

Preparation, characterization, and evaluation of the antimicrobial effects of farnesol- and tyrosol-bearing nanoniosomes on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*

Zohreh Sadat Mortazavi Moghadam¹ , Fahimeh Nemati Mansour¹, Maryam Naseroleslami²,
Neda Mousavi-Niri^{1*} 

¹Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 8 Apr 2023

Accepted: 6 Jun 2023

ePublished: 17 Apr 2024

Keywords:

- Tyrosol
- Antimicrobial
- Wound Infection
- Farnesol
- Nanoniosome

Abstract

Background. Recently, it has been found that tyrosol and farnesol can replace antibiotics due to their known antimicrobial and medicinal effects. Niosomes have been extensively researched for drug delivery during the last few decades, and their efficiency has been proven. The current study aimed to investigate the physical properties and antibacterial effects of niosomes loaded with tyrosol and farnesol.

Methods. Nanoniosomes loaded with farnesol and tyrosol were synthesized by the thin-layer hydration method. The physical properties of nanoformulations were measured using dynamic light scattering and scanning electron microscopy (SEM), and the release of farnesol and tyrosol from the nanocarrier was examined using a dialysis bag. In addition, Fourier-transform infrared spectroscopy was used to check the functional groups, and the stability studies of nanoniosomes were performed at temperatures of 25 °C and 4 °C for two months. Finally, its antimicrobial properties against the bacterial pathogens *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) underwent investigation. The cytotoxicity of free and farnesol- and tyrosol-loaded nanoniosomes on human foreskin fibroblast cells was also evaluated by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide method.

Results. The size of nanoniosomes and farnesol- and tyrosol-loaded nanoniosomes was estimated to be 208 nm and 240 nm, respectively. SEM results indicated the spherical structure of niosomes. The slow release of farnesol and tyrosol from niosomes was observed, so that almost half of the drug was released from nanoniosomes after 72 hours. Nanoniosomes loaded with the above-mentioned drugs demonstrated good stability at 4 °C for 60 days. The results of the minimum inhibitory and bactericidal concentrations confirmed the antibacterial effects of both free farnesol and tyrosol and nanoniosomes loaded with farnesol and tyrosol against all three bacterial species, although these effects were more considerable for the nanoniosomes formulation.

Conclusion. Nanoniosomes loaded with farnesol and tyrosol have the potential to be used in the treatment of some common bacterial wound infections. However, clinical studies are needed in this field.

Practical Implications. Farnesol- and tyrosol-loaded nanoniosomes had strong inhibitory effects on *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*.

How to cite this article: Sadat Mortazavi Moghadam Z, Nemati Mansour F, Naseroleslami M, Mousavi-Niri N. Preparation, characterization, and evaluation of the antimicrobial effects of farnesol- and tyrosol-bearing nanoniosomes on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2024;46(2):175-187. doi: 10.34172/mj.2024.024. Persian.

*Corresponding author; Email: neda.mousaviniri@gmail.com, n.mousavi@iautmu.ac.ir

© 2024 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Background

Microorganisms such as fungi, bacteria, and viruses can cause infectious diseases. Antibiotics have a special place in the treatment of such diseases; however, the emergence of antibiotic-resistant strains in most pathogens has reduced the effectiveness of treatment. Therefore, finding natural compounds with antibacterial effects can be of great importance. The antibacterial effects of tyrosol and farnesol as quorum-sensing compounds have been reported in many studies. Nevertheless, it is highly important to develop new nanoformulations of these compounds due to their sustained and slow release as well as their increasing therapeutic efficacy. Nanoniosomes have attracted the attention of various researchers due to their favorable properties compared to liposomes. Hence, the current study investigated the entrapment of farnesol and tyrosol inside the niosomal nanocarriers and determined physicochemical properties and antibacterial effects of nanoniosomal farnesol-tyrosol on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods

The thin-layer hydration method was used to prepare farnesol- and tyrosol-loaded nanoniosomes. Briefly, cholesterol and spin 60 were dissolved in ethanol, and then 18.2 mg of farnesol and tyrosol were added to the solution and centrifuged. Next, the ethanol was evaporated in a rotary device, and the formed thin film was sonicated. After the synthesis of these nanoformulations, their physicochemical properties, including the dynamic diameter of nanoniosomes, morphology, and functional groups, were studied using dynamic light scattering, scanning electron microscopy (SEM), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) techniques, respectively. After determining the encapsulation percentage of drugs in nanoformulations, drug release was evaluated by the dialysis bag technique during 72 hours (1, 2, 4, 8, 24, 48, and 72 hours). Furthermore, the stability of the prepared samples was evaluated for two months at 25 °C and 4 °C in

terms of size and encapsulation rate. Farnesol- and tyrosol-loaded nanoniosomes' antibacterial effects against *E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa* were examined using the disk diffusion method. In addition, the microdilution method was utilized to determine the minimum inhibition concentration (MIC) in 96-well plates by serial dilution of 1500 µg/mL of samples, and finally, the minimum bactericidal concentration of these nanoformulations was estimated by culturing the contents of the MIC well and the like in the nutrient agar medium. The current study also evaluated the toxicity effect of empty and loaded nanocarriers on human foreskin fibroblast cells by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide method.

Results

The results of the physicochemical evaluation of nanoformulations revealed that the size of the prepared nanoniosomes was 208.3 nm. When these nanoniosomes were loaded with farnesol and tyrosol, their size increased, and the size of nanoniosomes loaded with those compounds was 240.7 nm. The SEM results indicated that the nanoniosomes were spherical and stuck to each other, and their average particle size was 30 nm. The encapsulation efficiency after indirect measurement by the centrifuge method was calculated at 96% and 70% for farnesol and tyrosol, respectively. Both free farnesol and tyrosol showed the highest release at the beginning of the study, so that 84% of free farnesol and 97% of free tyrosol were released into the medium six hours after placing them in the dialysis bag. However, farnesol- and tyrosol-loaded nanoniosomes represented a slow release pattern over time. The release of farnesol and tyrosol from nanoniosomes was 51% and 60% in 24 hours, respectively. However, at later times, both drugs demonstrated slow release, and the release of farnesol and tyrosol from nanoniosomes was 60% and 70%, respectively, within 72 hours. The farnesol- and tyrosol-loaded nanoniosomes also showed a similar pattern (approximately 50% release after 72 hours). The results of FTIR analysis revealed that by adding farnesol to nanoniosomes, the band

related to the C-OH functional group of farnesol binding to the nanoniosomes appeared in the region of 1011 cm^{-1} , which is due to the entry of farnesol into the structure of nanoniosomes and the formation of a link between farnesol and the structure containing nanoniosomes. Based on the results of the antimicrobial effect section, free farnesol and tyrosol had strong effects on *S. aureus*. In addition, farnesol-tyrosol-loaded nanoniosomes inhibited *E. coli*, and free tyrosol had an inhibitory effect on *P. aeruginosa*. Accordingly, farnesol and tyrosol and their nanoniosome formulations are good candidates as antimicrobials, but more studies are still needed in this regard. Tyrosol has an antibacterial effect against *S. aureus* and most likely represents antimicrobial activity on *S. aureus*, *E. coli*, and *Candida albicans*.

Conclusion

The optimal physical properties, effective antimicrobial effects, and low toxicity of farnesol- and tyrosol-loaded nanoniosomes make them suitable candidates for the treatment of some common bacterial wound infections. Our results confirmed that farnesol and tyrosol and their nanoniosomes had inhibitory effects on *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* in vitro. Nevertheless, more studies are required on laboratory animals in in vivo conditions by creating an infectious wound model. Therefore, farnesol and tyrosol and their nanoniosome formulations are useful drug candidates as antimicrobial agents.

تهیه، تعیین خصوصیات و بررسی اثر ضد میکروبی نانونیوزوم‌های حاوی فارنسول و تیروزول بر گونه‌های میکروبی *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*

زهرا سادات مرتضوی مقدم^۱، فهیمه نعمتی منصور^۱، مریم ناصر الاسلامی^۲، ندا موسوی نیری^{۱*}

^۱ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۲ گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

زمینه. اخیراً، مشخص شده‌است که تیروزول و فارنسول به‌واسطه داشتن اثرات ضد میکروبی و دارویی شناخته‌شده می‌توانند جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها شوند. در طی چند دهه اخیر، تحقیقات گسترده‌ای روی نانونیوزوم‌ها جهت داروسازی انجام شده و کارایی آن‌ها به اثبات رسیده است. هدف از این مطالعه بررسی خصوصیات فیزیکی و تأثیرات ضد باکتریایی فارنسول و تیروزول بارگیری‌شده در نانونیوزوم‌ها بود. **روش کار.** فارنسول و تیروزول بارگیری‌شده در نانوحامل نیوزومی به روش هیدراتاسیون لایه نازک سنتز شد. خصوصیات فیزیکی نانوفرمولاسیون‌ها با استفاده از تکنیک پراکنش نور دینامیک (DLS) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) سنجش شد و روند آزادسازی فارنسول و تیروزول از نانوحامل با استفاده از کیسه دیالیز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، از طیف‌سنج مادون قرمز برای بررسی گروه‌های عامل استفاده و مطالعات پایداری نانونیوزوم‌ها در دماهای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ماه انجام شد. در نهایت، خواص ضد میکروبی آن علیه پاتوژن‌های باکتریایی *E. coli*، *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* مطالعه شد. اثر سمیت نانو حامل‌ها در حالت خالی و بارگیری شده روی سلول‌های HFF توسط روش MTT مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها. اندازه نانونیوزوم‌ها ۲۰۸ و اندازه نانونیوزوم‌های بارگیری شده با فارنسول و تیروزول ۲۴۰ نانومتر برآورد گردید. نتایج SEM حاکی از کروی بودن ساختار نیوزوم‌ها بود. رهش کند فارنسول و تیروزول از نیوزوم‌ها مشاهده شد، به طوری که بعد از ۷۲ ساعت تقریباً نیمی از دارو از نیوزوم‌ها آزادسازی شده بودند. نانونیوزوم‌های بارگیری شده با داروهای فوق‌الذکر پایداری مناسبی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ روز نشان دادند. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و باکتری‌کشی، حاکی از اثرات ضد باکتریایی هردوی فارنسول و تیروزول آزاد و نانونیوزوم‌های بارگیری شده با فارنسول و تیروزول علیه هر سه گونه باکتریایی بود؛ هرچند این تأثیرات در حالت نانونیوزومه بهتر بود.

نتیجه‌گیری. نانو حامل نیوزومی حاوی فارنسول و تیروزول پتانسیل کاربرد در درمان برخی عفونت‌های رایج زخم باکتریایی را دارد. با این وجود، به مطالعات بیشتر در این زمینه نیاز هست.

پیامدهای عملی. نانونیوزوم‌های بارگیری شده با فارنسول و تیروزول نسبتاً اثرات مهارکنندگی قوی علیه *S. aureus*، *E. coli* و *P. aeruginosa* دارند.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۲/۱/۱۹
پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۱۶
انتشار برخط: ۱۴۰۳/۱/۲۹

کلیدواژه‌ها:

- تیروزول
- ضد میکروبی
- عفونت زخم
- فارنسول
- نانونیوزوم

مقدمه

انتروباکتریاسه است^۲ که در عفونت زخم با تشکیل چرک، در محل زخم حضور دارند.^۳ باکتری *Staphylococcus aureus* نیز یک پاتوژن عمده‌ی انسانی و گرم مثبت است^۴ که شایع‌ترین باکتری در ایجاد عفونت زخم می‌باشد.^۵ باکتری *Pseudomonas aeruginosa*، باکتری گرم منفی و پاتوژن انسانی فرصت‌طلب

از مهمترین میکروارگانیسم‌هایی که منجر به ایجاد عفونت زخم می‌شوند می‌توان به اشرشیاکلای، استافیلوکوکوس و سودوموناس آئروژینوزا اشاره کرد.^۱ *Escherichia coli* یک باکتری گرم منفی، اکسیداز منفی و میله‌ای شکل از خانواده‌ی

*نویسنده مسؤل؛ ایمیل: n.mousavi@iautmu.ac.ir, neda.mousaviniri@gmail.com

است.^{۱۹} فرمولاسیون ضد میکروبی‌ها در نانوفرم‌ها و سیستم‌های مختلف، کارایی و انتقال انتخابی آن‌ها به عفونت‌های خارج سلولی و درون سلولی و همچنین فعالیت آنتی‌بیوفیلی آن‌ها را در مقایسه با داروی آزاد افزایش داده است.^{۲۰} لیپوزوم‌ها نمونه‌ای از این نانو سیستم‌ها هستند. آن‌ها وزیکول‌های کوچکی هستند که از دولایه (های) فسفولیپیدی ساخته شده‌اند که یک محیط آبی داخلی را در بر می‌گیرد. لیپوزوم‌ها می‌توانند ترکیبات ضد میکروبی را محصور کنند و کارایی آن‌ها را توسط همجوشی با غشای سلولی میکروبی افزایش دهند. لیپوزوم‌ها در رساندن آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر داروهای درمانی به سلول‌ها و بیوفیل‌های مختلف باکتریایی مؤثر هستند. با این حال، ناپایداری فیزیکی و شیمیایی آن‌ها یک مشکل عمده است که مانع از کاربرد گسترده آن‌ها می‌شود.^{۲۱}

به همین نحو، نیوزوم‌ها ساختارهای دولایه‌ای هستند که از سورفکتانت‌های غیر یونی ساخته شده‌اند و در داخل بدن مانند لیپوزوم‌ها رفتار می‌کنند. با این حال، آن‌ها پایدارتر، زیست تخریب‌پذیر، زیست سازگار و غیر ایمنی‌زا با سمیت کم هستند و نیاز به هیچ شرایط خاصی برای جابجایی و نگهداری ندارند. بنابراین، آن‌ها بر مشکلات مرتبط با آماده‌سازی لیپوزومی غلبه می‌کنند. همچنین، در مطالعاتی فرمولاسیون نیوزومی سنتز شده فعالیت چندین عامل ضد میکروبی را بهبود داده است.^{۲۲}

بنابراین، با توجه به ارجحیت نانونیوزوم‌ها، مطالعه حاضر با هدف سنتز نیوزوم‌های بارگذاری شده با تیروزول و فانسول، ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی آن‌ها و اثرات ضد میکروبی این نانوفرمولاسیون‌ها علیه پاتوژن‌های *S. aureus*، *E. coli* و *P. aeruginosa* انجام شد.

روش کار

برای سنتز نیوزوم‌ها از روش هیدراتاسیون فیلم نازک استفاده شد. به‌طور خلاصه، کلسترول و اسپین ۶۰ در نسبت ۱:۱ (هرکدام ۳۶/۴ میلی‌گرم) در اتانول ۹۶ درصد حل شد. سپس، فانسول و تیروزول در نسبت ۵/۰ (هرکدام ۱۸/۲ میلی‌گرم) حل گردید و در سرعت ۸۵۰۰ دور دقیقه به مدت یک ساعت هموژنیزه شد. در گام بعدی، محلول به دستگاه روتاری متصل شد تا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد اتانول آن تبخیر گردد. فیلم نازک تشکیل شده به‌منظور کاهش اندازه ذرات، سونیکه شد. نیوزوم‌های تهیه‌شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت مطالعات شناسایی نگهداری شدند. اندازه‌گیری قطر دینامیکی نانو ذرات با استفاده از دستگاه زتاسایزر و با فرمول زیر محاسبه شد.

$$PDI^r = \frac{MW^2}{Mn^3}$$

است که باعث عفونت‌های حاد و مزمن تهدیدکننده به‌ویژه در بیماران با سیستم ایمنی ضعیف می‌شود.^۶ درمان این عفونت‌ها با تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها صورت می‌پذیرد.^۷ با این حال، بعلت ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک تمایل به جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها با سایر داروها با منشاء طبیعی بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است. نشان داده شده است که مهارکننده‌های QS (Quorum Sensing Inhibitors, QSI) به‌طور بالقوه می‌توانند عفونت‌های ناشی از باکتری‌ها را درمان کنند. با اهمیت‌ترین پروکاریوت‌هایی که QSI تولید می‌کنند احتمالاً آن‌هایی هستند که عموماً ایمن در نظر گرفته می‌شوند. در میان یوکاریوت‌ها، برخی از لگوم‌ها و گیاهان دارویی نیز احتمالاً به‌عنوان QSI عمل می‌کنند. چنین یافته‌هایی می‌تواند در درمان مؤثر و کاهش دوز آنتی‌بیوتیک‌های رایج کمک‌کننده باشند.^۸ در واقع، پاتوژن‌ها در درجه اول بیان ژن‌های بیماری‌زایی را با استفاده از سیستم‌های QS کنترل می‌کنند. مهار این سیستم‌ها توسط ترکیبات QSI^۹ به‌عنوان یک درمان ضد میکروبی جایگزین علیه قارچ‌ها و باکتری‌های مقاوم به چند دارو با اثرات آنتی‌بیوفیلیم شناخته شده‌اند.^{۱۰}

تیروزول و فانسول مولکول‌های (Quorum-Sensing, QS) هستند که عملکرد آن‌ها در مورفوژن و تشکیل بیوفیلیم *Candida albicans* به‌تفصیل در مقالات مختلف برجسته شده است.^{۱۱} فانسول یک محصول متابولیسی مسیر سنتزی موالونات/استرول در یوکاریوت‌ها است.^{۱۲} وبر و همکاران، نشان دادند که فانسول تولیدشده در محل توسط کشت‌های پلانکتونی *C. albicans*، تشکیل بیوفیلیم را مهار می‌کند.^{۱۳} انباشته شدن فانسول برای جلوگیری از تغییر مورفولوژیک از مخمر به شکل هیف در تراکم سلولی بالا،^{۱۴} نشان می‌دهد که پاتوژن‌ز کاندیدا ممکن است توسط فانسول کاهش یابد.^{۱۴} برخلاف فانسول، تیروزول در تسریع‌گذار مورفولوژیکی از فرم مخمری به هیف نقش دارد.^{۱۵} علاوه بر نقش‌های محوری فوق‌الذکر، مولکول‌های QS به‌طور برون‌زا به‌عنوان عوامل ضد میکروبی علیه چندین پاتوژن قارچی و باکتریایی از جمله *C. albicans*، *Streptococcus mutans*، *P. aeruginosa*، *Pseudogymnoascus destructans*، *S. epidermidis* و *Paracoccidioides brasiliensis* مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند.^{۱۶-۱۸} از این رو، این دو ترکیب به‌عنوان QS پتانسیل کاربرد در درمان انواعی از عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک دارند. توسعه ضد میکروبی‌های جدید علیه عفونت‌های عفونت‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو به‌فوریّت مورد نیاز است. اخیراً پیشرفت‌ها در زمینه نانو تکنولوژی ابزار امیدوارکننده‌ای برای افزایش فعالیت و ایمنی عوامل ضد میکروبی موجود فراهم کرده

رقیق‌سازی در میکروپلیت انجام شد. نیوزوم حاوی فارنسول و تیروزول و فارنسول و تیروزول آزاد در غلظت‌های ۱۵۰۰، ۷۵۰، ۳۷۵، ۱۸۷/۵، ۹۳/۷۵، ۴۶/۸۸، ۲۳/۴۴ و ۱۱/۷۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه و در پلیت‌های ۹۶ چاهکی حاوی ۹۵ میکرولیتر از محیط مولر هینتون برات و ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی ریخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از نیوزوم حاوی فارنسول و تیروزول و فارنسول و تیروزول آزاد به چاهک اول هر میکروارگانیسم افزوده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های سایر نمونه‌ها به داخل ۷ چاهک بعدی منتقل شد. حجم نهایی در تمامی چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر که بر روی شیکر به مدت ۶۰ ثانیه با دور ۱۰۰ rpm مخلوط و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. رشد میکروبی در طول موج ۶۲۰ nm خوانش شد. چاهک حاوی آنتی‌بیوتیک ایمپینم به‌عنوان کنترل مثبت و چاهک فاقد هر گونه تیمار به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. تمامی آزمایشات ۳ بار تکرار و درصد Viability (درصد زنده ماندن سلولی) بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\times 100 \text{ (میانگین جذب نوری کنترل/میانگین جذب نوری تست)} = \text{درصد زنده ماندن سلولی}$$

بدین منظور از آزمون MTT استفاده شد. به‌طور خلاصه، تعداد 10^5 سلول HFF به همراه محیط کشت (کامل) به هر چاهک پلیت ۹۶ تایی اضافه و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محلول‌هایی با غلظت‌های تهیه‌شده از فرمولاسیون‌های مختلف دارویی ۱۵۰۰، ۷۵۰، ۳۷۵، ۱۸۷/۵ و ۹۳/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر حفره افزوده شد. به‌منظور صحت تکرارپذیری داده‌ها برای هر غلظت حداقل سه چاهک در نظر گرفته شد. پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت انکوباسیون، رنگ MTT به هر حفره اضافه و ۴ ساعت انکوبه شد. سپس کریستال‌های فورمازان در $100 \mu\text{l}$ حلال DMSO حل و در نهایت میزان جذب (OD) توسط دستگاه ELISA plate reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایشات ۳ بار تکرار و درصد Viability (درصد زنده ماندن سلولی) بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\times 100 \text{ (میانگین جذب نوری کنترل/میانگین جذب نوری تست)} = \text{درصد زنده ماندن سلولی}$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها بعد از اطمینان از توزیع نرمال با استفاده از تجزیه واریانس یک‌راهه و دوره‌ها در نرم‌افزار GraphPad Prism V.8 انجام شد. $P < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

در ابتدا، سوسپانسیون نانوذره تهیه، در آب دیونیزه به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق گردید. یک قطره از نمونه روی یک فیلم هادی نظیر آلومینیوم پخش و در دمای اتاق خشک گردید.

نمونه حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۴۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و داروی آزاد از خلال منافذ فیلتر عبور و روی فیلتر نیوزوم حاوی دارو قرار گرفت. جذب نمونه عبور کرده از فیلتر خوانده شد و با استفاده از منحنی کالیبراسیون مقدار داروی آزاد محاسبه و از مقدار اولیه داروی مورد استفاده در نمونه، کم و از روی آن میزان درصد کارایی محصورسازی محاسبه شد.

$$\text{Entrapment Efficiency (\%)} = \left(\frac{C_t - C_f}{C_t} \right) \times 100$$

در مورد فرمول بالا Ct مقدار کل دارو و Cf مقدار داروی

رهش یافته می‌باشد.

حلال فازگیرنده (محلول بافر فسفات) به همراه نمونه‌ها را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حجم ۲ میلی‌لیتر در داخل کیسه‌ها ریخته و دو طرف غشا بسته شد. هریک از نمونه‌ها درون ۵۰ میلی‌لیتر محیط بافر فسفات سوسپانسیون و بر روی استیر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در طی ۸ ساعت اول در زمان‌های ۱، ۲، ۴ و ۸ ساعت، به میزان ۱ میلی‌لیتر برداشته و به همان اندازه، توسط محیط آزادسازی تازه و هم‌دما، جایگزین شد. در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نمونه‌برداری انجام و تا رسیدن به سطح پلاتو ادامه پیدا کرد و جذب خوانده شد و در نهایت نمودار درصد آزادسازی تجمعی فارنسول و تیروزول از نیوزوم در طی ۷۲ ساعت رسم شد.

جهت مطالعه و بررسی گروه‌های عامل در فرمولاسیون، از تکنیک FTIR استفاده شد. این دستگاه بر اساس ارتعاش پیوندهای مولکولی در پاسخ به نور مادون‌قرمز و ثبت انرژی پیوندها عمل می‌کند. هر گروه عاملی در یک فرکانس مخصوص، جذب نور مادون‌قرمز داشته و بنابراین وجود و عدم وجود یک یا چند گروه عاملی خاص در یک ترکیب را مشخص می‌کند. در این تکنیک، ابتدا با استفاده از دستگاه پرس نمونه‌ها به‌صورت قرص شفاف در ترکیب با برمید پتاسیم تهیه و طیف‌های آن با استفاده از دستگاه FTIR مطالعه شد.

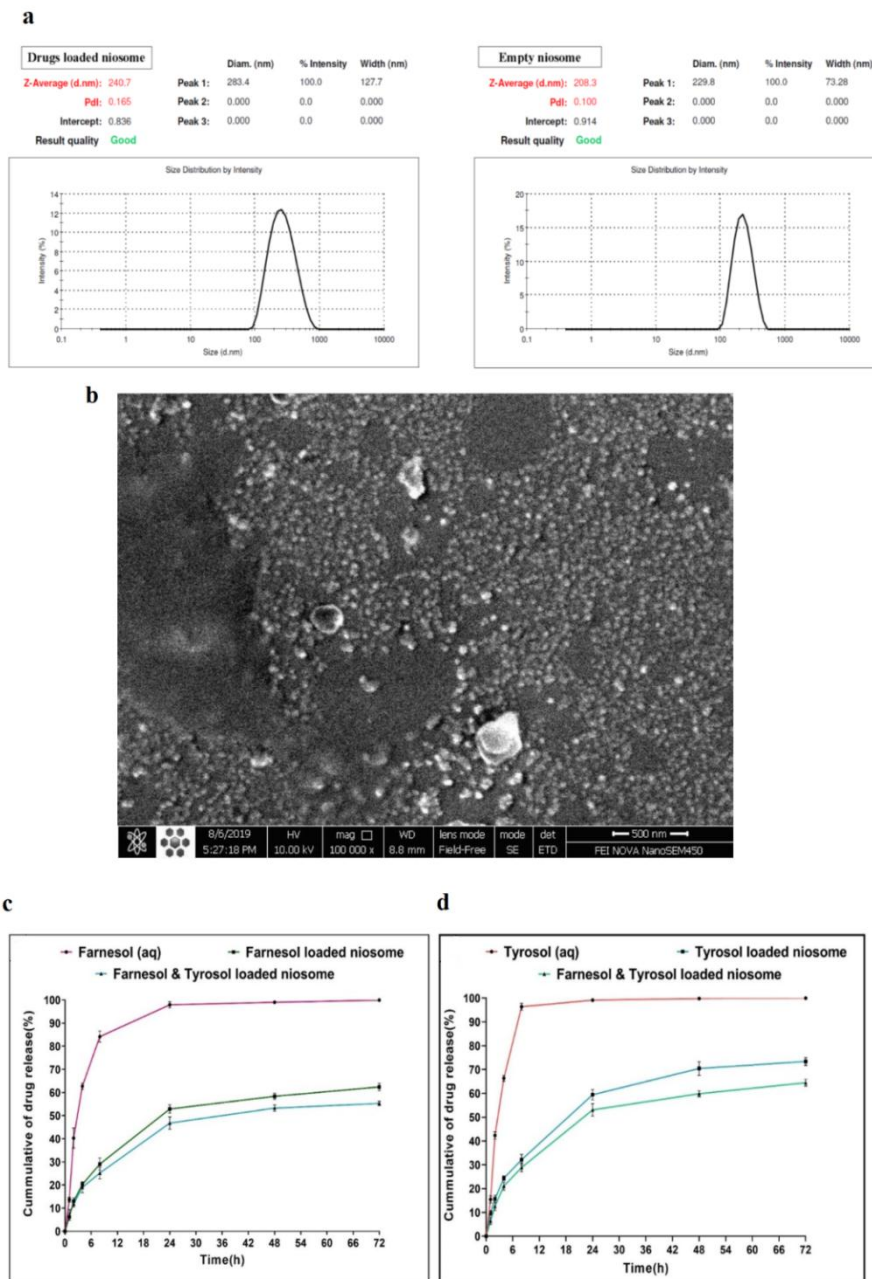
پایداری نمونه‌های تهیه‌شده به مدت ۲ ماه در دمای اتاق و دمای یخچال از لحاظ سایز و میزان انکپسولاسیون مورد مطالعه قرار گرفت.

ابتدا میکروارگانیسم‌های استاندارد (*S. aureus* ATCC 6538، *P. aeruginosa* ATCC 27853، *E. coli* ATCC 25922) تهیه شدند. آزمایش MIC بر اساس استاندارد CLSI به روش

یافته‌ها

تیروزول بارگیری شدند، بر اندازه آن‌ها افزوده شد و اندازه نانونیوزوم‌های بارگیری شده با فارنسول و تیروزول ۲۴۰/۷ نانومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۱-a سمت چپ). نتایج SEM حاکی از کروی بودن نانونیوزوم‌ها بود که به یکدیگر چسبیده و میانگین اندازه ذرات آن‌ها ۳۰ نانومتر برآورد گردید (شکل ۱-b).

همان‌طور که ذکر شد برای تعیین خصوصیات فیزیکی نانونیوزوم‌های بارگیری شده با فارنسول و تیروزول از تکنیک‌های SEM و DLS بهره گرفته شد و تصاویر آن در شکل ۱ نشان داده شده است. اندازه نانونیوزوم‌ها تهیه شده ۲۰۸/۳ نانومتر برآورد شد (شکل ۱-a سمت راست). زمانی که این نانونیوزوم‌ها با فارنسول و

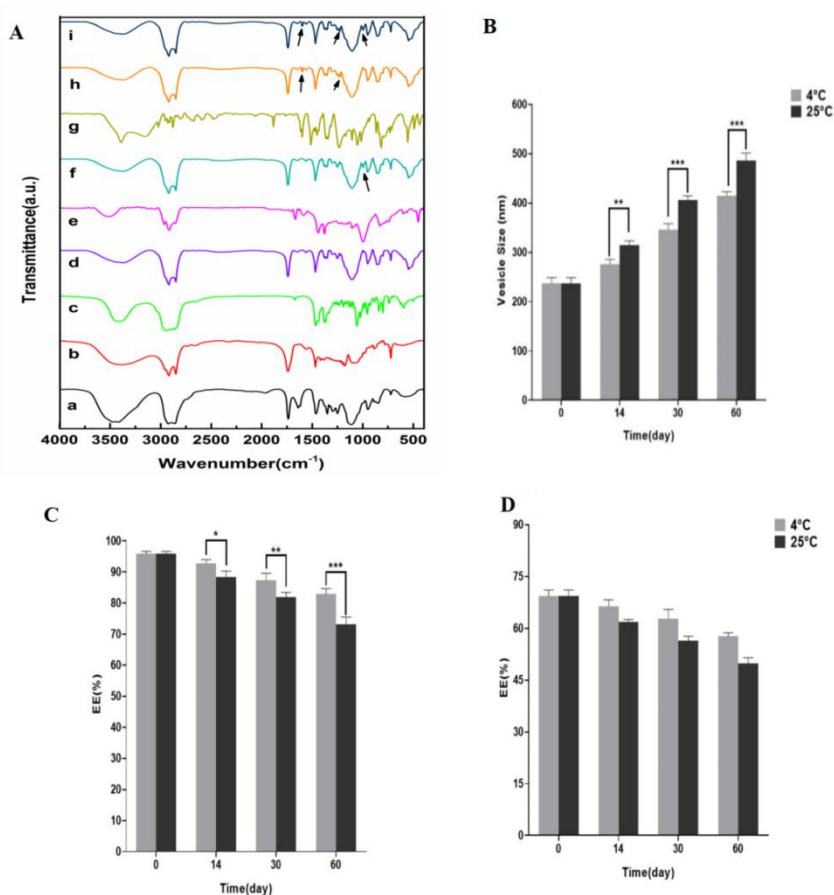


شکل ۱. اندازه نانونیوزوم‌ها (a، راست) و نانونیوزوم‌های بارگیری شده با فارنسول و تیروزول (a، چپ) و تصویر میکروسکوپ الکترونی روشی از نانونیوزوم‌های بارگیری شده با فارنسول و تیروزول (b). کنتیک رهش فارنسول آزاد، نیوزوم‌های بارگیری شده با فارنسول و نیوزوم‌های بارگیری شده با فارنسول و تیروزول (c) و کنتیک رهش تیروزول آزاد، نیوزوم‌های بارگیری شده با تیروزول و نیوزوم‌های بارگیری شده با فارنسول و تیروزول (d)

الگوی مشابهی را نشان دادند و رهش تقریباً ۵۰ درصدی بعد از ۷۲ ساعت را نشان دادند (شکل ۱).

با افزودن فARNسول به نیوزوم، نوار مربوط به گروه عاملی C-OH فARNسول جهت اتصال به نیوزوم در ناحیه 1011 cm^{-1} ظاهر شد که به دلیل ورود فARNسول در ساختار نیوزوم و تشکیل پیوند بین فARNسول و ساختار حاوی نیوزوم است. با افزودن تیروزول به نیوزوم پیوندهای مربوط به ساختار تیروزول ظاهر و نوار مربوط به پیوند C-O در ناحیه 1230 cm^{-1} و نوار مربوط به پیوند C=C در ناحیه 1599 cm^{-1} ظاهر گشتند که این مشاهدات می‌توانند دلیلی برای حضور تیروزول در نیوزوم باشند. همچنین، با افزودن همزمان فARNسول و تیروزول به نیوزوم مجدداً نوارهای مربوط به پیوندهای فARNسول و تیروزول ظاهر شدند. در تیروزول، نوارهای مربوط به پیوندهای C-O و C=C به ترتیب در نواحی 1228 cm^{-1} و 1597 cm^{-1} و در فARNسول، نوار مربوط به پیوند C-OH در ناحیه 1010 cm^{-1} ظاهر گشتند (شکل ۲-A).

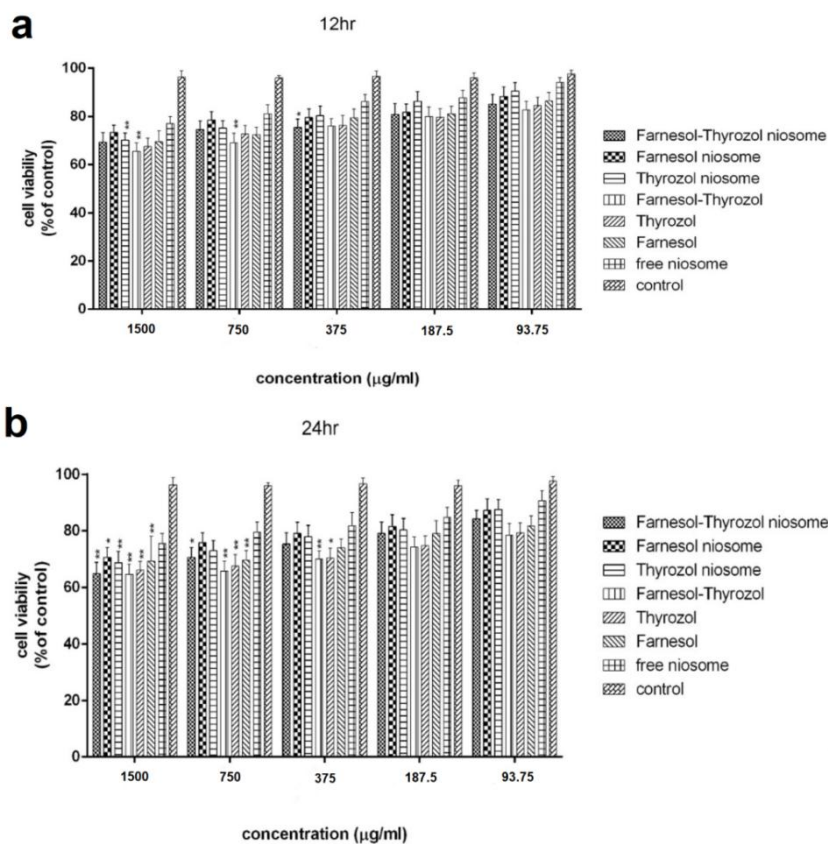
میزان کارایی محصورسازی بعد از سنجش غیرمستقیم به روش سانتیفریژ برای هر یک از دو داروی فARNسول و تیروزول به ترتیب ۹۶٪ و ۷۰٪ محاسبه شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد، هردوی فARNسول و تیروزول آزاد بیشترین رهش را در ابتدای مطالعه نشان دادند، به‌طوری‌که ۶ ساعت بعد از قرار دادن آن‌ها در کیسه دیالیز، ۸۴ درصد فARNسول آزاد و ۹۷ درصد تیروزول آزاد به محیط رهاسازی شدند. با این وجود، نیوزوم‌های بارگیری شده با فARNسول، نیوزوم‌های بارگیری شده با تیروزول و نیوزوم‌های بارگیری شده با هردوی فARNسول و تیروزول الگوی رهش کندی را با گذشت زمان نشان دادند (شکل ۱). رهش فARNسول از نیوزوم‌ها ۵۱ درصد و تیروزول از نیوزوم‌ها ۶۰ درصد، در مدت‌زمان ۲۴ ساعت بود. با این وجود، در زمان‌های بعدی هر دو دارو رهش کندی را نشان دادند و رهش فARNسول و تیروزول از نیوزوم‌ها در مدت‌زمان ۷۲ ساعت به ترتیب ۶۰٪ و ۷۰٪ درصد گزارش شد. نیوزوم‌های بارگیری شده با فARNسول و تیروزول نیز



شکل ۲. پیک FTIR حاصل از نانونیوزوم‌های بارگیری شده با فARNسول و تیروزول (A) و پایداری اندازه نانونیوزوم‌ها (B)، تغییرات کارایی محصورسازی فARNسول (C) و تیروزول (D) در دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در طول ۶۰ روز

جدول ۱. قطر هاله عدم رشد، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) نانونیوزوم‌های بارگیری شده با فارنسول و تیروزول علیه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

Nanoniosomes	Tyrosol Nanoniosomes	Farnesol Nanoniosomes	Farnesol and Tyrosol	Farnesol and Tyrosol Nanoniosomes	Tyrosol	Farnesol	عوامل ضد میکروبی
							باکتری‌ها
Zone of inhibition diameter (mm)							
۰	۰	۰	۲۶	۲۸	۱۸	۱۷	<i>S. aureus</i>
۰	۱۱	۱۲	۱۴	۱۹	۱۱	۱۱	<i>E. coli</i>
۰	۱۰	۱۰	۱۵	۱۶	۱۵	۱۳	<i>P. aeruginosa</i>
MIC (µg/mL)							
-	-	-	۴۶	۲۳	۱۸۷	۹۳	<i>S. aureus</i>
-	۷۵۰	۳۷۵	۱۸۷	۹۳	۷۵۰	۷۵۰	<i>E. coli</i>
-	۳۷۵	-	۱۸۷	۱۸۷	۳۷۵	۱۸۷	<i>P. aeruginosa</i>
MBC (µg/mL)							
-	-	-	۱۸۷	۴۶	۳۷۵	۱۸۷	<i>S. aureus</i>
-	۷۵۰	۳۷۵	۱۸۷	۹۳	۷۵۰	۱۵۰۰	<i>E. coli</i>
-	۷۵۰	-	۱۸۷	۱۸۷	۳۷۵	۳۷۵	<i>P. aeruginosa</i>



شکل ۳. اثر فرمولاسیون‌های نانونیوزومی بارگیری شده با فارنسول و تیروزول روی زنده‌مانی سلول‌های لاین HFF ۱۲ (a) و ۲۴ (b) ساعت بعد از تیمار

بیوفیلیم مخمر *C. albicans* تأثیر می‌گذارد.^{۲۶} فارنسول به‌طور طبیعی در اسانس‌های مرکبات یافت می‌شود و نشان داده شده است که فاقد اثرات سمی و غیر جهش‌زا در شرایط *in vitro* و *in vivo* است.^{۲۷} قرار گرفتن در معرض فارنزول به‌طور قابل‌توجهی بر سرعت سنتز گلوکان در *S. mutans*، پلی ساکارید اصلی در ماتریکس بیوفیلیم تأثیر گذاشت و در نتیجه تجمع و زیست‌توده بیوفیلیم‌ها را کاهش داد.^{۲۷} پلی ساکاریدها یک ریزمحیط منحصربه‌فرد برای رشد، متابولیسم و بقای ارگانیسما فراهم می‌کنند.^{۲۷} بنابراین، مهار تشکیل و تجمع جوامع بیوفیلیم با تأثیر بر سنتز پلی‌ساکاریدها، راه جذابی برای پیشگیری از عفونت‌های مرتبط با بیوفیلیم است. عواملی که خواص غشای سلولی را مختل می‌کنند ممکن است سنتز گلوکان را نیز تحت تأثیر قرار دهند و در نتیجه تجمع و زیست‌توده بیوفیلیم‌ها را کاهش دهند.^{۲۷} در مطالعه حاضر نیز فارنسول به‌تنهایی یا نیوزوم‌های حاوی فارنسول و تیروزول اثرات ضد میکروبی علیه پاتوژن‌ها نشان دادند که می‌تواند ناشی از تأثیر این ترکیب بر غشاء پلاسمایی و اختلال در عملکرد آن باشد. ماهیت آب‌گریز فارنسول باعث تجمع آن در غشا می‌شود و احتمالاً باعث نشت غشا می‌شود. در واقع، اخیراً نشان داده شده است که قرار گرفتن در معرض الکل‌های ترین بر غشای سلولی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و لیستریا مونوسیوتوزنتز تأثیر می‌گذارد و منجر به نشت یون‌های K^+ از سلول‌ها می‌شود.^{۲۸}

بعلت اثرگذاری فارنسول بر غشاء بیان شده است که این ترکیب می‌تواند حساسیت سویه‌های مقاوم را نسبت به آنتی‌بیوتیک افزایش دهد. جابریک و همکاران، نشان داده‌اند که حساسیت آنتی‌بیوتیکی در استافیلوکوکوس اورئوس در حضور فارنزول افزایش یافت.^{۲۹} آن‌ها این اثر هم‌افزایی را به عمل نفوذپذیری غشایی احتمالی فارنزول مرتبط کردند که متعاقباً حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌ها را افزایش می‌دهد. در واقع، بسیاری از ترکیباتی که قادر به افزایش حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند، ممکن است دارای اثر نفوذپذیری غشای خارجی باشند.^{۳۰}

نتایج MIC مربوط به باکتری‌ها نشان داد که فارنسول و تیروزول آزاد بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، فارنسول و تیروزول به‌صورت توأماً بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، فارنسول نیوزومه و تیروزول نیوزومه بر روی باکتری اشرشیا کلی، فارنسول و تیروزول به‌صورت توأماً در حالت نانونیوزومه بر باکتری اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس بهترین اثر را داشت. بنابراین فارنسول و تیروزول و نانونیوزوم حاوی فارنسول و

نتایج این بخش حاکی از این بود که با گذشت زمان، بر اندازه ذرات نانونیوزوم‌ها ذخیره‌شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با ۴ درجه سانتی‌گراد افزوده می‌شود. جالب اینکه، افزایش دو برابری اندازه نانونیوزوم‌ها پس از ۶۰ روز ذخیره‌سازی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با روز ۰ مشاهده شد (شکل ۲-b). در مورد هر دو نانونیوزوم‌های بارگیری شده با فارنسول و تیروزول، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منجر به کاهش کمتر درصد بارگیری این داروها با گذشت زمان شد (شکل ۲-C و ۲-D). بنابراین، ذخیره‌سازی این نانونیوزوم‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد توصیه می‌گردد. در تست MIC، غلظت‌های مختلف فارنسول و تیروزول و نیوزوم‌های حاوی فارنسول و تیروزول و نیوزوم فارنسول و تیروزول بررسی و نتایج نشان داد (جدول ۱) فارنسول و تیروزول آزاد بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، فارنسول و تیروزول به‌صورت توأماً بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، فارنسول نیوزومه و تیروزول نیوزومه بر روی باکتری اشرشیا کلی، فارنسول و تیروزول به‌صورت توأماً در حالت نانونیوزومه بر باکتری اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس بهترین اثر را داشت.

تیمار سلول‌های HFF در غلظت‌های مختلف (۹۳/۷۵، ۱۸۷/۵، ۳۷۵، ۷۵۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت انکوباسیون، با استفاده از روش MTT انجام شد. بر اساس شکل ۳-a، درصد زنده ماندن سلولی سلول‌ها در بالاترین غلظت (۱۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$) به مدت ۱۲ ساعت ۶۵/۵۵ درصد برای فارنسول-تیروزول و بر اساس شکل ۳-b، در زمان ۲۴ ساعت، ۶۴/۵۰ درصد برای نانونیوزوم فارنسول-تیروزول است و نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری دارد.

بحث

مقاومت میکروبی، به آنتی‌بیوتیک‌های موجود، یک نگرانی عمده است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان حیوانات به ظهور گسترده سویه‌های مقاوم به گزینه‌های درمانی موجود کمک کرده است.^{۳۱} این بحث در مورد کلیه پاتوژن‌های مطالعه شده در پژوهش حاضر صادق بود که در آن تقریباً همه ایزوله‌ها به چند دارو مقاوم هستند. چیزی که این وضعیت را بدتر می‌کند، میزان بالای کشف‌شده مقاومت به وانکوماپسین (۵۶٪) است که در آن وانکوماپسین داروی انتخابی برای درمان MRSA است.^{۳۲} همچنین، بیشتر جدایه‌های جمع‌آوری‌شده بیوفیلیم تشکیل می‌دهند که مشکل درمان را پیچیده‌تر می‌کند.^{۳۳} در میان QS که اخیراً شناسایی شده‌اند، سزکوی‌ترین الکل فارنزول است که نشان داده شده است که بر مورفوژن و تشکیل

زیست‌فناوری، دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران انجام شده است. از تمام اعضای هیئت‌علمی و کارشناسان شاغل در پژوهش کمال قدردانی را داریم.

مشارکت پدیدآوران

زهره سادات مرتضوی مقدم اجرای پژوهش، ندا موسوی نیری طراح و راهنمای پژوهش، فهیمه نعمتی منصور راهنمای دوم و مشاور پژوهش، مریم ناصر الاسلامی در طراحی مطالعه مشارکت داشتند و نسخه‌ی نهایی را تأیید و بازبینی نموده‌اند.

منابع مالی

منابع مالی ویژه‌ای وجود ندارد.

دسترس‌پذیری داده‌ها

داده‌های ایجادشده در مطالعه فعلی در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارائه می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

برای این مطالعه، کد اخلاق با شماره‌ی IR.IAU.PS.REC.1399.099 از سوی کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران دریافت شده است.

تعارض منافع

مؤلفان اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تألیف یا انتشار این مقاله وجود ندارند.

References

1. Vindenes H, Bjerknes R. Microbial colonization of large wounds. *Burns*. 1995;21(8):575-9. doi: 10.1016/0305-4179(95)00047-f
2. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(4):822-80. doi: 10.1128/cmr.00022-13
3. Kelly MJ. Wound infection: a controlled clinical and experimental demonstration of synergy between aerobic (*Escherichia coli*) and anaerobic (*Bacteroides fragilis*) bacteria. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. 1980;62(1):52. doi: 10.1016/s0022-3468(80)80322-8
4. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(3):603-61. doi: 10.1128/cmr.00134-14
5. Upreti N, Rayamajhee B, Sherchan SP, Choudhari MK, Banjara MR. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, multidrug resistant and extended spectrum β -lactamase producing gram negative bacilli causing wound infections at a tertiary care hospital of Nepal. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2018;7(1):121. doi: 10.1186/s13756-018-0408-z

تیروزول توأماً کاندید دارویی خوبی برای داروهای ضد میکروبی هستند ولی همچنان بررسی‌های بیشتری مورد نیاز است. مدینه و همکاران نیز نشان دادند هیدروکسی تیروزول و تیروزول دارای فعالیت ضد باکتریایی در برابر عوامل بیماری‌زای مورد آزمایش در مواد غذایی از جمله استافیلوکوکوس اورئوس هستند. فارنسول توانایی مهار تشکیل بیوفیلم توسط استافیلوکوکوس اورئوس را نشان داد. در مطالعه حاضر فارنسول و تیروزول اثر ضد میکروبی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارد که با مطالب اشاره‌شده در فوق مطابقت دارد. مطالعات زیادی تأثیر مهاری فارنسول را بر رشد چندین باکتری را تأیید نموده که حاکی از استفاده بالقوه فارنسول به‌عنوان یک ماده‌ی کمکی در درمان ضد قارچ و تقویت مقاومت ضد میکروبی است.^{۳۱}

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتیجه‌گیری می‌شود که فارنسول و تیروزول و نانونیوزوم‌های آن‌ها در شرایط *in vitro* می‌تواند خواص ضد میکروبی مؤثری داشته باشد. با این وجود، نیازمند مطالعات بیشتر در شرایط *in vivo* بر روی حیوان آزمایشگاهی می‌باشد که با ایجاد مدل زخم عفونی باید مورد بررسی قرار گیرد. بنابراین فارنسول و تیروزول و نانونیوزوم فارنسول و تیروزول کاندید دارویی خوبی برای داروهای ضد میکروبی هستند.

قدردانی‌ها

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه نویسنده اول می‌باشد که به راهنمایی نویسنده دوم و چهارم و همکاری نویسنده سوم انجام پذیرفته است. همچنین این پژوهش جهت دریافت مدرک کارشناسی ارشد در رشته‌ی زیست‌فناوری میکروبی، گروه

6. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:39. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039
7. Machowska A, Stålsby Lundborg C. Drivers of irrational use of antibiotics in Europe. *International journal of environmental research and public health*. 2019;16(1):27. doi: 10.3390/ijerph16010027
8. Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances*. 2013;31(2):224-45. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.10.004
9. Brackman G, Coenye T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Current pharmaceutical design*. 2015;21(1):5-11. doi: 10.2174/1381612820666140905114627
10. Padder SA, Prasad R, Shah AH. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiological Research*. 2018;210:51-8. doi: 10.1016/j.micres.2018.03.007
11. Wongsuk T, Pumeesat P, Luplertlop N. Fungal quorum sensing molecules: role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *Journal of basic microbiology*. 2016;56(5):440-7. doi: 10.1002/jobm.201500759
12. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and environmental microbiology*. 2001;67(7):2982-92. doi: 10.1128/aem.67.7.2982-2992.2001
13. Weber K, Sohr R, Schulz B, Fleischhacker M, Ruhnke M. Secretion of E, E-farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(5):1859-61. doi: 10.1128/aac.01646-07
14. Décanis N, Tazi N, Correia A, Vilanova M, Rouabhia M. Farnesol, a fungal quorum-sensing molecule triggers *Candida albicans* morphological changes by downregulating the expression of different secreted aspartyl proteinase genes. *Open Microbiol J*. 2011;5:119-26. doi: 10.2174/1874285801105010119
15. Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, Douglas LJ. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic cell*. 2006;5(10):1770-9. doi: 10.1128/ec.00219-06
16. Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem ACB, Barbosa DB. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling*. 2016;32(3):329-38. doi: 10.1080/08927014.2016.1144053
17. Hassan Abdel-Rhman S, Mostafa El-Mahdy A, El-Mowafy M. Effect of tyrosol and farnesol on virulence and antibiotic resistance of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BioMed Research International*. 2015;11:2015. doi: 10.1155/2015/456463
18. Raudabaugh DB, Miller AN. Effect of trans, trans-farnesol on *Pseudogymnoascus destructans* and several closely related species. *Mycopathologia*. 2015;180(5):325-32. doi: 10.1007/s11046-015-9921-2
19. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2019;8(1):1-10. doi: 10.1186/s13756-019-0533-3
20. Pinto RM, Lopes-de-Campos D, Martins MCL, Van Dijk P, Nunes C, Reis S. Impact of nanosystems in *Staphylococcus aureus* biofilms treatment. *FEMS Microbiology Reviews*. 2019;43(6):622-41. doi: 10.1093/femsre/fuz021
21. Gao W, Chen Y, Zhang Y, Zhang Q, Zhang L. Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2018;127:46-57. doi: 10.1016/j.addr.2017.09.015
22. Gharbavi M, Amani J, Kheiri-Manjili H, Danafar H, Sharafi A. Niosome: a promising nanocarrier for natural drug delivery through blood-brain barrier. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*. 2018;2018:15. doi: 10.1155/2018/6847971
23. Boovaragamoorthy GM, Anbazhagan M, Piruthiviraj P, Pugazhendhi A, Kumar SS, Al-Dhabi NA, et al. Clinically important microbial diversity and its antibiotic resistance pattern towards various drugs. *Journal of Infection and Public Health*. 2019;12(6):783-8. doi: 10.1016/j.jiph.2019.08.008
24. Al-Amery K, Elhariri M, Elsayed A, El-Moghazy G, Elhelw R, El-Mahallawy H, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from camel meat and slaughterhouse workers in Egypt. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2019;8(1):1-8. doi: 10.1186/s13756-019-0585-4
25. Saeed A, Ahsan F, Nawaz M, Iqbal K, Rehman KU, Ijaz T. Incidence of vancomycin resistant phenotype of the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a tertiary care hospital in Lahore. *Antibiotics*. 2019;9(1):3. doi: 10.3390/antibiotics9010003
26. Lee ST, Kim JY, Chu K, Jeong SW, Han SY, Kim M, et al. HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes sensorimotor recovery, suppressing acute inflammatory reaction after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2004;35(7):1744-9.
27. Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52(5):782-9. doi: 10.1093/jac/dkg449

28. Inoue Y, Shiraishi A, Hada T, Hirose K, Hamashima H, Shimada J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*. 2004;237(2):325-31. doi: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09714.x
29. Jabra-Rizk M, Meiller T, James C, Shirliff M. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(4):1463-9. doi: 10.1128/aac.50.4.1463-1469.2006
30. Alakomi H-L, Paananen A, Suihko M-L, Helander I, Saarela M. Weakening effect of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodeterioration. *Applied and environmental microbiology*. 2006;72(7):4695-703. doi: 10.1128/aem.00142-06
31. Medina E, Brenes M, García A, Romero C, De Castro A. Bactericidal activity of glutaraldehyde-like compounds from olive products. *Journal of food protection*. 2009 Dec 1;72(12):2611-4. doi: 10.4315/0362-028X-72.12.2611