قابل‌اندازه‌گیری نانومتری، مساحت بزرگ، سهولت تهیه و پایداری ترمودینامیکی باعث شده تا روش مناسبی در شیمی‌درمانی برای درمان سرطان به‌شمار آیند (15). بیماران مبتلا به سرطان در معرض خطر بالای عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند. روند میان عوامل عمده و سندرم‌های بالینی همراه با عفونت گرم منفی باکتریایی مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک در بیماران مبتلا به بدخیمی، با توجه ویژه به کارباپنم و گسترش طیف مقاومت بتا–لاکتام در اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، اسینتوباکتر بومانی، سودوموناس آئروژینوزا و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا، همه تهدیدات عمده برای بیماران مبتلا به سرطان است (16). مطالعات گذشته خواص متعددی ازجمله فعالیت‌های ضدویروسی، ضدمیکروبی، ضدقارچی، ضدسرطان، آنتی‌اکسیدان و ضدعفونی‌کننده را برای گیاه میخک نشان داده است (1,17). فعالیت آنتی‌اکسیدانی را می‌توان با روش‌های گوناگونی از نظر آزمایشگاهی و داخل بدن تجزیه‌وتحلیل کرد. در میان روش‌های آزمایشگاهی، روش مبتنی بر DPPH به علت سادگی، سرعت و هزینهٔ اندک و خاصیتش محبوب‌ترین روش است (18). در این مقاله، خاصیت‌های زیستی عطرمایه و نانوامولسیون گیاه میخک مانند آثار آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و همچنین خاصیت ضدسرطانی آن بررسی و مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ عطرمایه و نانوامولسیون عطرمایهٔ میخک:

در این مطالعه، برای آماده‌سازی نانوامولسیون، از ترکیب روغن میخک در آب از سورفاکتانت غیریونی و روش امولسیفیکاسیون اولتراسونیک استفاده گردید (19). عطرمایهٔ میخک در حلال آب با حضور

سورفاکتانت غیریونی و امولسیفایر پلی‌سوربات ۸۰، به نانوامولسیون تبدیل شد. مخلوط آماده‌شده توسط دستگاه سونیکاتور پروب‌دار (Cole-Parmer Instrument, USA) ۲۰ کیلوهرتز و با توان ۷۵۰ وات، برای مدت ۳۰ دقیقه هموژنایز گردید. از پلی‌اتیلن گلیکول به‌عنوان کمک حلال استفاده شد. امولسیون تولیدشده برای بررسی ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی و آنتی‌باکتریالی ارزیابی گردید (20). برای ساخت این نانوامولسیون، از عطرمایهٔ میخک با حضور سورفاکتانت غیریونی و امولسیفایر پلی‌سوربات ۸۰ به نانوامولسیون استفاده شد و در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آزمایش گردید.

ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی: روش‌های اسپکتروفتومتری گوناگونی برای بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف به‌کار گرفته می‌شود. از میان تست‌های رایج، روش بررسی فعالیت مهاری رادیکال ABTS (۲ و ۲′-آزینو- بیس -۳- اتیل بنزتیازولین-۶- سولفونیک اسید) و DPPH (۱ و ۱- دی فنیل-۲- پیکریل هیدرازیل) در این مطالعه آزمایش شد (21).

فعالیت مهار رادیکال DPPH: برای بررسی مهار رادیکال DPPH، از فعالیت کاهشی رادیکال متانولیک DPPH در حضور مادهٔ آنتی‌اکسیدان‌دهندهٔ هیدروژن استفاده می‌شود (22). برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عطرمایه و نانوامولسیون گیاه میخک، در مرحلهٔ اول، محلول DPPH ۰/۱ میلی‌مولار در اتانول ۹۶ درصد حل شد. در مرحلهٔ بعد، محلول آماده‌شده با نسبت یک‌به‌یک با غلظت‌های مختلف عطرمایه و نانوامولسیون (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مخلوط گردید. در مرحلهٔ بعد، محلول یادشده ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت و در آخر، جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (Epoch, Biotek, Winooski, VT, United Kingdom) در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. هر آزمایش با سه بار تکرار انجام گردید و به‌منظور انجام محاسبات، از مقادیر میانگین استفاده شد.

فعالیت مهار رادیکال ABTS: رادیکال‌های ABTS از طریق واکنش دادن ABTS، آب‌اکسیژنه و پراکسیداز رخ می‌دهد (21). غلظت‌های مختلف عطرمایه و نانوامولسیون (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با ABTS، آب‌اکسیژنه و پراکسیداز در آب دیونیزه به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردیدند. پس از گذشت مدت‌زمان ۱۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (Epoch, Biotek, Winooski, VT, United Kingdom) در ۷۳۴ nm خوانده شد (23).

کشت سلولی: ردهٔ سلولی MCF7 سرطان پستان از پژوهشکدهٔ بوعلی مشهد خریداری گردید. به‌منظور کشت سلول‌ها از محیط کشت DMEM استفاده شد. سلول‌های سرطان پستان MCF7، در فلاسک با حجم ۲۵ میلی‌لیتر در شرایط ۸۰ درصد رطوبت، ۵ درصد فشار دی‌اکسید کربن، دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و در محیط DMEM، دربردارندهٔ ۱۰ درصد FBS (سرم جنین گاوی) کشت گردید (24).

تست سمیت سلولی (MTT): به‌منظور بررسی اثر سمیت سلول عطرمایه و نانوامولسیون عطرمایهٔ میخک، تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر خانهٔ پلیت ۹۶ خانه کشت شدند. پس از گذشت مدت‌زمان ۴۸ ساعت، غلظت‌های متفاوت عطرمایه و نانوامولسیون عطرمایهٔ میخک ۱۵/۶، ۳۱/۲، ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده گردید و تیمار سلول‌ها با این غلظت‌ها انجام گرفت. پس از طی این زمان، محلول یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر از پودر MTT در محیط کشت DMEM به هر چاهک اضافه شد و مجدداً پلیت‌ها انکوبه گردید. پس از گذشت ۴ ساعت، انکوباسیون محیط با DMSO جایگزین و نهایتاً جذب خانه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (Epoch, Biotek, Winooski, VT, United Kingdom) در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. در انتها، میزان زنده ماندن سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد توان زیستی = ۱۰۰× (میانگین جذب نوری خانه‌های کنترل/ میانگین جذب نوری خانه‌های هر غلظت)

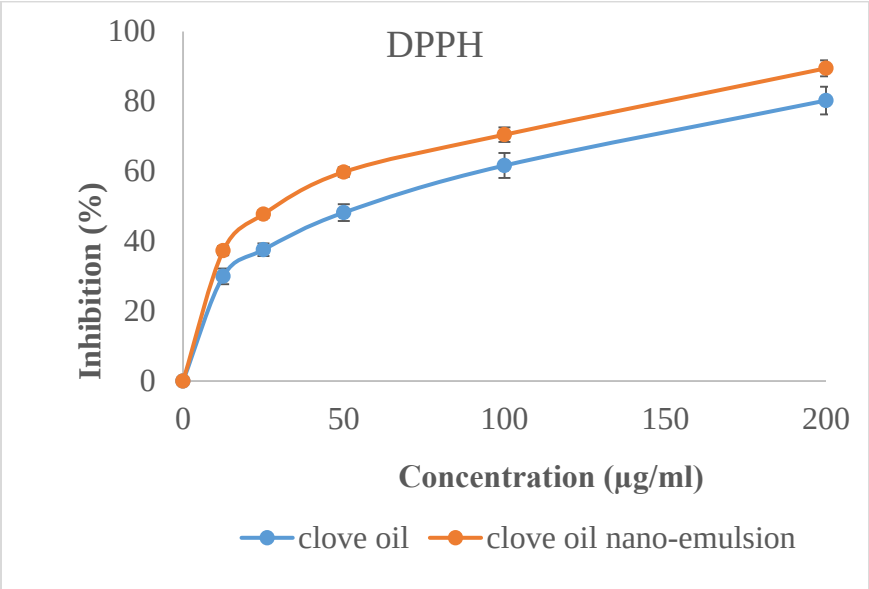
گفتنی است که آزمون MTT (۳-)۴ و ۵- دی‌متیل تیازول-۲-ایل (-۵-۲-دیفنیل تترازولیوم بروماید)، بر اساس تبدیل MTT به بلورهای فورمازان توسط سلول‌های زنده است که فعالیت‌های میتوکندری را تعیین می‌کند. ازآنجاکه برای بیشتر جمعیت‌های سلولی، فعالیت میتوکندریایی تماماً با تعداد سلول‌های زنده مرتبط است، این آزمایش به‌طور گسترده‌ای برای اندازه‌گیری آثار سمیت داروها روی رده‌های سلولی یا سلول‌های اولیهٔ بیمار استفاده می‌شود (25). هر آزمایش با سه بار تکرار انجام گردید و به‌منظور انجام محاسبات، از مقادیر میانگین استفاده شد.

تست مهار رشد باکتری: در این مطالعه، برای بررسی اثر آنتی‌باکتریایی عطرمایه و نانومولسیون گیاه میخک، از روش تست انتشار باکتری‌ها برای بررسی اندازهٔ هالهٔ عدم رشد هر باکتری بهره گرفته شد. در این مطالعه، فعالیت ضدمیکروبی عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ میخک علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی بررسی گردید. با تهیهٔ محیط کشت و سوسپانسیون از چهار باکتری پاتوژن، از نوع گرم مثبت شامل استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و باکتری‌های گرم منفی ازجمله اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا در این مطالعه بررسی شدند. هر آزمایش با سه بار تکرار انجام گردید و به‌منظور انجام محاسبات، از مقادیر میانگین استفاده شد.

آنالیز آماری: برای ارزیابی میزان بقای سلول‌های تیمارشده و خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانومولسیون عطرمایهٔ گیاه میخک، از نرم‌افزار SPSS vol.22 استفاده گردید. تجزیه‌وتحلیل واریانس و قیاس میانگین با روش LSD انجام گرفت و سطح اطمینان ۵ درصد برای محاسبات در نظر گرفته شد.

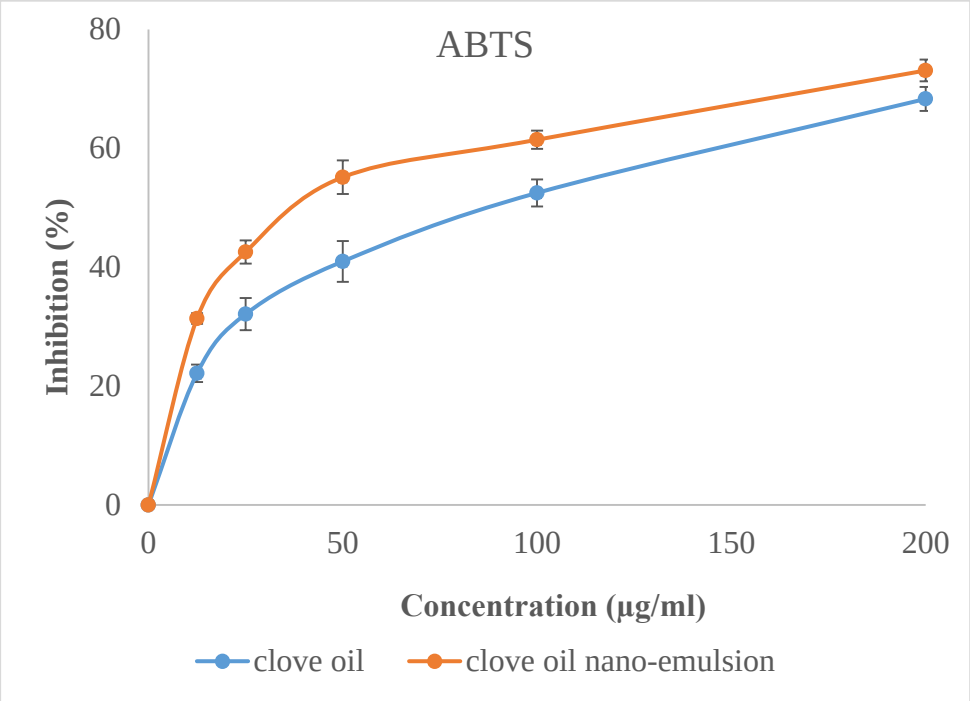
یافته‌های پژوهش

مهار رادیکال DPPH: نتایج این مطالعه نشان‌دهندهٔ مهار رادیکال DPPH توسط عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ میخک است. مهار رادیکال‌های DPPH توسط هر دو نمونهٔ میخک، به‌صورت وابسته به غلظت است، به‌طوری‌که با افزایش غلظت، قدرت مهار عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ میخک نیز افزایش می‌یابد که البته نتایج نشان‌دهندهٔ قدرت بیشتر نانومولسیون عطرمایهٔ میخک نسبت به عطرمایهٔ آن در غلظت‌های مساوی، برای مهار رادیکال‌های DPPH است (شکل شمارهٔ ۱). میزان مهار رادیکال‌های آزاد (IC_{50}) عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ میخک به ترتیب ۵۶/۷۲ و ۲۹/۶۷ میکروگرم/ میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد که نشان‌دهندهٔ آن است که حدود ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد در این غلظت مهار گشته‌اند. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که فعالیت عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ میخک تأثیر معناداری بر مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشت.



شکل شمارهٔ ۱. مهار رادیکال DPPH توسط عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ میخک (هر آزمایش با سه بار تکرار انجام شد و برای انجام محاسبات، از مقادیر میانگین استفاده گردید).

مهار رادیکال ABTS: نتایج به‌دست‌آمده از این تست نشان می‌دهد که مهار رادیکال‌های ABTS توسط عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ میخک وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت، میزان مهار نیز بیشتر می‌گردد. این نمودار نیز همانند روش DPPH ، نشان‌دهندهٔ آثار بیشتر نانومولسیون عطرمایهٔ میخک نسبت به عطرمایهٔ میخک است (شکل شمارهٔ ۲). در جدول شمارهٔ ۱ نیز، مقادیر IC_{50} برای هر دو نمونهٔ عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ میخک گزارش‌شده است که نشان‌دهندهٔ تأثیر معناداری بر مهار رادیکال‌های آزاد ABTS داشت.



شکل شمارهٔ ۲. مهار رادیکال ABTS توسط عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ میخک (هر آزمایش با سه بار تکرار انجام شد و برای انجام محاسبات، از مقادیر میانگین استفاده گردید).

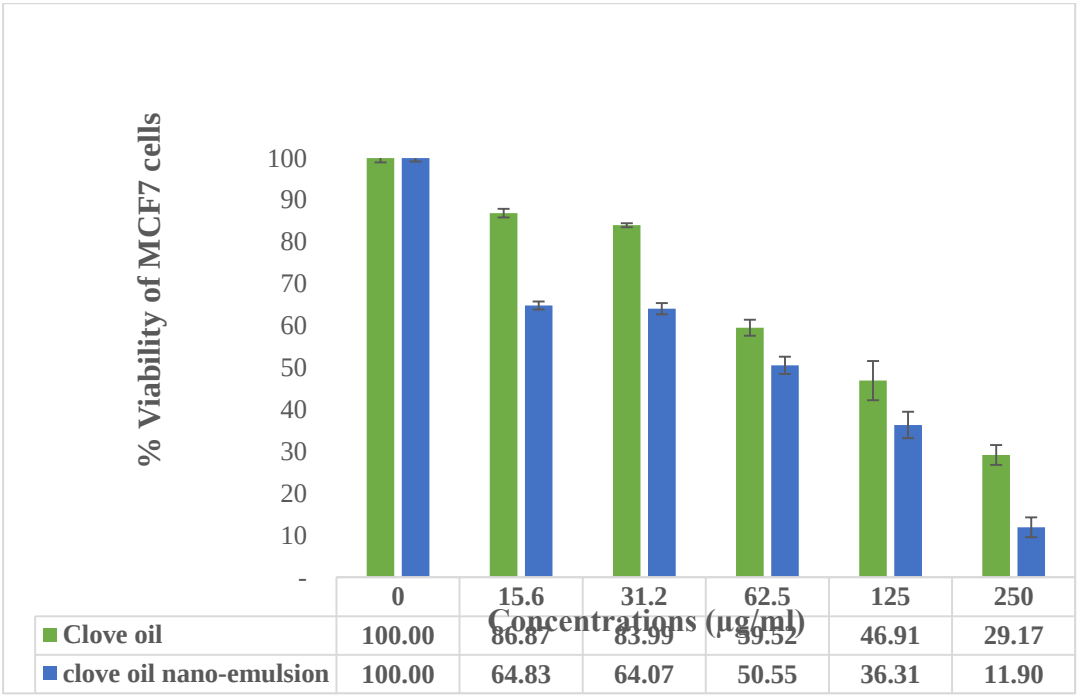
جدول شمارهٔ ۱. مقادیر مهار رادیکال‌های آزاد (IC_{50}) میخک و نانومولسیون میخک

نمونه	IC_{50} (µg/mL) DPPH	ABTS
میخک	۵۶/۷۲	۸۹/۱۳
نانومولسیون میخک	۲۹/۶۷	۳۹/۷۸

حروف a و b در یک ستون با یکدیگر، نشان‌دهندهٔ اختلاف معناداری در سطح $P<0/05$ است.

تست سمیت سلولی: یافته‌های به‌دست‌آمده از آزمون MTT نشان داد که زیستایی سلول‌ها بسته به غلظت تغییر می‌کند. در غلظت‌های ابتدایی، سلول‌ها توان حیاتی بیشتری دارند و در غلظت‌های بالاتر، این سلول‌ها غالباً به میزان بیشتری دچار مرگ می‌شوند. بررسی میزان سمیت عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ میخک بر سلول‌های سرطانی نشان داد که درصد بقای سلول‌ها ۴۸ ساعت پس از تیمار با عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ میخک به ترتیب از۸۶/۸۷ درصد و۶۴/۸۳ درصد در غلظت ۱۵/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا ۲۹/۱۷ درصد و ۱۱/۹ درصد در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش پیدا کرد که نشان‌دهندهٔ نیرومندتر بودن خاصیت ضدسرطانی نانومولسیون عطرمایه نسبت به عطرمایهٔ میخک بود (شکل شمارهٔ ۳).

شکل شمارهٔ ۳. تست سمیت سلولی عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ میخک (هر آزمایش با سه بار تکرار انجام شد و برای انجام محاسبات، از مقادیر میانگین استفاده گردید).



	0	15.6	31.2	62.5	125	250
Clove oil	100.00	86.87	83.99	59.52	46.91	29.17
clove oil nano-emulsion	100.00	64.83	64.07	50.55	36.31	11.90

تست مهار رشد باکتری: بر اساس نتایج تست مهار باکتری، آزمایش هردو تست عطرمایه و نانومولسیون گیاه میخک در برابر این باکتری‌ها، فعالیت ضدمیکروبی را نشان دادند، به‌طوری‌که هالهٔ عدم رشد ایجادشده با عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ میخک به ترتیب بین محدودهٔ ۱/۰۹ تا ۱/۳۷ سانتی‌متر و ۱/۲۲ تا ۱/۴۱ سانتی‌متر گزارش شد؛ همچنین نتایج آزمایش آشکار کرد که نانومولسیون عطرمایهٔ میخک نسبت به عطرمایه، خاصیت ضدمیکروبی بیشتری علیه باکتری‌های آزمایش‌شده دارد (جدول شمارهٔ ۲).

جدول شمارهٔ ۲. نتایج تست‌های ضدباکتریایی بر اساس روش انتشار

نمونه	هالهٔ عدم رشد (سانتی‌متر)			
	باکتری‌های گرم مثبت		باکتری‌های گرم منفی	
	S. aureus	*B. subtilis*	*E. coli*	*P. aeruginosa*
عطرمایهٔ میخک	۱/۳۷	۱/۰۹	۲/۱۵	۱/۲۱
نانومولسیون عطرمایهٔ میخک	۱/۴۱	۱/۲۲	۱/۲۸	۱/۳۶

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعهٔ حاضر، آثار آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و همچنین خاصیت ضدسرطانی عطرمایه و نانومولسیون گیاه میخک بررسی و مقایسه شد. برای ساخت این نانومولسیون از عطرمایهٔ میخک، از سورفاکتانت غیریونی و امولسیفایر پلی‌سوربات ۸۰ استفاده گردید و در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آزمایش شد. مطالعات گوناگون بر روی گیاهان دارویی و ترکیبات متنوع عصاره‌های گیاهی، ازجمله آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، گلیکوزیدها، ترکیبات فنولی و کومارین‌ها که متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهان نیز به‌شمار می‌روند، به‌خوبی آثار زیستی متفاوت مانند خاصیت ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی، آثار ضدمیکروبی را نشان داده است (26,27).

نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد که نانومولسیون سنتزشده از عصارهٔ گیاه میخک خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیرومندتری در مقایسه با عطرمایهٔ میخک دارد و درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPHو ABTS به‌طور معناداری افزایش داشت؛ همچنین مشخص گردید که عطرمایه و نانومولسیون عطرمایهٔ

میخک بر روی همهٔ باکتری‌های آزمایش‌شده در این پژوهش، اثر ممانعت‌کنندگی بر سلول‌های سرطانی دارد. از سویی، نتایج به‌دست‌آمده از تست MTT بیانگر تأثیر بیشتر نانوامولسیون عطرمایهٔ میخک در از بین بردن سلول‌های سرطانی پستان ردهٔ MCF7 در مقایسه با عطرمایهٔ میخک است.

در پژوهش‌های بهبهانی و همکاران، فعالیت ضدمیکروبی و ضد سمیت سلولی و آنتی‌اکسیدانی گیاه میخک و بر روی سویه‌های باکتری اشرشیاکلی و لیستریا اینوکوآ و استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس ائروجینوزا بررسی شده است. در این مطالعه، بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی از طریق DPPHو ABTSصورت گرفته است. بر اساس نتایج، رادیکال DPPH آلی نسبتاً پایدار قابلیت مناسبی برای تعیین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ گیاه میخک دارد و همچنین نتایج آزمایش‌ها مهار بیشتر باکتری‌های گرم مثبت (لیستریا اینوکوآ و سودوموناس ائروجینوزا) را در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی توسط روغن استخراج‌شده از گیاه میخک نشان داد (28).

در مطالعهٔ عبدالعظیم و همکاران، ترکیبات فنولی از عصارهٔ متانولی جوانه‌های گل میخک، به روش کروماتوگرافی شناسایی شد. کارایی عصارهٔ متانولی ریشهٔ گیاه میخک به‌عنوان یک عامل ضدسرطان پستان، رودهٔ بزرگ و کبد آزمایش گردید. نتایج این مطالعه آثار آنتی‌اکسیدانی نیرومندی با مقادیر مختلف IC_{50}، ۳۱ میکروگرم در میلی‌لیتر برای سلول‌های سرطان رودهٔ بزرگ، ۲۹/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر برای سلول‌های سرطان پستان و ۱۸/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر برای سلول‌های سرطان کبد را نشان داد (29).

در یک مطالعه که با هدف بررسی عصاره‌های مختلف میخک از نظر پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و عملکرد ضدباکتریایی آن‌ها علیه باکتری‌های بیماری‌زا صورت گرفت، نشان داده شد عصاره‌های مختلف خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیرومندی دارند، به‌طوری‌که رادیکال DPPH از ۲۵/۳ تا ۹۱/۴ درصد و رادیکال‌های آزاد ABTSرا از ۴۹/۴ تا ۹۹/۴ درصد به‌طور معناداری مهار کردند. علاوه بر این، عصارهٔ استخراج‌شده از گیاه میخک فعالیت ضدباکتریایی نیرومندی علیه استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوجنز، سالمونلا انتریدایتیس، سراشیا مارسسنس و اشرشیاکلی نشان داد (5).

برای بررسی آثار ضدسرطانی گیاه میخک به روش مطالعهٔ In-vivo و الگوی آزمایشگاهی سرطان در پستان، تحقیقی صورت گرفت که نتایج مطالعات آزمایشگاهی آثار ضدآپوپتوز عصارهٔ میخک بر سلول‌های MCF-7 را نشان داد. بر پایهٔ این تحقیق، گیاه میخک به‌طور چشمگیری، خطر ابتلا به سرطان غدهٔ پستان در موش‌ها را به‌صورت وابسته به دوز مهار می‌کند (30).

در مطالعهٔ دیگری که هدف آن ارزیابی فعالیت سمیت سلولی عصارهٔ میخک بر سلول‌های سرطان پستان انسان MCF-7 است، نتایج نشان داد که روغن عطرمایه بیشترین اثر سمیت سلولی و به دنبال آن، اتانول و عصارهٔ آبی نیز اثر سیتوتوکسیک دارند. بر اساس نتایج تست MTT در این مطالعه، عطرمایهٔ میخک بالاترین پتانسیل را به‌عنوان منبع ضدسرطان با غلظت IC_{50} پایین‌تر در هر دو روش زمان ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، با مقادیر به ترتیب ۳۶/۴۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۷/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر را دارد (31).

در مطالعه‌ای که هدف از آن بررسی خواص آنتی‌اکسیدان و ضدباکتریایی نانوامولسیون استخراج‌شده از گیاه میخک در شرایط آزمایشگاهی بود، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون میخک در غلظت‌های مختلف ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، از نظر فعالیت مهار رادیکال DPPH، در محدودهٔ ۹۴/۵ تا ۹۴/۹ درصد گزارش شد. علاوه بر این، نتایج بررسی خاصیت آنتی‌باکتریایی نانوامولسیون میخک نشان داد که پاتوژن‌های مربوط به مواد غذایی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس، بالاترین حساسیت را به نانوامولسیون میخک (ناحیهٔ مهار رشد ۵/۱۲ تا ۱۴/۳۴ میلی‌متر) نشان داده‌اند که مؤید این است که نانوامولسیون عصارهٔ میخک خاصیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی مناسبی در شرایط آزمایشگاهی دارد (32).

به‌هرحال، با توجه به مطالب بالا و نتـایج به‌دست‌آمده از این تحقیق می‌توان گفت نانوامولسیون میخک، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی مناسبی در مقایسه با عطرمایهٔ میخک دارد و تأثیر معناداری بر مهار رادیکال‌های آزاد می‌گذارد. میزان مهار رادیکال‌های آزاد (IC_{50}) نانوامولسیون عطرمایهٔ میخک با روش DPPH و ABTS به ترتیب ۶۷/۲۹ و ۷۸/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد که با توجه به بررسی مطالعات مختلف روشی کارآمد برای سنجش خواص آنتی‌اکسیدانی محسوب می‌شود. عطرمایه و نانوامولسیون میخک بر روی هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و منفی مورد آزمایش در این پژوهش، اثر مهاری داشت و ازآنجاکه از دیرباز برای گیاه میخک آثار ضدمیکروبی نام‌برده شده است، نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق مؤید آثار مناسب ضدباکتریایی عصارهٔ این گیاه است. علاوه بر این، بر طبق نتایج این مطالعه، تست سمیت بیانگر تأثیر بیشتر نانوامولسیون میخک در از بین بردن سلول‌های سرطانی پستان در مقایسه با عطرمایهٔ میخک است که این موضوع می‌تواند نقطهٔ شروعی برای تحقیقات بیشتر دربارهٔ مطالعهٔ اثر نانوامولسیون گیاه میخک و سایر گیاهان دارای ترکیبات زیستی سودمند، برای درمان سلول‌های سرطانی باشد.

در پژوهش صورت گرفته، نانوامولسیون سنتزشده توسط عطرمایهٔ گیاه میخک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و خاصیت ضدمیکروبی نیرومندی داشت. بر اساس نتایج مطالعهٔ انجام‌شده، این خاصیت نشانگر پتانسیل تبدیل شدن این نانوامولسیون به یک استراتژی درمانی برای بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو و همچنین سرطان در آینده است؛ همچنین پیشنهاد می‌شود به‌منظور بررسی سمیت مؤثر، اثر نانوامولسیون به‌دست‌آمده از گیاه میخک بر روی سایر رده‌های سلول‌های سرطانی و نیز مطالعه در محیط In-vivo مورد پژوهش قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

این مقاله منتج از پایان‌نامه دانشجویی (با کد ثبت پایان‌نامه: ۱۱۱۳۰۵۵۴۹۷۲۰۰۴)، جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی گرایش سلولی و ملکولی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد است و این پایان‌نامه در جلسه کمیته اخلاق مورخه ۱۳۹۸ /۰۷/۲۴ بررسی و تائید گردیده است. بدین‌وسیله از زحمات بی‌دریغ اساتید ارجمند گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

کد اخلاق: این کار تحقیقاتی در جلسه کمیته اخلاق مورخه ۱۳۹۸ /۰۷/۲۴ بررسی و تائید گردیده است.

References

1. Elsaber Batiha G, Magdybeshbishy A, Elmmleeh AM. Abdeldaim M, Prasaddevkota H. Traditional uses bioactive chemical constituents and pharmacological and toxicological activities of glycyrrhiza glabra L. Biomolecules 2020;10:352. doi.10.3390/biom10030352

2. Sultana B, Anwar F, Mushtaq M, Aslam M, Ijaz S. Invitro antimutagenic antioxidant activities and total phenolics of clove Syzygium aromaticum L. seed extracts. Pak J Pharm Sci2014;27:53-7.

3. Bhowmik D, Kumar KPS, Yadav A, Srivastava S, Paswan S, Dutta AS. Recent trends in Indian traditional herbs Syzygium aromaticum and its health benefits. J Pharmacogn Phytochem 2012;1:13-22.

4. Alawiyah AL, Senania A, Sari H, Perdana F, Musthafa I. Antioxidant activity of volatile compounds from Syzygium aromaticum L. leaves. J Phys Con Ser2019;2:55038. doi.10.1002/ffj.3299

5. Elmaati MFA, Mahgoub SA, Labib SM, Algaby AMA, Ramadan MF. Phenolic extracts of clove Syzygium aromaticum with novel antioxidant and antibacterial activities. Eur J Integr Med 2016; 4:494-504. doi.10.1016/j.eujim.2016.02.006

6. Aziz ZAA, Ali SAM, Ahmad A, Mohd-Setapar SH. Application of herbal extract and its medicinal value. Der Pharm Lett 2016;8:161-7.

7. Chua LK, Lim CL, Ling APK, Chye SM, Koh RY. Anticancer potential of syzygium speciesa review. Plant Foods Hum Nutr 2019;74:18-27. doi.10.1007/s11130-018-0704-z

8. Wael S, Nuringtyas TR, Wijayanti N, Astuti P. Secondary metabolites production in clove Syzygium aromaticum

chemical compounds. J Biol Sci 2018;18:399-406. doi. 10.1016/j.ics.2006.02.002

9. Kaur K, Kaushal S, Rani R. Chemical composition antioxidant and antifungal potential of clove Syzygium aromaticum essential oil its major compound and its derivatives. J Essent Oil Bear Plants 2019;22:1195-217.

10. Severino P, Fangueiro JF, Ferreira S V, Basso R, Chaud M V, Santana MHA, et al. Nanoemulsions and nanoparticles for non-melanoma skin cancer effects of lipid materials. Clin Transl Oncol 2013;15:417-24. doi.10.1007/s12094-012-0982-0

11. Tayeb HH, Sainsbury F. Nanoemulsions in drug delivery formulation to medical application. Nanomedicine2018;19:2507-25. doi.10.2217/nnm-2018-0088

12. Arifin SF, Al Shami A, Omar SSS, Jalil MAA, Khalid KA, Hadi H. Impact of modern technology on the development of natural-based products. J Ayurvedic Herb Med 2019;5:133-42.

13. Aswathanarayan JB, Vittal RR. Nanoemulsions and their potential applications in food industry. Front Sustain Food Syst2019;3:95. doi.10.3389/fsufs.2019.00095

14. Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion an advanced mode of drug delivery system. Biotech 2015;5:123-7. doi.10.1007/s13205-014-0214-0

15. Sahu P, Das D, Mishra VK, Kashaw V, Kashaw SK. Nanoemulsion a novel eon in cancer chemotherapy. Mini Rev Med Chem 2017;17:1778-92. doi. 10.2174/1389557516666160219122755

16. Perez F, Adachi J, Bonomo RA. Antibiotic resistant gram negative bacterial infections in patients with cancer. Clin Infect Dis2014;59: 335-9. doi.10.1093/cid/ciu612

17. Sharifirad J, Sureda A, Tenore G, Daglia M, Sharifrad M, Valussi M, et al. Biological activities of essential oils from plant chemoecology to traditional healing systems. Molecules 2017;22:70.

18. Torre MP, Cavero RY, Calvo MI, Vizmanos JL. A simple and a reliable method to quantify antioxidant activity invivo. Antioxidants 2019;8:142.

19. Shahavi MH, Hosseini M, Jahanshahi M, Meyer RL, Darzi GN. Evaluation of critical parameters for preparation of stable clove oil nanoemulsion. Arab J Chem2019;12:3225-30.

20. Periasamy VS, Athinarayanan J, Alshatwi AA. Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of nigella sativa L. essential oil on human breast cancer cells. Ultrason Sonochem 2016;31:449-55.

21. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant rich US foods. J Food Compos Anal 2011;24:1043-8.

22. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT Food Sci Technol 1995; 28:25-30.

23. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese J Nutr Diet 1986;44:307-15.

24. Khan FA, Akhtar S, Almohazey D, Alomari M, Almofty SA. Extracts of clove Syzygium aromaticum potentiate FMSP nanoparticles induced cell death in MCF-7 cells. Int J Biomater 2018 23;2018:1-10.

25. Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays the MTT assay. Cancer cell Culture 2011;2: 237-45.

26. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 2000;88:308-16.

27. Verpoorte R, Kim HK, Choi YH. Plants as source for medicines new perspectives. Frontis 2006;261-73.

28. Behbahani BA, Noshad M, Falah F. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of Syzygium aromaticum essential oil on foodborne pathogens. Potravin Slovak J Food Sci 2019;13:875-83.

29. Azim MHM. Anti tumor, antioxidant and antimicrobial and the phenolic constituents of clove flower buds Syzygium aromaticum. J Microb Biochem Technol 2014; 1:7-8.

30. Kubatka P, Uramova S, Kello M, Kajo K, Kruzliak P, Mojzis J, et al. Antineoplastic effects of clove buds Syzygium aromaticum L) in the model of

breast carcinoma. J Cell Mol Med 2017;21:2837-51.

31. Kumar PS, Febriyanti RM, Sofyan FF, Luftimas DE, Abdulah R. Anticancer potential of Syzygium aromaticum L. in MCF-7 human breast cancer cell lines. Pharmacogn Res 2014;6:350-4. A

32. Shahbazi Y. Antioxidant, antibacterial, and antifungal properties of nanoemulsion of clove essential oil. Nanomedicine Res J2019;4:204-8.

Comparison of Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Effects of Essential Oil and Nanoemulsion of Clove Essential Oil

Vafaeimalekabadi A[1], Karimi E[1], Oskoueian E[2]*

(Received: August 04, 2020 Accepted: June 19, 2021)

Abstract

Introduction: Medicinal plants are among the most important products in agriculture and medicine. The usefulness and cheapness, environmental friendliness, and limited side effects of medicinal plants have increased the rate of use of these plants in recent years. Plant extracts, such as cloves, have long been used in medicine, perfumery, and as additives in cooking. This study aimed to evaluate and compare the antioxidant, antibacterial, and anti-cancer effects of clove essential oil and nanoemulsion.

Materials & Methods: Antioxidant activity of essential oil and clove nanoemulsion by measuring the inhibitory activity of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS radicals (2 and 2-azino-bis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) was measured in this study. The evaluation of antibacterial and bactericidal properties of essential oil and clove nanoemulsion was conducted by culture medium and suspension of four pathogenic bacteria of gram-positive, including Staphylococcus aureus and Bacillus subtilis, and gram-negative bacteria, including Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa, followed by the measurement of the diameter of the growth inhibition zone. In addition, the effects of cytotoxicity of clove essential oil and nanoemulsion on different concentrations of 15.6, 31.2, 62.5, 125, and 250 µg/ml on MCF7 cancer cells were evaluated by MTT staining.

Findings: Clove nanoemulsion, compared to essential oil, had good antioxidant potential and a significant effect on free radical scavenging. The rates of free radical scavenging (IC50) of clove essential oil nanoemulsion were obtained at 67.29 and 78.39 µg/ml measured by DPPH and ABTS methods, respectively. Clove essential oil and nanoemulsion had an inhibitory effect on both groups of gram-positive and gram-negative bacteria tested in this study. The toxicity test also showed a greater effect of clove nanoemulsion in killing breast cancer cells, compared to the clove essential oil.

Discussions & Conclusions: The results of this *in vitro* study indicate the antioxidant and anti-cancer effects of clove nanoemulsion, compared to essential oil, which can be used to prevent and treat many diseases associated with the development of reactive oxygen species.

Keywords: Antioxidant, Antibacterial, Anticancer, Nanoemulsion, clove essential oil

1. Dept of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2. Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Mashhad, Iran
**Corresponding author Email: ehsankarimi@mshdiau.ac.ir ; ehskarimi59@gmail.com*