

فرمولاسیون نانوامولسیون از اسانس مریم گلی (*Salvia hypoleuca*) و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و ضد میکروبی آن

ساسان قره‌نقده^۱، حمیدرضا صمدلوئی^{۲*}، محمود صوتی خیابانی^۳، سامان قره‌نقده^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۴- دانشجوی دکتری، فیتوشیمی، دانشگاه شهید بهشتی

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۲/۲۱)

چکیده

متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از گونه‌های مریم‌گلی عمدتاً ترپنوئیدها و فلاونوئیدها هستند، که جز ترکیبات زیست فعال با اثرات سلامت بخشی بالا می‌باشند. ولی بسیاری از این مواد بعد از استخراج از گیاه، از لحاظ شیمیایی ناپایدار می‌شوند و هنگام مصرف اثر سلامت بخشی کمتر از حد لازم را نشان می‌دهند. یکی از روش‌های کاهش این محدودیت‌ها، ریز پوشانی کردن اسانس‌ها در حامل‌های لیپیدی از جمله نانوامولسیون‌ها است. نانوامولسیون‌های حاوی اسانس مریم‌گلی، با استفاده سورفکتانت‌های تویین ۸۰ و اسپن ۸۰ در تعادل آب دوست-چربی دوست مختلف به روش اولتراسوند با شدت بالا تولید شدند. تعیین اندازه و توزیع ذرات و همچنین پایداری فیزیکی نانوامولسیون‌ها از لحاظ اندازه در طی زمان با استفاده از پراکندگی نور پویا (*DLS*) مورد بررسی گرفت. نتایج نشان داد که اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات به ترتیب در محدوده ۱۴۱-۸۹ و ۰/۴۱-۰/۳۶ نانومتر بود و نانوامولسیون‌های تولید شده به مدت ۶۰ روز نگهداری در دمای ۲۵°C پایدار بودند. نتایج حاصل از آزمایش‌های میکربی نشان داد، تاثیر اسانس در دو حالت آزاد و کپسوله شده در برابر باکتری گرم مثبت بیشتر از باکتری گرم منفی بود. همچنین خاصیت ضد میکروبی نانوامولسیون نسبت به اسانس در حالت آزاد در برابر تمام باکتری-های مورد آزمایش بیشتر بود.

کلید واژگان: اسانس مریم‌گلی، نانوامولسیون، اولتراسوند، ضد میکروبی، GC-MS

* مسئول مکاتبات: hsamadlouie@yahoo.com

۱- مقدمه

بی تردید غذا یکی از مهمترین نیازهای انسان به شمار آمده و تامین غذای سالم با سلامت جامعه در ارتباط است. با توجه به افزایش بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی، که منجر به مشکلات اجتماعی و اقتصادی بسیار می‌گردد، لزوماً تلاشی دائم برای تولید مواد غذایی ایمن‌تر و یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدیدتر روشن خواهد گشت. یکی از روش‌های کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی ساخت بشر در غذاست [۱]. اما، به دلیل مشکلات ایجاد شده توسط مواد نگهدارنده شیمیایی امروزه تمایل مصرف‌کنندگان به استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد قارچی آنها به صورت قابل توجهی افزایش پیدا کرده است [۲]. اسانس‌ها از جمله ترکیبات طبیعی می‌باشند که امروزه بعنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی کاربرد فراوانی پیدا کرده‌اند [۳]. اسانس‌ها ترکیبات روغنی و معطر هستند که از اندام‌های مختلف گیاهان دارویی و معطر بدست آمده و بطور گسترده‌ای به عنوان طعم دهنده غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند [۴]. از این رو استفاده از آنها علاوه بر جلوگیری از رشد باکتری‌ها و کپک‌های آلوده‌کننده مواد غذایی و افزایش عمر نگهداری غذاهای فرآیند شده در سیستم غذایی به علت وجود ترکیبات معطر در ساختار ترکیباتشان، باعث بهبود عطر و طعم غذا و رضایتمندی مصرف‌کننده می‌شود [۴ و ۵]. مریم گلی با نام علمی سالویا^۱ نام یک سرده از گیاهان تیره نعناعیان است [۶]. این سرده شامل بیش از ۱۰۰۰ گونه از درختچه‌ها، گیاهان علفی و یک ساله می‌باشد. جنس *salvia* شامل صدها گونه است که در سراسر دنیا پراکندگی جغرافیایی دارند. ۵۸ گونه از این جنس در ایران یافت می‌شود که ۱۷ گونه‌اش بومی ایران است. خواص درمانی متعددی از گونه‌های مختلف این جنس گزارش شده است. برخی از گونه‌های *salvia* رویشی در ایران خواص ضد اسپاسم و ضد التهاب نشان می‌دهند. در بررسی فیتوشیمیایی بر روی گونه‌های مختلف *salvia* ترکیبات فلاونوئیدی و ترپنوئیدی شناسایی گردیده‌اند [۷-۹]. در بین گیاهان مریم گلی، *salvia hypoleuca* یکی از

گونه‌های بومی ایران بوده و در دامنه‌های جنوبی کوه‌های البرز در استان‌های تهران، البرز و مازندران یافت می‌شود. خاصیت ضد میکروبی اسانس گونه‌های مختلف گیاهان جنس *salvia* طی پژوهش‌های مختلف به اثبات رسیده است [۱۰ و ۱۱]. مصرف اسانس‌ها عموماً به دلیل محلولیت پایین در آب، فشار بخار بالا و ناپایداری فیزیکی و شیمیایی با دشواری‌هایی در کاربرد همراه است [۱۲]. علاوه بر این، اسانس‌ها در محصولات ایجاد بو و مزه می‌کنند که این امر خوشایند مصرف‌کنندگان نیست؛ بنابراین، امروزه تلاش می‌شود تا تأثیرات نامطلوب اسانس‌ها کاسته شود. نانودیسپرسیون‌ها^۲، روش امیدوارکننده‌ای برای غلبه بر مشکلات مربوط به حلالیت پایین و دسترسی زیستی این ترکیبات و همچنین محافظت آنها در برابر تأثیرات متقابل با سایر ترکیبات و افزایش خواص ضد میکروبی از طریق افزایش جذب سلولی هستند و از آنها برای طراحی و تولید سیستم‌های حامل لیپیدی استفاده می‌شود [۱۳]. نانوامولسیون‌های روغن در آب، حاوی قطرات کوچک روغن با قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر هستند که در میان یک فاز پیوسته آبی پراکنده شده‌اند و هر قطره روغن توسط مولکول‌های امولسیفایر به صورت لایه‌ای نازک احاطه شده است [۱۴]. نانوامولسیون‌ها به خاطر اندازه ذرات کوچکتری که نسبت به امولسیون‌های معمولی دارند سطح بیشتری دارند و در فرآیندهای انتقالی موثرترند. [۱۵]. توپوز و همکاران (۲۰۱۶)، خاصیت ضد میکروبی نانوامولسیون و اسانس گیاه رازیانه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این محققان بالا بودن فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون حاوی اسانس رازیانه نسبت به اسانس آزاد را نشان داد [۱۶]. با توجه به پتانسیل ضد اکسایشی و ضد میکروبی بالای اسانس مریم گلی و تمایل به تولید مواد نگهدارنده طبیعی، تلاش برای افزایش اثرات اسانس مریم گلی به شیوه‌های گوناگونی دیده می‌شود. لذا هدف از این تحقیق تولید نانوامولسیون‌های حاوی اسانس *S. hydrangea* به روش فراصوت و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ضد میکروبی آنها می‌باشد.

2. Nanodispersions

1. Salvia

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

سورفکتانت‌های تویین ۳۸۰ و اسپن ۸۰^۴ از شرکت مرک آلمان، محیط کشت‌های نوترینت آگار، مولر هیتون آگار و نوترینت برات از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. گیاه مریم گلی *S. hypoleuca* نیز از استان مازندران- جاده هراز- منطقه امام زاده هاشم جمع‌آوری شده و با شماره هرباریومی MPH-۱۹۴۶ در هرباریوم پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تایید شد.

۲-۲- استخراج اسانس مریم گلی

ابتدا گیاه مذکور خرد شده و اسانس‌گیری از آن با روش تقطیر با بخار آب به وسیله دستگاه کلونجر صورت گرفت [۱۸]. آب‌گیری از اسانس به وسیله افزودن اندکی سدیم سولفات انجام شد. اسانس بدون آب در ظرف تیره در یخچال در دمای ۴ °C نگهداری شد [۱۹].

۲-۳- شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس

آنالیز اسانس به کمک دستگاه گاز کروماتوگراف Thermoquest مدل Trace مجهز به ستون DB-۵ به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. دمای محفظه تزریق و آشکارساز به ترتیب ۲۵۰ °C و ۳۰۰ °C بود و از نیتروژن با سرعت ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. دمای آون به طور صعودی از ۶۰ تا ۲۵۰ °C با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافته و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰ °C ثابت ماند. شناسایی اجزاء اسانس به کمک دستگاه گاز کروماتوگراف کوپل شده با طیف سنج جرمی Finnigan-Thermoquest مدل Trace مجهز به ستون DB-۵ به طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. هلیوم با سرعت جریان ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. برنامه دمایی مانند دستگاه GC تنظیم گردید [۲۰].

۲-۴- تهیه نانوامولسیون

به منظور تهیه نانوامولسیون از تویین ۸۰ و اسپن ۸۰ استفاده شد. نانوامولسیون حاوی ۲٪ وزنی سورفکتانت، ۹۶٪ وزنی آب و ۲٪ وزنی اسانس بود [۱۷]. به منظور تهیه تعادل آب دوست-چربی دوست ۸-۱۴ نسبت‌های جرمی متفاوت از دو سورفکتانت رابطه زیر محاسبه گردید [۲۱].

$$HLB = (m_A \times HLB_A + m_B \times HLB_B / m_A + m_B) \times 100$$

m_A و m_B : به ترتیب نسبت جرمی سورفکتانت A و B

HLB_A و HLB_B : به ترتیب HLB سورفکتانت A و B

ابتدا تویین، اسپن، آب و اسانس به صورت جداگانه وزن شده و در ویال‌های شیشه‌ای جداگانه ریخته شدند، سپس آب روی تویین و اسانس روی اسپن ریخته شد. پس از آن مخلوط اسانس و اسپن، به آب و تویین اضافه شد. در نهایت مخلوط حاصل ۱ دقیقه همزده شد و بعد از آن به مدت ۱۵ دقیقه توسط یک سونیکاتور آزمایشگاهی (مدل MPI، ساخت کشور سوئیس) با توان ۴۰۰ وات و فرکانس ۲۰/۵ کیلوهرتز تحت تاثیر امواج فراصوت قرار گرفت [۲۱].

۲-۵- تعیین اندازه ذرات

برای اندازه‌گیری اندازه ذرات، هر یک از نمونه‌ها با آب مقطر ۲۰ برابر رقیق شدند و اندازه ذرات به وسیله پراکندگی نور پویا ذرات (Nanophox Sympatec GmbH، ساخت آلمان) بر اساس روش تفرق نور لیزر اندازه‌گیری شدند. متوسط اندازه ذرات بر مبنای میانگین قطر حجمی محاسبه شدند [۲۲].

$$D[\varphi, \varphi] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

توزیع اندازه ذرات نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد [۲۳]:

$$PDI = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)}$$

D (۱۰٪): قطری است که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۹۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

5. Hydrophilic-lipophilic balance
6. Dynamic light scattering (DLS)

3. Tween 80
4. Span 80

باکتری در سرم فیزیولوژی تهیه و کدورت آن با لوله‌ی نیم مک‌فارلند تنظیم شد. این سوسپانسیون به نسبت ۱:۱۰۰ با نوترینت براث رقیق شد و سپس $100 \mu\text{l}$ از آن به هر چاهک اضافه گردید. به این ترتیب در هر چاهک $1 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ -۱/۵ باکتری مورد سنجش وجود داشت. با اضافه شدن سوسپانسیون باکتری، غلظت نهایی ماده‌ی مورد بررسی در هر چاهک نصف می‌شد. پس از گرمخانه گذاری، چاهک‌ها از لحاظ داشتن کدورت بررسی شده و اولین چاهک بدون کدورت به عنوان کم‌ترین غلظت مهار کننده‌ی رشد، تعیین و بر اساس $\mu\text{g/ml}$ ثبت شد. سپس از هر یک غلظت‌های پایین‌تر از MIC، میزان ۵ میکرولیتر برداشته و در پلیت‌های حاوی محیط کشت، کشت سطحی کرده و مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای 37°C قرار داده شد. سپس رشد و عدم رشد باکتریها بررسی شد، اولین غلظتی که در آن عدم رشد مشاهده گردید به عنوان MBC در نظر گرفته شد [۲۴].

۲-۸- روش آماری

آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی بر اساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام پذیرفت. برای تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه میانگین‌های دانکن در سطح ۵٪ استفاده شد. نرم افزار آماری SPSS ۱۶ در تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شناسایی ترکیبات اسانس

با مطالعه و بررسی اندیس‌های بازداری، طیف‌های جرمی و مقایسه این پارامترها با ترکیبات استاندارد و تزریق جداگانه برخی از استانداردهای موجود، ترکیبات موجود در اسانس گیاه *S. hypoleuca* شناسایی و ۴۰ ترکیب گزارش شد. بین ترکیبات شناسایی شده ۴ ترکیب بتا پینن، آلفا پینن، ۱/۸ سینئول و کاریوفیلین به ترتیب با ۲۲/۶، ۲۰/۷، ۷/۲ و ۷/۱ درصد به عنوان ترکیبات غالب اسانس معرفی شدند. با توجه به نتایج حاصل شده مشاهده می‌شود که ۵۶/۳٪ ترکیبات به صورت مونوترپن‌های هیدروکربنی، ۲۲/۲٪ ترکیبات به صورت سزکوئی‌ترین‌های هیدروکربنی، ۱۷/۹٪ به صورت مونوترپن‌های اکسیژن دار و ۳/۴٪

(۹۰٪) D: قطری است که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۱۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد. (۵۰٪) D: قطری است که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۵۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد (قطر میانه) [۲۳].

۲-۶- تعیین پایداری نانوامولسیون‌ها در طی

نگهداری

پایداری بلند مدت نانوامولسیون‌های تولید شده با اندازه‌گیری تغییرات در اندازه ذرات و همچنین ظاهر آن‌ها در طی نگهداری در دمای آزمایشگاه (تقریباً 25°C) به مدت ۶۰ روز بررسی شد. بدین منظور اندازه ذرات نانوامولسیون‌های تولید شده در روزهای اول، سی‌ام و روز شصتم با استفاده از دستگاه پراکنش نوری فعال اندازه‌گیری شد.

۲-۷- بررسی خاصیت ضد میکروبی

سنجش حداقل غلظت بازدارندگی^۷ و حداقل غلظت

کشندگی^۸ با روش میکرودایلوشن

در تحقیق حاضر سویه‌های باکتریایی *Bacillus cereus* سرئوس^۹ (ATCC 11778) و *Enterococcus faecalis*^{۱۰} (ATCC 29212) از دسته باکتری‌های گرم مثبت و *Klebsiella pneumoniae*^{۱۱} (ATCC 3583) و *Moraxella catarrhalis*^{۱۲} (ATCC 25238) از دسته باکتری‌های گرم منفی از مرکز کلسیون میکروبی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه تبریز تهیه شدند. باکتری‌های اخذ شده از کلکسیون برای اطمینان یک بار روی محیط نوترینت آگار کشت داده شده و تک کلنی انتخاب گردید. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از روش رقت سازی در پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. بدین منظور محلول استوک اولیه با غلظت $10000 \mu\text{g/ml}$ با استفاده از محیط کشت نوترینت براث تهیه شد. سری رقتی از ماده‌ی مورد بررسی (نانوامولسیون و اسانس) در نوترینت براث تهیه شد ($10000 \mu\text{g/ml}$ -۱۹/۵۳) با حجم $100 \mu\text{l}$). سوسپانسیونی از کشت تازه (۲۰-۱۸ ساعته)

7. MIC

8. MBC

9. *Bacillus cereus*

10. *Enterococcus faecalis*

11. *Klebsiella pneumoniae*

12. *Moraxella catarrhalis*

استفاده شد. نتایج مربوط به متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات در تعادل آب دوست-چربی دوست مختلف به ترتیب در محدوده ۱۴۴ - ۸۹ و ۰/۴۱ - ۰/۳۶ نانومتر قرار دارند (جدول ۲). همچنین اثر تعادل آب دوست-چربی دوست مختلف بر توزیع اندازه ذرات معنی دار نبود اما تیمارهای مختلف از لحاظ اندازه با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند ($P < 0/05$).

Table 2 the effects of different Hydrophilic-lipophilic balance on size and size distribution of particles of nanoemulsion including the essential oil of

Treatment	HLB	Size (nm)	Size distribution of particles
1	8	144.14 ± 2/61 ^a	0.36 ± 0/047 ^a
2	9	89.45 ± 0/41 ^f	0.38 ± 0/017 ^a
3	10	91.24 ± 2/25 ^f	0.40 ± 0/02 ^a
4	11	95.45 ± 1/9 ^e	0.40 ± 0/03 ^a
5	12	99.36 ± 0/005 ^d	0.41 ± 0/015 ^a
6	13	114.5 ± 0/65 ^b	0.39 ± 0/05 ^a
7	14	110.45 ± 1/05 ^c	0.39 ± 0/015 ^a

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین قطر ذرات متعلق به تیمار با تعادل آب دوست-چربی دوست ۸ و کمترین آن مربوط به تیمار تعادل آب دوست-چربی دوست ۹ و ۱۰ می باشد. توزیع اندازه ذرات نانوامولسیونها نیز کمتر از ۰/۵ و باریک بود که نشان دهنده پایدار بودن نانوامولسیونهاست. برای تهیه نانوامولسیون با اندازه قطرات پایدار استفاده از سورفاکتانت ضروری است. توپین ۸۰ و اسپن ۸۰ معمولاً به دلیل درجه بالایی از سازگاری با اجزای دیگر و سمیت پایین به عنوان سورفاکتانت-های بی خطر مورد استفاده قرار می گیرند. اسپن ۸۰ یک سورفاکتانت ویسکوز، چربی دوست و یک معرف امولسیون کننده است. توپین ۸۰ مشتقی از اسپن ۸۰ است که به طور طبیعی آب دوست است، و در آب حلالیت بیشتری نسبت به روغن دارد. برای داشتن یک نانوامولسیون پایدار یکی از شرایط برقراری توازن بین ویژگی های آب دوستی و چربی دوستی است. بنابراین از مخلوط اسپن ۸۰ و توپین ۸۰ استفاده می شود. این سورفاکتانت های غیر یونی که مولکول های بدون بار می باشند به

در دسته سزکوئی ترین های اکسیژن دار طبقه بندی می شوند. نتایج در جدول ۱ به صورت خلاصه آورده شده است.

Table 1 Chemical composition of *Salvia hypoleuca* essential oil

Combine name	Retention indices DB5	Percent	Identification
Tricyclene	931	0.2	RI-MS
α-Pinene	942	20.7	RI-MS
Camphene	957	2.1	RI-MS
Sabinene	979	5.6	RI-MS
β-Pinene	987	22.6	RI-MS-CoI
Myrcene	991	0.7	RI-MS
α -Terpinene	1022	0.3	RI-MS
<i>p</i> -Cymene	1029	0.2	RI-MS
Limonene	1034	2.1	RI-MS-CoI
1,8-Cineole	1038	7.2	RI-MS
γ -Terpinene	1062	0.9	RI-MS
Terpinolene	1094	0.2	RI-MS
Linalool	1099	0.7	RI-MS
<i>trans</i> -Pinocarveol	1148	1.6	RI-MS
Camphor	1154	2.2	RI-MS
Pinocarvone	1170	0.4	RI-MS
Borneol	1174	1.9	RI-MS-CoI
Terpinen-4-ol	1185	1.6	RI-MS
α -Terpineol	1196	0.6	RI-MS
Myrtenal	1204	0.3	RI-MS
Bornyl acetate	1293	1.3	RI-MS
δ -Elemene	1349	1.2	RI-MS
β -Elemene	1390	0.3	RI-MS
<i>E</i>-Caryophyllene	1403	0.2	RI-MS-CoI
Aromadendrene	1458	7.1	RI-MS
α -Hmulene	1472	0.2	RI-MS
<i>9-epi-E</i> -Caryophyllene	1480	0.1	RI-MS
γ -Muuroolene	1491	0.2	RI-MS
Germacrene D	1500	0.5	RI-MS
δ -Selinene	1506	2.8	RI-MS
Bicyclogermacrene	1517	2.0	RI-MS
γ -Cadinene	1530	7.0	RI-MS
δ -Cadinene	1536	0.1	RI-MS

۲-۳- اندازه و توزیع اندازه ذرات

در این مطالعه به منظور یافتن فرمولاسیون بهینه جهت بررسی خواص ضد میکروبی و فیزیوشیمیایی نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی از تعادل آب دوست-چربی دوست مختلف

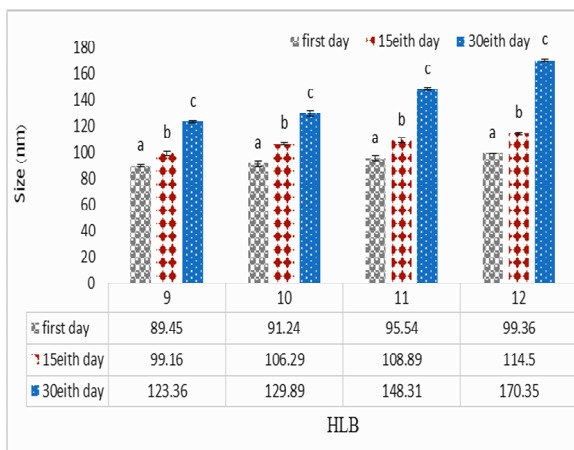


Fig 1 the size of the particles in the different the hydrophilic-lipophilic balance (different letters indicating the difference in the level of 5% Danken test)

بی تردید واضح ترین شرط برای پایداری نانو امولسیون ها کافی بودن مقدار سورفکتانت برای تشکیل دست کم یک تک لایه روی قطرات فاز پراکنده است به گونه ای که می توان پایدار ترین امولسیون ها را با کاهش پی در پی مقدار ماده ی امولسیون کننده ناپایدار کرد [۲۸]. حداقل غلظت لازم سورفکتانت برای تشکیل امولسیون، غلظت بحرانی میسلی شدن (CMC) نامیده می شود. در غلظت های بالاتر از CMC سورفکتانت ها هم به طور آزاد در محلول وجود دارند و هم به طور خود به خودی تشکیل میسل می دهند. این مسئله یک تعامل دو گانه است زیرا از یک سو هر جا که خطر شکسته شدن لایه ی مواد فعال سطحی دور قطرات روغن باشد، سورفکتانت های آزاد به صورت امولسیون کننده های یدکی استفاده شده و به ترمیم فصل مشترک کمک می کنند و همین طور وجود میسل ها و سورفکتانت های آزاد باعث افزایش گرانیوی فاز پیوسته و در نتیجه پایداری بیشتر امولسیون می شود. از سوی دیگر در مواردی که یکی از اجزای فاز روغنی محلولیت نسبتا بالایی در فاز پیوسته داشته باشد، میسل های آزاد حاوی آب با لایه ی سطحی نانوامولسیون ها جوش خورده و باعث افزایش سایز ذره ای می شوند. نانوامولسیون ها همانند امولسیون های متداول، سیستم های نیمه پایداری هستند و در طول زمان در اثر فرآیندهای فیزیکوشیمیایی مختلف اعم از تفکیک گرانشی^{۱۳}،

عنوان محصولاتی بی خطر و زیست سازگار شناخته می شوند که تحت تاثیر تغییرات pH مخلوط قرار نمی گیرند [۲۱]. با توجه نتایج بدست آمده از مطالعات گذشته اندازه کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر برای به دست آوردن ویژگی های بهتری نسبت به امولسیون های معمول مناسب تر است [۲۵ و ۲۶]. در نتیجه از بین نمونه های مختلف آنهایی که اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر را داشتند برای ادامه کار انتخاب شدند.

۳-۳- بررسی پایداری اندازه ذرات

نانوامولسیون ها

برای سنجش پایداری نانوحامل ها از چند روش می توان استفاده کرد. از جمله این روش ها اندازه گیری اندازه ذرات بعد از گذشت زمان، اندازه گیری پتانسیل زتا، اندازه گیری میزان رهایش نانوحامل در طول زمان و ارزیابی ظاهر نانوحامل از نظر دوفازه شدن یا تخریب ساختار به هر نحو دیگر با گذشت زمان را می توان نام برد. در بین این موارد اندازه گیری اندازه ذرات رایج تر است. در این پژوهش نیز جهت بررسی پایداری فیزیکی نانوامولسیون های حاوی اسانس مریم گلی از اندازه ذرات در طول زمان استفاده شد.

با توجه به شکل ۱ اندازه ذرات نانوامولسیون ها پس از ۶۰ روز نگهداری پایداری خوبی نشان دادند، به طوری که این افزایش در اندازه ذرات طبیعی در نظر گرفته می شود. همان طوری که ملاحظه می شود، اندازه ذرات تمامی فرمولاسیون ها در طی زمان اختلاف معنی داری نشان داد.

نانو امولسیون های O/W قطرات پراکنده ی روغن در آب هستند که ماهیت آنها ناپایدار است و در واقع انرژی آزاد گیبس طی تشکیل نانو امولسیون مثبت است.

مواد فعال در سطح با کاهش کشش بین سطحی در فصل مشترک آب و روغن باعث کاهش این انرژی شده و کمک به تشکیل نانو امولسیون ها می کنند [۲۷].

¹³ Gravitational Separation

آب دوست-چربی دوست مختلف بر کارایی درون پوشانی نمونه‌ها معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

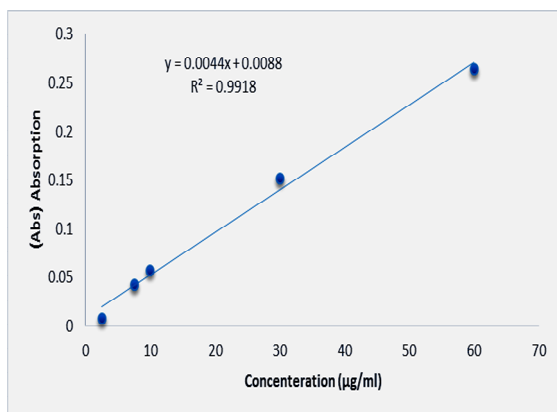


Fig 2 the standard curve to determine the concentration of the essential oil of salvia

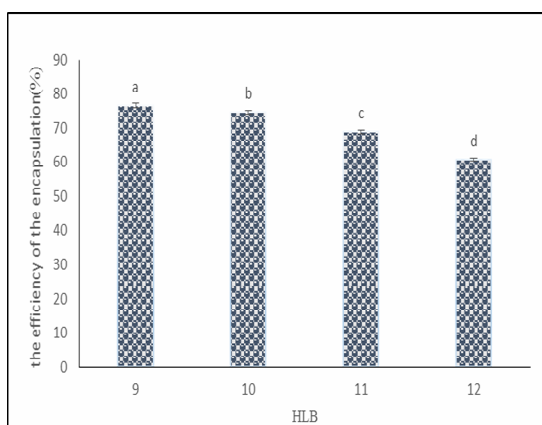


Fig 3 the effect of The efficiency of encapsulation in the hydrophilic-lipophilic balance (different letters indicating the significant differences in the level of 5%)

بیشترین میزان کارایی درون پوشانی مربوط به تیمار با تعادل آب دوست-چربی دوست ۸ که مقدار آن $76/67 \pm 0/65$ درصد بدست آمد و افزایش توپین باعث کاهش کارایی کپسولاسیون گردید و کمترین میزان کارایی مربوط به تیمار با تعادل آب دوست-چربی دوست ۱۲ که مقدار آن به $60/60$ رسید. بنابراین تیمار با تعادل آب دوست-چربی دوست ۹ به عنوان شرایط بهینه کپسولاسیون برای انجام سایر آزمایشات در نظر گرفته شده است.

انبوهش^{۱۴}، ادغام^{۱۵} و رسیدگی استوالد^{۱۶} دچار شکست می‌شوند. در مقایسه با امولسیون‌های متداول، نانوامولسیون‌ها نسبت به پدیده‌های تفکیک گرانشی و انبوهش قطرات، از پایداری بیشتری برخوردار هستند [۲۹]. ولی به علت کوچک بودن اندازه ذراتشان، به شدت مستعد رسیدگی استوالد هستند. یکی از روش‌های حذف رسیدگی استوالد اضافه کردن ترکیباتی است که سرعت انتشار مولکول‌های فاز پراکنده را کاهش می‌دهد. به عنوان مثال در امولسیون‌های O/W که مولکول‌های روغن انحلال پذیری بالایی در فاز آبی دارد اضافه کردن روغن نامحلول در آب به فاز روغنی سرعت انتشار مولکول‌های روغن اصلی را کاهش می‌دهد [۳۰]. در مطالعه حاضر نیز از اسپن ۸۰ و توپین ۸۰ به عنوان سورفکتانت استفاده شد که نتایج نشان داد در تعادل آب دوست-چربی دوست پایین چون میزان اسپن ۸۰ (چربی دوست) بیشتر از توپین ۸۰ (آب دوست) است، لذا سرعت انتشار مولکول‌های فاز پراکنده را بیشتر کاهش می‌دهد در نتیجه کمتر دچار مکانیسم ناپایداری رسیدگی استوالد شده و در طول زمان پایدارتر هستند. در تطابق با پژوهش حاضر دوراته و همکاران (۲۰۱۵)، نانوامولسیونی حاوی اسانس رزماری با استفاده از روش کم انرژی تهیه کردند که به مدت یک ماه پایدار بود به طوری که اندازه نانو ذرات بعد از یک ماه کمتر از 200nm بود [۳۱]. شهاوی و همکاران (۲۰۱۵)، نیز در مطالعه‌ای دیگر از روش امواج فراصوت برای تهیه نانوامولسیون‌های روغن اسانسی میخک استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که نانوامولسیون‌های تهیه شده با شدت 208 W/cm^2 و سیکل $0/75\%$ و زمان 300 ثانیه اندازه متوسط قطر 43nm را نشان دادند که اندازه ذرات بعد از ۶ ماه 100nm بود [۲۱].

۳-۴- کارایی درون پوشانی

درصد درون پوشانی با توجه به منحنی استاندارد اسانس مریم گلی (شکل ۲) محاسبه شد. نتایج مربوط به میزان درون پوشانی فرمولاسیون‌های مختلف در شکل ۳ آورده شده است که در محدوده $60-76\%$ قرار دارند. طبق نتایج اثر تعادل

14. Coalescence
15. Flocculataion
16. Ostwald Ripening

۳-۵- بررسی خاصیت ضد میکروبی

با توجه به نتایج قابل قبول اسانس مریم گلی در از بین بردن باکتری‌های پاتوژن یا عامل فساد مواد غذایی و تمایل به تولید مواد نگهدارنده طبیعی، تلاش برای افزایش اثرات اسانس مریم گلی به شیوه‌های گوناگونی دیده می‌شود. بدین منظور در این مطالعه اثر نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی بر روی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *انترکوکوس فکالیس*، *کلبسیا پنومونیه* و *موراکسلا کاتاهاریس* در مقایسه با اسانس آزاد از طریق تعیین MIC و MBC ارزیابی گردید که نتایج در جدول ۲ آورده شده است.

Table 2 minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of nanoliposome and the essential oil of *Salvia hypoleuca*

Bacteria	MBC (mg/ml)		MIC (mg/ml)	
	Nanoemulsion	Essential oil	Nanoemulsion	Essential oil
<i>Bacillus cereus</i>	625	1250	625	1250
<i>Enterococcus faecalis</i>	625	2500	375.5	1250
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5000	-	1250	10000
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1250	-	1250	5000

اسانس مریم گلی اثرات ضد میکروبی قابل توجهی دارد. *Salvia eremophila* اولین گونه‌ای از جنس *Salvia* است که خواص ضد میکروبی برای آن گزارش شده است، در سال‌های اخیر برخی دیگر از جنس‌های آن نیز مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج ضد میکروبی مشابهی گزارش شدند بخصوص خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی آن‌ها مورد مطالعه‌ی محققین بسیاری قرار گرفته و بطور گسترده‌ای به اثبات رسیده است [۲۰]. در حالت کلی تاثیر اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آن‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت، قدری بیشتر از تاثیر آن‌ها بر روی باکتری‌های گرم منفی است. به عبارت دیگر گرم مثبت‌ها، نسبت به اثر ضد میکروبی اسانس‌ها حساسیت بیشتری نشان دادند [۳۲]. دلیل حساسیت بالای باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی می‌تواند به علت عدم وجود دیواره سلولی لیپو پلی ساکاریدی باشد که این دیواره در باکتری‌های گرم منفی ممکن است از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری به عمل آورد. به

دلیل وجود غشاهای خارجی احاطه کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی منطقی به نظر می‌رسد که این باکتری‌ها در برابر اثرات ضد باکتریایی اسانس‌ها و ترکیبات آن‌ها حساسیت کمتری از خود نشان دهند. غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی، انتشار مواد چربی دوست از میان لایه پوشاننده لیپو پلی ساکاریدی را محدود می‌کند. در باکتری‌های گرم مثبت، تماس مستقیم ترکیبات هیدروفوب اسانس‌ها، با این فسفولیپید دو لایه‌ای صورت می‌گیرد. این محل تماس جایی است که این ترکیبات اثر خود را برجای می‌گذارند. این اثر یا به صورت افزایش نفوذپذیری یون‌ها و یا نشت ترکیبات حیاتی سلول رخ می‌دهد و یا اینکه به صورت ناتوانی سیستم آنزیمی باکتریایی بروز می‌کند [۳۳] میانگین MIC نانوامولسیون و اسانس در سه بار تکرار آزمایش برای باکتری *موراکسلا کاتارالیس* و *کلبسیا پنومونیه* بیشتر از *انترکوکوس فکالیس* و *باسیلوس سرئوس* به دست آمد. بنابراین می‌توان گفت که تاثیر اسانس در دو حالت آزاد و نانوامولسیون در برابر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. همچنین با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان به افزایش خاصیت ضد باکتری نانوامولسیون نسبت به اسانس در محیط *in vitro* پی برد. ریزپوشانی اسانس‌ها در سیستم‌های نانوامولسیون از ۳ جهت باعث افزایش خصلت ضد میکروبی آنها می‌گردد: ۱- این سیستم توانایی انتقال ترکیب آنتی میکروبی از غشا را دارد که در این صورت ترکیب می‌تواند داخل غشا شده و از داخل روی غشا اثر بگذارد. ۲- این سیستم به عنوان حامل عمل می‌کند که می‌تواند غلظت مد نظر از ترکیب را از داخل فاز آبی به میکروارگانیسم برساند. ۳- در سطح غشای باکتری‌ها حفراتی وجود دارد که محل ورود و خروج مواد می‌باشد، هرچه نانوذرات تولیدی کوچکتر باشد راحت‌تر می‌توانند به این حفرات وارد شده و ماده زیست فعال خود را آزاد سازند. نتایج این پژوهش با نتایج قایسن اسکای و همکاران مطابقت داشت به طوری که اوژنول و کارواکرول بعد از انکپسوله شدن در نانوامولسیون خاصیت ضد میکروبی بالاتری از حالت آزاد نشان دادند [۳۲]. انور و همکاران در مطالعه خاصیت ضد میکروبی اسانس و نانوامولسیون اسانس میخک را مورد بررسی قرار دادند که نتایج آن‌ها نیز بالا بودن خاصیت ضد میکروبی اسانس در حالت نانوامولسیون نسبت به اسانس آزاد

- [3] Ultee, A., Bennik, H.J., and Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1561-1568.
- [4] Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., and Yildirim, A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(24): 9452-9458.
- [5] Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3): 223-253.
- [6] Tenore, G. C., Ciampaglia, R., Arnold, N. A., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D., and Senatore, F. 2011. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1): 238-243.
- [7] Rustaiyan, A., and Koussari, S. 1988. Further sesterterpenes from *Salvia hypoleuca*. *Phytochemistry*, 27(6): 1767-1769.
- [8] Saeidnia, S., Ghamarinia, M., Gohari, A. R., and Shakeri, A. 2012. Terpenes from the root of *Salvia hypoleuca* Benth. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1): 1-6.
- [9] Wollenweber, E., Dörr, M., Rustaiyan, A., Roitman, J. N., and Graven, E. H. 1992. Notes: Exudate Flavonoids of Some *Salvia* and a *Trichostema* Species. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 47(9-10): 782-784.
- [10] Zargari, A. 2004. Medicinal plants, Tehran University Publication, Volume 4.
- [11] Paknejadi, M., Foroohi, F., and Yousefzadi, M. 2012. Antimicrobial activities of the essential oils of five *Salvia* species from. *Journal of Paramedical Sciences*, 3(2): 12-18.
- [12] Alizadeh, H., Farzaneh, M., and Azami, Z. 2015. Effects of nano-emulsion of cinnamon oils in decreasing strawberry post-harvest rots. biological control of pestes & plant diseases, 4(1): 57-64.

را نشان داد [۳۳]. مقیمی و همکاران نیز، به منظور افزایش فعالیت ضد میکروبی اسانس آویشن دناهی (*Thymus daenensis*) از نانوامولسیون استفاده کردند. که نتایج نشان داد که افزایش فعالیت ضد میکروبی به علت تقویت فعالیت ضد-باکتری اسانس در حالت انکپسوله شده از طریق افزایش توانایی آن در مختل کردن یکپارچگی غشا سلولی است [۱۷].

۴- نتیجه گیری

مریم گلی از پراکندگی زیادی در سراسر جهان و به طور خاص در منطقه مدیترانه برخوردار است. اسانس آن دارای اثرات بیولوژیکی فراوان میباشد. وجود ترکیبات شیمیایی مختلف به خصوص ۱/۸ سینئول، الفا پینن و بتا پینن در اسانس آن باعث شده در درمان بیماریهای مختلف و همچنین به عنوان نگهدارنده در بسیاری از مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند. نتایج این بررسی بیانگر آن است که با کپسوله کردن اسانس مریم گلی در نانوامولسیون هم می توان اسانس را در برابر تخریب و اکسیداسیون محافظت کرد و هم می توان باعث افزایش غلظت ترکیبات ضد میکروبی در فاز آبی مواد غذایی جایی که میکروارگانیسمها حضور دارند شوند. که این امر باعث می شود که رقت موثره ای کمتری برای کنترل میکروب ملزوم باشد. در نهایت عوارض ناشی از غلظت بالای اسانس در مواد غذایی از جمله کاهش مقبولیت غذا از لحاظ طعم و مزه به حداقل ممکن برسد.

۵- منابع

- [1] Basti, A. A., Misaghi, A., and Khaschabi, D. 2007. Growth response and modelling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *LWT-Food Science and Technology*, 40(6): 973-981.
- [2] Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., and Nychas, G. J. E. 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157: H7. *Italian Journal of Food Science*, 13(1): 65-75.

- treatment. *Food research international*, 44(9): 3039-3046.
- [23] Teeranachaideekul, V., Souto, E. B., Junyaprasert, V. B., and Müller, R. H. 2007. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q 10—Development, physicochemical characterization and in vitro release studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67(1): 141-148.
- [24] Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M., and Bassami, M. R. 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food chemistry*, 120(3): 765-770.
- [25] Shakeel, F. and Ramadan, W. 2010. Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75: 356-362.
- [26] McClements, D. J. and Li, Y. 2010. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159: 213-228.
- [27] Ghosh, A., Mandal, A. K., Sarkar, S., Panda, S. and Das, N. 2009. Nanoencapsulation of quercetin enhances its dietary efficacy in combating arsenic-induced oxidative damage in liver and brain of rats. *Life Sciences*, 84: 75-80.
- [28] Wilkinson, J.B., 1994. *Harry's Cosmeticology*. 7 ed: Longman Scientific and Technical.
- [29] McClements, D. J., and Rao, J. 2011. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(4): 285-330.
- [30] Schramm, L. L. 2006. Emulsions, foams, and suspensions: fundamentals and applications. *John Wiley & Sons*, 215-220.
- [31] Duarte, J. L., Amado, J. R., Oliveira, A. E., Cruz, R. A., Ferreira, A. M., Souto, R. N., and Fernandes, C. P. 2015. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(2): 189-192.
- [32] Morris, J., Khettry, A. and Seitz, E. 1979. Antibacterial activity of aroma chemicals and
- [13] Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., and Ferrari, G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9): 1908-1914.
- [14] Anton, N., and Vandamme, T. F. 2009 The universality of low-energy nano-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, 377(1): 142-147.
- [15] Blanco-Padilla, A., Soto, K. M., Hernández Iturriaga, M., and Mendoza, S. 2014. Food antimicrobials nanocarriers. *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 837215, 11 pages, doi:10.1155/2014/837215.
- [16] Topuz, O. K., Özvural, E. B., Zhao, Q., Huang, Q., Chikindas, M., and Gölükçü, M. 2016. Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens. *Food Chemistry*, 203: 117-123.
- [17] Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., and McClements, D. J. 2016. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food chemistry*, 194: 410-415.
- [18] *European Pharmacopoeia 6.0*. 2008. Determination of essential oils in herbal drugs. 2.8.12: 251–252.
- [19] Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., and Ozkan, H. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food chemistry*, 103(4): 1449-1456.
- [20] Ebrahimabadi, A. H., Mazoochi, A., Kashi, F. J., Djafari-Bidgoli, Z., and Batooli, H. 2010. Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss. from Iran. *Food and chemical toxicology*, 48(5): 1371-1376.
- [21] Shahavi, M. H., Hosseini, M., Jahanshahi, M., Meyer, R. L., and Darzi, G. N. 2015. Evaluation of critical parameters for preparation of stable clove oil nanoemulsion. *Arabian Journal of Chemistry*.
- [22] Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., Alonso, S. D. V., and Chiamoni, N. S. 2011. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat

- Escherichia coli O157: H7 and *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles. *Journal of Food Protection*, 68(12): 2559-2566.
- [35] Anwer, M. K., Jamil, S., Ibnouf, E. O., & Shakeel, F. (2014). Enhanced antibacterial effects of clove essential oil by nanoemulsion. *Journal of oleo science*, 63(4), 347-354.
- essential oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56: 595-603.
- [33] Sandri, I., Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare, A. and Echeverrigaray, S. 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chemistry*, 103: 823-828.
- [34] Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., and Weiss, J. 2005. Growth inhibition of

Nano emulsion formulation from essential oil of *salvia hypoleuca* and investigation of its anti microbial and physicochemical properties

Gharenaghadeh, S.¹, Samadlouie, H. R.^{2*}, Mahmood Sowti³, Saman Gharenaghadeh⁴

1. Masters student, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, shahrood university of technology
2. Assistant Professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, shahrood university of technology
3. Associate Professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, tabriz university
4. PhD student, phytochemistry, shahid beheshti university

(Received: 2016/03/13 Accepted: 2016/05/10)

Second metabolites isolated from salvia spices mostly are terpenoids and flavonoids which are bioactive compounds with high healthy effects. Extractions of these materials by solvent causes chemically unstable and lower healthy effects. Encapsulation of essential oils in a lipid carrier such as nano-emulsion is scientific way to reduce this problem. The aim of this research is encapsulation of essential oil of *salvia hypoleuca* in nano emulsion and investigation of antimicrobial and physicochemical activities of this essential oil. Nano emulsions containing *salvia hypoleuca* essential oil with tween 80 and span 80 as surfactants with different HLB were produced by using high intensity ultrasound. Determination of size, distribution of particle size and physical stability of nano emulsion over time was investigated by using dynamic light scattering (DLS). Also evaluation the antimicrobial properties against gram-positive bacteria (*bacillus cereus* and *enterococcus faecalis*) and gram-negative bacteria (*moraxella catarrhalis* and *klebsiella pneumonia*) microdilution method was used. The results showed that the size and distribution of particle size were in the range of 89-141 and 0/36-0/41 and nano emulsions were stable during 60 days. Anti microbial activities of nano emulsion against all bacteria were better than free essential oils.

Keywords: Salvia essential oil, Nanoemulsion, Ultrasound, Antimicrobial, GC-MS

* Corresponding Author E-Mail Address: hsamadlouie@yahoo.com