Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Antifungal effects of various extracts from three *Artemisia* species against dermatophytosis fungal agents

Ali Mikaeili[1], Samira Ghasemi[2], Shadi Salmani[3], Masoud Modarresi[4], Mahdi Mojarrab[5]*

ABSTRACT

Background and Aims: Dermatophytosis is one of the most important superficial infections in humans and animals worldwide. *Artemisia* species, as rich resources of natural products, have a high potential to treat many human diseases. The present study was conducted to investigate the antifungal effects of various extracts from three *Artemisia* species against dermatophyte fungi**.**

Materials and Methods: For *in vitro* study, aerial parts of *Artemisia aucheri*, *Artemisia turcomanica*, and *Artemisia kopetdaghensis* were extracted using five different solvents: petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol, and hydro ethanol (50%), and were screened for their anti-dermatophytic effects against *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton verrucosum*, and *Microsporum canis*. Afterward, the minimum inhibitory concentration (MIC) assay was performed according to the agar dilution method. The most active extracts were subjected to preliminary phytochemical studies.

Results: In the first screening of the extracts (concentration of 2 mg/ml), *E. flucosum* with no growth in the culture medium containing 13 extracts out of 15 was the most sensitive, and *T. rubrum* with no growth in 7 extracts from 15, including petroleum ether extracts obtained from *A. aucheri*, dichloromethane, ethylacetate and hydroethanolic extract obtained from *A. turcomanica* treatment; petroleum ether, ethylacetate and hydroethanolic obtained from *A. kopetdaghensis* treatment showed the highest resistance to the extracts. In the MIC results, the tested fungi were sensitive to all or some of the concentrations (ranging from 61.9 to 1981.1µg/ml). The lowest MIC value (61.9 µg/ml) was recorded for petroleum ether extract derived from *A. turcomanica* against *E. floccosum*. The preliminary phytochemical research results showed the presence of terpenoids and sterols in these extracts.

Conclusion: Some lipophilic components of the various extracts, especially petroleum ether extracts from *A. aucheri*, *A. turcomanica*, and *A. kopetdaghensis*, have *in vitro* anti-dermatophytic effects.

Keywords: *Artemisia species*, Dermatophytosis, Minimum inhibitory concentration, Sterols

Citation: Mikaeili A, Ghasemi S, Salmani Sh, Modarresi M, Mojarrab M. [Antifungal activity of various extracts from three Artemisia species against dermatophytosis fungal agents]. J Birjand Univ Med Sci. 2023; 30(1): 33-43. [Persian]

DOI http://doi.org/10.

Received: December 31, 2022 **Accepted:** March 1, 2023

[1] Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
[2] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kurdistan University, Sanandaj, Iran
[3] Students Research Committee, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
[4] Department of Pharmacognosy & Pharmaceutical Biotechnology Kermanshash University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
[5] Pharmaceutical Sciences Research Center, Research Institute for Health, University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

***Corresponding author:** Pharmaceutical Sciences Research Center, Research Institute for Health, University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
E-mail: mmojarrab@kums.ac.ir Fax: 08334276493 Tel: 08334276479

مقاله اصیل پژوهشی

اثرات ضد قارچی عصاره¬های حاصل از سه گونه درمنه (آرتمیزیا) علیه قارچ¬های عامل درماتوفیتوزیس

علی میکائیلی [۱]، سمیرا قاسمی [۲]، شادی سلمانی [۳]، مسعود مدرسی [۴]، مهدی مجرب [۵*]

چکیده

زمینه و هدف: درماتوفیتوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری¬های جلدی انسان و حیوانات در سراسر جهان است. گونه¬های مختلف درمنه (آرتیمیزیا) به‌عنوان یک منبع غنی از ترکیبات طبیعی پتانسیل بالایی برای درمان بسیاری از انواع بیماری¬های انسانی دارد. این پژوهش با هدف بررسی اثرات ضد قارچی عصاره¬های مختلف سه گونه درمنه علیه قارچ¬های درماتوفیت انجام شده است.

روش تحقیق: در این مطالعه آزمایشگاهی برون تنی، اندام¬های هوایی سه گونه درمنه کوهی، درمنه ترکمنی و درمنه کپه داغی با استفاده از پنج حلال اتر نفت، دی کلرومتان، اتیل استات، اتانول و هیدرواتانول (۵۰٪) عصاره¬گیری و عصاره¬های حاصل برای اثرات ضد درماتوفیتی علیه اپیدرموفیتون فلوکوزوم، تریکوفیتون وروکوزوم، تریکوفیتون روبروم و میکروسپوروم کانیس غربال¬گری شدند. سپس آزمایش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) براساس روش رقیق‌سازی در آگار انجام شد. فعال¬ترین عصاره¬ها در مطالعات مقدماتی فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در غربالگری اولیه عصاره¬ها (غلظت ۲ میلی گرم/میلی‌لیتر)، اپیدرموفیتون فلوکوزوم با عدم رشد در محیط کشت حاوی ۱۳ عصاره از ۱۵ بیشترین حساسیت و تریکوفیتون روبروم با عدم رشد در ۷ عصاره از ۱۵ شامل عصاره¬های اترنفتی حاصل از درمنه کوهی؛ اترنفتی، دی کلرومتانی، اتیل استاتی و هیدرواتانولی حاصل از درمنه ترکمنی؛ و اترنفتی، اتیل استاتی و هیدرواتانولی حاصل از درمنه کپه داغی بیشترین مقاومت به عصاره¬ها را نشان دادند. در نتایج MIC قارچ¬های آزمایش‌شده به همه یا تعدادی از غلظت‌های عصاره‌ها در طیف غلظتی ۶۱/۹ تا ۱۹۸۱/۱ (میکروگرم/میلی‌لیتر) حساس بودند. از مجموع عصاره¬های بکار رفته، کمترین میزان غلظت بازدارنده ۶۱/۹ (میکروگرم/میلی‌لیتر) برای عصاره اتر نفتی حاصل از درمنه ترکمنی علیه تریکوفیتون وروکوزوم ثبت شد. نتایج مطالعات مقدماتی فیتوشیمیایی، حضور ترپنوییدها و استرول¬ها را در این عصاره¬ها نشان داد.

نتیجه‌گیری: برخی اجزاء چربی دوست موجود در عصاره¬های مختلف به‌ویژه عصاره¬های اتر نفتی درمنه ترکمنی، درمنه کوهی و درمنه کپه داغی فعالیت برون تنی ضد درماتوفیتی دارند.

واژه‌های کلیدی: گونه‌های درمنه، درماتوفیتوزیس، حداقل غلظت بازدارندگی، استرول‌ها

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۲؛ ۳۰(۱): ۳۳-۴۳.

دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۰ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰

[۱] گروه قارچ شناسی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

[۲] گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج ، ایران

[۳] کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

[۴] گروه فارماکوگنوزی و بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

[۵] مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

آدرس: کرمانشاه- دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه- مرکز تحقیقات علوم دارویی

تلفن: ۰۸۳۳۴۲۷۶۴۷۹ نمابر: ۰۸۳۳۴۲۷۶۴۹۳ پست الکترونیکی: mmojarrab@kums.ac.ir

مقدمه

درماتوفیتوزیس یکی از مهم‌ترین عفونت‌های پوستی انسان و حیوانات در سراسر جهان است. این بیماری عفونت قارچی پوست، مو و ناخن می‌باشد که در نتیجه استقرار قارچ‌هایی موسوم به درماتوفیت بین نسوج کراتین‌دار، تکثیر و ترشح متابولیت‌های آن‌ها حاصل می گردد. اصولاً علائم بیماری به دلیل حمله مستقیم قارچ به بافت نیست، بلکه قارچ‌های بیمارگر با تولید متابولیت‌های ثانویه، آنزیم‌های ترشحی و سموم موجب تجزیه بافت‌های کراتینه شده و سبب آسیب به آن‌ها می‌گردند. رایج‌ترین گونه‌های درماتوفیت بیمارگر شامل *تریکوفیتون روبروم*[1]، *تریکوفیتون وروکوزوم*[2]، *اپیدرموفیتون فلوکوزوم*[3] و *میکروسپوروم کانیس*[4] هستند (۱). درمان درماتوفیتوزیس به دلیل تأثیر مستقیم این بیماری بر ظاهر انسان، بسیار با اهمیت است. برای درمان آن از داروهای گروه آلیل آمین مانند تربینافین و آزول‌های مختلف نظیر ایتراکونازول، فلوکونازول و اخیراً وریکونازول اشاره کرد (۲). طی سال‌های اخیر در ایران جهت درمان اشکال بالینی درماتوفیتوزیس از داروی گریزئوفولین استفاده می‌شد؛ اما به‌دلیل عوارض جانبی متعدد دارو از جمله سردرد، تهوع، سرگیجه و دوره طولانی مصرف، محدودیت‌هایی در استفاده از آن به‌وجود آمده است (۳). علاوه بر موارد ذکر شده، به دلیل اثرگذاری محدود، عوارض جانبی متعدد، گران بودن و مقاومت درماتوفیت‌ها به داروهای مصرفی، جستجوی روش‌های درمانی جایگزین مانند استفاده از فرآورده‌های گیاهی–طبیعی برای مقابله با قارچ‌های درماتوفیت بسیار حائز اهمیت است.

گونه‌های مختلف درمنه[5] یکی از شناخته شده‌ترین گیاهان در حوزه طب سنتی می‌باشند (تصویر ۱). درمنه گیاه چندساله متعلق به خانواده Asteraceae است که در این خانواده طیفی از گونه‌های گیاهان دارای ترکیبات مختلف آروماتیک و دارویی قرار دارند (۴). در حدود ۴۰۰ گونه درمنه در جهان یافت می‌شود که قاره آسیا از نظر فراوانی بیشترین تعداد این گونه‌ها را به خود اختصاص داده است (۵). این جنس در ایران نزدیک به ۳۴ گونه دارد، پراکندگی جغرافیایی آن در ایران بسیار گسترده است و از دشت‌های پست تا ارتفاعات کوهستانی می‌رویند. این دسته از گیاهان طیفی از ترکیبات زیستی ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد التهابی و ضد قارچی متعلق به گروه‌های مختلف شامل فنل‌ها، ترپنوئیدها، استرول‌ها و پلی استیلن‌ها را تولید می‌کنند. از قدیم الایام عصاره قسمت‌های مختف این گیاهان به‌طور سنتی در درمان تب، تومورها، مالاریا و هپاتیت در کره و چین استفاده می‌گردید (۶). پژوهشگران مختلف گزارش کرده‌اند که عصاره درمنه دارای اثرات ضد میکروبی علیه بیمارگرهای مختلف انسانی هستند. Rolta و همکاران در سال ۲۰۲۱ عنوان نمودند که عصاره‌های اتر نفتی و متانولی *Artemisia annua* (درمنه خزری) ترکیب شده با آنتی بیوتیک‌های ضد قارچی و ضد باکتریایی، چهار تا ده مرتبه نسبت به کاربرد آنتی بیوتیک‌ها به تنهایی، دارای اثرات ضد میکروبی قوی‌تری علیه میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها همچون *استافیلوکوکوس آرئوس*، *ساکارومایسس سرویزیه*، *اشرشیاکلی* و *کاندیدا آلبیکانس* هستند (۷). همچنین گزارش شده است که عصاره و اسانس *Artemisia sieberi* (درمنه دشتی) و *Artemisia aucheri* (درمنه کوهی) دارای اثر ضد درماتوفیتی علیه *تریکوفیتون روبروم* هستند (۸).

با توجه به پتانسیل بالای گونه‌های درمنه در درمان بیماری‌های مختلف، پراکندگی جغرافیایی وسیع این گونه‌ها در ایران و عدم بررسی اثرات ضد میکروبی تمامی گونه‌های این گیاه در ایران غربالگری گونه‌های مختلف درمنه جهت بررسی اثرات ضدمیکروبی آن‌ها علیه درماتوفیت‌های رایج ایجاد کننده درماتوفیتوزیس حائز اهمیت است. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی اثرات ضد قارچی عصاره‌های سه گونه درمنه شامل درمنه کوهی (*A. aucheri*)، درمنه کپه داغی (*Artemisia kopedaghensis*) و درمنه ترکمنی (*Artemisia turcomanica*) استخراج شده با پنج حلال اترنفت، اتانول، هیدرواتانول (۱:۱)، دی‌کلرومتان و اتیل استات علیه چهار قارچ عامل درماتوفیتوزیس شامل *میکروسپوروم کانیس*، *تریکوفیتون وروکوزوم*، *تریکوفیتون روبروم* و *اپیدرموفیتون فلوکوزوم* انجام شده است.

[1] *Trichophyton rubrum*
[2] *Trichophyton verrucosum*
[3] *Epidermophyton floccosum*
[4] *Microsporum canis*
[5] *Artemisia* sp.

تصویر ۱- جنس درمنه (*Artemisia* sp.)

روش تحقیق

تهیه جدایه‌های قارچی و محیط کشت

این مطالعه آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۸ در گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد. ابتدا سه قارچ *میکروسپوروم کانیس*، *تریکوفیتون وروکوزوم* و *تریکوفیتون روبروم* از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری‌های صنعتی ایران، وابسته به سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران تهیه گردیدند. قارچ *اپیدرموفیتون فلوکوزوم* از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه قارچشناسی کلینیک مهدیه دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه جداسازی شد. قارچهای فوق روی محیط کشت سابورو دکستروزآگار حاوی کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید (SCC، شرکت مرک، آلمان) به مدت ۱۴ روز در دمای ۲±۲۵ سانتی‌گراد کشت شدند. بعد از طی زمان مذکور، از اسپور غیر جنسی به‌دست آمده از کشت هریک از قارچها سوسپانسیون(10^6 تعداد کلنی/میلی‌لیتر) تهیه گردید.

تهیه گونه‌های گیاهی

درمنه کوهی [1] (کد هرباریوم ۱۲۵۷۱) از منطقه چهار باغ استان گلستان جمع‌آوری شد و به تأیید مرکز تحقیقات جنگل‌ها و منابع طبیعی استان گلستان رسید. درمنه کپه داغی [2] (کد هرباریوم ۱۲۵۷۳) از منطقه بابا امان بجنورد، خراسان شمالی و درمنه ترکمنی [3] (کد هرباریوم ۲۳۸۳) از منطقه‌ای در نزدیکی شهرآباد، بجنورد خراسان شمالی تهیه و توسط مرکز تحقیقات جنگل‌ها و منابع طبیعی تهران تأیید شدند.

عصاره‌گیری

برای استخراج عصاره‌ها از روش خیساندن یا ماسراسیون استفاده شد. بدین منظور اندام هوایی گیاهان تهیه شده پس از جمع‌آوری، حذف ضایعات گیاه و خشک کردن، پودر شده و در جای خنک نگهداری شدند. ۱۰۰ گرم از پودر هر گیاه، به نسبت یک به ده (وزنی : حجمی) با حلال‌های اتر نفت، دی کلرومتان، اتیل استات، اتانول و هیدرواتانول (۱:۱) مخلوط شدند. هر یک از این مخلوط‌ها به صورت جداگانه به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. بعد از جداسازی عصاره‌ها با دستگاه روتاری (Heidolph، آلمان)، در دمای حمام آب گرم ۴۰ سانتی‌گراد خشک شدند. سپس پانزده عصاره‌خشک شده، حاصل تا انجام مراحل بعدی، در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند (۹).

بررسی اثرات ضدقارچی به روش اختلاط با محیط کشت

به منظور غربالگری اولیه، عصاره‌های گیاهی در دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل و سپس با محیط SCC [4] مذاب استریل مخلوط شدند تا غلظت نهایی (۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) برای هر عصاره تهیه شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور غیر جنسی هر قارچ (10^6 تعداد کلنی/میلی‌لیتر) روی محیط کشت مخلوط با عصاره یا شاهد تلقیح و لوله‌ها در دمای ۲±۲۵ سانتی‌گراد به مدت ۱۴ روز نگهداری شدند. اثرات ضد قارچی هر عصاره با مشاهده مهار کامل رشد قارچها ارزیابی شد (۱۰).

[1] *Artemisia aucheri*
[2] *Artemisia kopetdaghensis*
[3] *Artemisia turcomanica*
[4] Sabouraud Cycloheximide Chloramphenicol Agar

بررسی حداقل غلظت بازدارندگی[1] (MIC)

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌ها با روش رقیق‌سازی در آگار مطابق روش Gonelimali و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام شد (۱۱). بدین منظور برای سه قارچ *تریکوفیتون وروکوزوم، تریکوفیتون روبروم و میکروسپوروم کانیس* غلظت نهایی هر عصاره در محیط کشت بین ۱۹۸۱~ ۶۱/۹ (میکروگرم/میلی‌لیتر) تعیین شد (غلظت مناسب برای رشد این قارچ‌ها محیط کشت حاوی حداکثر ۵ درصد DMSO در کل محیط کشت می باشد). برای *اپیدرموفیتون فلوکوزوم* غلظت‌های ۱۲۰۰~ ۳۷/۵۶ میکروگرم/میلی‌لیتر (غلظت مناسب برای رشد این قارچ‌ها محیط کشت حاوی حداکثر سه درصد DMSO در کل محیط کشت می باشد) در نظر گرفته شد (۱۲). حداقل غلظت بازدارندگی بعد از دوره ۱۴ روزه و نگهداری در دمای ۲±۲۵ سانتی‌گراد با مشاهده عدم رشد قارچ‌ها تعیین گردید. از DMSO (۵۰ میکرولیتر/میلی‌لیتر) و تربینافین (۰/۰۰۳۹ ~ ۲ میکرولیتر/میلی‌لیتر) به ترتیب به عنوان شاهد منفی و مثبت استفاده گردید. آزمایش فوق برای تمامی تیمارها و شاهدها در سه تکرار انجام شد. همچنین به ازاء هر قارچ، سه محیط کشت خالص در سه لوله آزمایش، جهت کنترل صحت رشد قارچ‌ها بر روی محیط کشت SCC، تهیه شد.

غربالگری فیتوشیمیایی اولیه

عصاره‌های اتر نفتی از نظر فیتوشیمیایی برای تعیین وجود ترپنوئیدها، استرول‌ها و فلاونوئیدها طبق روش‌های استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ردیابی استرول‌ها

برای این منظور از واکنش Liebermann–Burchard استفاده شد. دو میلی‌لیتر انیدرید استیک و دو قطره اسید سولفوریک غلیظ به سه میلی‌لیتر از عصاره محلول در کلروفرم اضافه شد. تشکیل رنگ آبی یا سبز نشان دهنده وجود استروئیدها بود (۱۳).

ردیابی ترپنوئیدها

حدود ۰/۲گرم از هر عصاره در شش میلی‌لیتر کلروفرم حل و صاف شد. سپس اسید سولفوریک غلیظ به فیلتر اضافه شد تا یک لایه تشکیل شود. ایجاد رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز در حد فاصل دو فاز، برای حضور ترپنوئیدها مثبت در نظر گرفته شد (۱۴).

ردیابی فلاونوئیدها

حدود ۰/۲ گرم از هر عصاره در دو میلی لیتر اتانول حل، حرارت داده و صاف شد. یک تراشه از فلز منیزیم به مخلوط اضافه و سپس چند قطره اسید کلریدریک غلیظ به آن اضافه شد. ایجاد رنگ قرمز یا نارنجی نشان دهنده وجود فلاونوئیدها بود (۱۵).

مطالعه حاضر پس از تأیید شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه با کد IR-kums.REC.1397.634 انجام شد.

یافته‌ها

به منظور غربالگری اولیه، اثرات بازدارندگی ۱۵ عصاره حاصل از اندام‌های هوایی سه گونه درمنه کوهی، درمنه ترکمنی و درمنه کپه داغی به روش اختلاط با محیط کشت در غلظت (۲ میلی-گرم/میلی‌لیتر) علیه چهار قارچ *اپیدرموفیتون فلوکوزوم، تریکوفیتون روبروم، میکروسپوروم کانیس و تریکوفیتون وروکوزوم* مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، *اپیدرموفیتون فلوکوزوم* با عدم رشد در محیط کشت حاوی ۱۳ عصاره از ۱۵ (رشد در عصاره اتانولی و هیدرواتانولی حاصل از درمنه کوهی) بیشترین حساسیت و *تریکوفیتون روبروم* با عدم رشد در هفت عصاره شامل عصاره‌های اترنفتی حاصل از درمنه کوهی؛ اترنفتی، دی کلرومتانی، اتیل استاتی و هیدرواتانولی حاصل از درمنه ترکمنی؛ و اترنفتی، اتیل استاتی و هیدرواتانولی حاصل از درمنه کپه داغی بیشترین مقاومت به عصاره‌ها را نشان دادند. عصاره‌های اتر نفتی حاصل از همه گونه‌ها علیه هر چهار قارچ درماتوفیت فعالیت بازدارندگی داشتند. عصاره‌های اتانولی و هیدرواتانولی حاصل از درمنه کوهی علیه *میکروسپوروم کانیس* و عصاره درمنه کپه داغی و

[1] Minimum inhibitory concentration

درمنه ترکمنی نیز اثر بازدارندگی از رشد *اپیدرموفیتون فلوکوزوم* نشان دادند. عصاره‌های اتانولی هر سه گونه درمنه فاقد اثر بازدارندگی علیه *تریکوفیتون روبروم* بودند.

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی نشان داد (جدول ۲) که همه قارچ‌های آزمایش‌شده به همه یا تعدادی از غلظت‌های عصاره‌های به‌کار رفته در این آزمایش در طیف غلظتی ۶۱/۹ تا ۱۹۸۱/۱ (میکروگرم/میلی‌لیتر) حساس بودند، بطوریکه رشد آنها به طور کامل توسط عصاره‌ها مهار شد. برای درمنه کوهی حداقل غلظت بازدارنده مربوط به عصاره اتر نفتی در غلظت ۱۵۰ (میکروگرم/میلی‌لیتر) علیه *تریکوفیتون وروکوزوم* بود. برای درمنه ترکمنی حداقل غلظت بازدارنده به میزان ۶۱/۹ (میکروگرم/میلی‌لیتر) مربوط به عصاره اتر نفتی علیه *اپیدرموفیتون فلوکوزوم* ثبت گردید. برای درمنه کپه داغی حداقل غلظت بازدارنده مربوط به عصاره اتر نفتی به میزان ۱۲۳/۸۱ (میکروگرم/میلی‌لیتر) علیه *اپیدرموفیتون فلوکوزوم* ثبت شد.

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، در غربالگری فیتوشیمیایی اولیه عصاره اتر نفتی، استرول‌ها و ترپنوئیدها ردیابیگردیدند.

جدول ۱- نتایج غربالگری اولیه اثر بازدارندگی عصاره‌های حاصل از گونه‌های مختلف درمنه در غلظت ۲ (میلی‌گرم/میلی‌لیتر) علیه چهار قارچ عامل درماتوفیتوزیس

نام گیاه	عصاره	بازده استحصال عصاره (٪)	جدایه قارچی			
			اپیدرموفیتون فلوکوزوم	تریکوفیتون روبروم	میکروسپوروم کانیس	تریکوفیتون وروکوزوم
درمنه کوهی	اترنفتی	۱/۱	−	−	−	−
	دی کلرومتان	۴/۴۶	−	+	−	−
	اتیل استاتی	۰/۴۵	−	+	−	−
	اتانولی	۵/۵۸	+	+	−	+
	هیدرواتانولی	۹/۲۱	+	+	−	+
درمنه ترکمنی	اترنفتی	۲/۷۳	−	−	−	−
	دی کلرومتان	۷/۳۱	−	−	−	−
	اتیل استاتی	۰/۶۸	−	−	−	−
	اتانولی	۲/۱۸	−	+	+	+
	هیدرواتانولی	۱۸/۵۲	−	−	+	+
درمنه کپه داغی	اترنفتی	۴/۵۳	−	−	−	−
	دی کلرومتان	۱۰/۲۴	−	+	−	−
	اتیل استاتی	۰/۷۶	−	−	−	−
	اتانولی	۳/۴۶	−	+	+	+
	هیدرواتانولی	۱۹/۲۴	−	−	+	+
کنترل‌ها	DMSO	−	+	+	+	+
	بلانک عصاره‌ها	−	+	+	+	+
	تربینافن	−	−	−	−	−

علامت مثبت (+) به معنی رشد قارچ در دست کم دو تکرار و علامت منفی (−) به معنی عدم رشد قارچ در دست کم دو تکرار از غلظت مورد نظر می باشد (نتایج حاصل سه بار تکرار کشت است).

جدول۲- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC برحسب میکروگرم/میلی‌لیتر) عصاره‌های سه گونه درمنه به‌کار رفته علیه چهار قارچ عامل درماتوفیتوزیس

نام گیاه	عصاره	جدایه قارچی			
		اپیدرموفیتون فلوکوزوم	تریکوفیتون روبروم	میکروسپوروم کانیس	تریکوفیتون وروکوزوم
درمنه کوهی	اترنفتی	۴۹۵/۲۷	۱۹۸۱/۱	۲۴۷/۶۳	۱۵۰
	دی کلرومتان	۹۹۰/۵۵	–	۹۹۰/۵۵	۶۰۰
	اتیل استاتی	۱۹۸۱/۱	–	۴۹۵/۲۷	۱۲۰۰
	اتانولی	–	–	۱۹۸۱/۱	–
	هیدرواتانولی	–	–	۹۹۰/۵۵	–
درمنه ترکمنی	اترنفتی	۶۱/۹۰	۴۹۵/۲۷	۴۹۵/۲۷	۱۲۰۰
	دی کلرومتان	۹۹۰/۵۵	۹۹۰/۵۵	۱۹۸۱/۱	۱۲۰۰
	اتیل استاتی	۴۹۵/۲۷	۱۹۸۱/۱	۱۹۸۱/۱	۱۲۰۰
	اتانولی	۱۹۸۱/۱	–	–	–
	هیدرواتانولی	۴۹۵/۲۷	–	–	–
درمنه کپه داغی	اترنفتی	۱۲۳/۸۱	۱۹۸۱/۱	۴۹۵/۲۷	۳۰۰
	دی کلرومتان	۴۹۵/۲۷	–	۹۹۰/۵۵	۶۰۰
	اتیل استاتی	۱۹۸۱/۱	۱۹۸۱/۱	۹۹۰/۵۵	۶۰۰
	اتانولی	۱۹۸۱/۱	–	–	–
	هیدرواتانولی	۹۹۰/۵۵	۱۹۸۱/۱	–	–
کنترل	تربینافن	۰/۰۱۵۶	۰/۰۰۷۸	۰/۰۱۵۶	۰/۰۰۷۸

جدول ۳- نتایج غربالگری اولیه فیتوشیمیایی عصاره اتر نفتی سه گونه گیاه درمنه

نام گیاه	استرول‌ها	ترپنوئیدها	فلاوونوئیدها
درمنه کوهی	+	++	−−
درمنه ترکمنی	++	++	−−
درمنه کپه داغی	++	+	+/−

علامت مثبت (+) به معنی تغییر رنگ در دو تکرار و علامت منفی (−) به معنی عدم تغییر رنگ در دو تکرار می باشد (نتایج حاصل چهار بار تکرار است).

بحث

بیماری درماتوفیتوزیس توسط قارچهایی موسوم به درماتوفیت ایجاد می‌شود که در سراسر جهان شیوع دارد. استفاده از داروهای شیمیایی برای درمان این بیماری مشکلاتی را به همراه داشته است. فرآورده‌های طبیعی به عنوان یک منبع دارویی ارزشمند و پایه تحقیقات دارویی هستند که نقش مهمی را به عنوان مواد اولیه برای تولید انواع داروهای سنتتیک ایفا می‌کنند (۱۶). علاوه بر این، داروهای گیاهی برای درمان برخی از بیماری‌ها به صورت مستقیم یا مکمل با سایر داروها استفاده می‌شود (۱۷). گیاه درمنه به عنوان منبع غنی ترکیبات طبیعی، پتانسیل بالایی برای درمان بسیاری از انواع بیماری‌های انسانی دارد (۱۸). با توجه به پیشینه تنوع ترکیبات ضد میکروبی که در درمنه گزارش شده است، ممکن است این ترکیبات به طور کامل توسط یک حلال استخراج نشوند به طور مثال Zhang و همکاران آرتیمیسین (Artemisin) را به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی قوی از گیاه درمنه با استفاده از حلال پروپیلن گلیکول متیل اتر استخراج کرده‌اند (۱۹)، همچنین Thangjam و همکارن با کاربرد حلال‌های متانول و اتانول ترکیبات آنتی اکسیدانی از گیاه درمنه را استخراج کرده‌اند (۲۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از بین پنج حلال مورد استفاده برای استخراج ترکیبات از اندام هوایی سه گونه درمنه کوهی، درمنه ترکمنی و درمنه کپه داغی،

بیشترین بازده استخراج مربوط به عصاره هیدرواتانولی است، می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات قطبی ممکن است در گیاه درمنه غالب باشند.

نتایج بررسی اثر ضد قارچی عصاره‌های مختلف گیاه درمنه علیه *اپیدرموفیتون فلوکوزوم*، *تریکوفیتون روبروم*، *میکروسپوروم کانیس* و *تریکوفیتون وروکوزوم* طیفی از اثرات بازدارندگی را علیه چهار قارچ فوق نشان داد. این یافته با نتایج یافته‌های محققین دیگر که نشان دادند گونه‌های درمنه (*Artemisia* sp.) دارای اثر بازدارندگی علیه درماتوفیت‌ها هستند، مشابهت داشت (۲۲، ۲۱). این پژوهشگران گزارش نمودند که عصاره درمنه استحصال شده با n-هگزان موجب کاهش رشد قارچ *ترکوفیتون منتاگروفیتس* (*Trichophyton mentagrophytes*) بر روی موش آزمایشگاهی تلقیح شده با این بیمارگر شده است (۲۱). Hashem گزارش نموده است که عصاره آبی *آرتیمیزیا جودیاکا* (*Artemisia judaica*) دارای اثر مهارکنندگی از رشد درماتوفیت‌هایی همچون *تریکوفیتون روبروم* و *میکروسپوروم کانیس* هستند (۲۲). همچنین گزارش شده است که اسانس گیاه درمنه دشتی (*A. sieberi*) دارای ترکیباتی است که اثر بازدارندگی علیه قارچ‌های درماتوفیتوزیس را نشان دادند (۸). Mahboubi و همکاران گزارش کرده‌اند که عصاره آبی *آلیوم هیرتیفولیوم* (*Allium hirtifolium* Bios) دارای اثر بازدارندگی علیه *اپیدرموفیتون فلوکوزوم*، *تریکوفیتون روبروم*، *میکروسپوروم کانیس*، *تریکوفیتون وروکوزوم*، *میکروسپوروم جیپسئوم* و *تریکوفیتون شونلنی* است، به‌طوری که در مقایسه با کتوکونازول این اثر معنی‌دار بوده است (۲۳). در نتایج مطالعه حاضر، قارچ *اپیدرموفیتون فلوکوزوم* نسبت به سایر قارچ‌های آزمایش‌شده به عصاره درمنه حساس‌تر بود، به‌طوری که از ۱۵ عصاره استفاده شده در ۱۳ عصاره، رشدی از قارچ مشاهده نشد. این نتیجه با مشاهدات Masihha و همکاران که ده عصاره متانولی و آبی حاصل از جنس و گونه های *کالندولا افیسینالیس* (*Calendula officinalis*)، *آکاسیا اربیکا* (*Acacia Arabica*)، *آلتئا افیسینالیس* (*Altheae officinalis*)، *جینکو بیلوبا* (*Ginkgo biloba*)، *جوگلانس رجیا* (*Juglans regia*)، *اسیمیوم باسیلیکوم* (*Osimumbasilicum*)، *سولانوم نیگروم* (*Solanum nigrum*)، *هایپریکوم پرفوراتوم* (*Hypericum perforatum*)، *اورتیکا دویکا* (*Urtica dioica*) و *آناگالیس آرونسیس* (*Anagalis arvensis*) را علیه تعدادی از درماتوفیت‌های بیماری‌زای انسانی مورد بررسی قرار داده‌اند، مشابهت داشت (۲۴)؛ به‌طوری که این محققین *اپیدرموفیتون فلوکوزوم* را به عنوان یکی از حساس‌ترین قارچ‌ها به عصاره‌های گیاهی آزمایش شده، گزارش کرده‌اند. در مقابل، برای درمان بیماری‌های ناشی از *تریکوفیتون روبروم* مشکلاتی وجود دارد و این گونه نسبت به داروهای ضد درماتوفیت بسیار مقاوم است. در نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، غلظت‌های بالاتری از هر عصاره اثر بازدارندگی را علیه *تریکوفیتون روبروم* نشان دادند که با مقاومت گزارش شده این قارچ به غلظت‌های بالای عصاره اکینوفورا پلاتیبولا (*Echinophora platyloba*) مطابقت دارد (۲۵). این اثر احتمالاً با مقاومت ذاتی این قارچ در برابر داروهای ضد قارچی مرتبط است (۲).

در مطالعه حاضر در مقایسه با تربینافین به عنوان شاهد مثبت، هیچ یک از عصاره‌ها به اندازه تربینافین موثر نبودند. با توجه به اینکه عصاره‌های آزمایش شده حاوی بسیاری از ترکیبات بی‌اثر بودند، تفاوت بین اثر بازدارندگی تربینافین و عصاره‌های آزمایش شده مورد انتظار بود.

نتایج تجربی ما نشان داد که اثر ضد قارچی گونه‌های درمنه رابطه مستقیمی با قطبیت حلال به‌کار رفته در استخراج ترکیبات مؤثر دارد. اتر نفت به عنوان حلال غیر قطبی، بهترین گزینه برای استخراج ترکیبات ضد درماتوفیت از سه گونه درمنه بود. در مقابل، عصاره‌های اتانولی و هیدرواتانولی گونه‌های گیاهی مورد مطالعه، که احتمالاً غنی از اجزای قطبی بودند، در اکثریت قارچ‌های به‌کار رفته در آزمایش هیچگونه فعالیت بازدارنده‌ای را نشان ندادند. با توجه به موارد فوق، می‌توان عنوان نمود که مؤثرترین ترکیبات ثانویه سه گونه درمنه کوهی، درمنه ترکمنی و درمنه کپه داغی مواد فیتوشیمیایی غیر قطبی هستند. این یافته‌ها با نتایج پژوهش‌های محققین دیگر همسو بود. Eloff و همکاران حلال‌ها را بر اساس توانایی آن‌ها در حل کردن ترکیبات ضد میکروبی گیاهان، خطرات

زیستی و سهولت حذف حلال‌ها از فراکسیون‌ها رتبه‌بندی کرده‌اند (۲۶).

همان‌طور که ذکر شد، اتر نفت مؤثرترین حلال برای استخراج ترکیبات ضد قارچی از سه گونه آزمایش شده بود. این یافته با نتایج MIC نیز تأیید شد به‌طوری که کمترین مقدار MIC از هر سه گونه درمنه آزمایش شده مربوط به عصاره اتر نفتی بود (جدول ۲). این نتیجه همسو با مطالعات سایر محققان است (۲۷, ۲۶). Mojarrab و همکاران فعالیت‌های سمیت سلولی و ضد مالاریایی قوی‌تری را به ترتیب از عصاره اتر نفتی و دی کلرومتانی گونه‌های درمنه گزارش کرده‌اند (۹). در این مطالعه، بر اساس نتایج غربالگری اولیه فیتوشیمیایی عصاره‌های اتر نفتی، همه گونه‌ها حاوی استرول‌ها و ترپنوئیدها بودند. استروئیدهای گیاهی دارای اثرات ضد قارچی هستند و حضور ترپنوئیدها ممکن است موجب افزایش فعالیت ضددرماتوفیتی شود (۲۸). گزارش شده است که گونه‌های درمنه (*Artemisia* sp.) محتوی ۱۲ ترکیب منوترپن شامل camphene، (R)-camphor، (R)-carvone، 1,8-cineole، (S)-fenchone، geraniol، (S)-cuminaldehyde، limonene، (R)-linalool، (1R,2S,5R)-menthol، myrcene و thymol هستند که دارای پتانسیل اثرات ضد قارچی هستند (۲۹). Gharachorlou و Sadighi Shamami عنوان نمودند که اثر ضد قارچی گونه‌های درمنه مربوط به محتوی ترپنوئیدی و فلاوونوئیدی این گیاهان به ویژه ترکیب α-thojune می‌باشد (۲۱). پیشنهاد شده است که این متابولیت‌های ثانویه می‌توانند به عنوان ماده همراه با داروهای ضد قارچی استفاده شوند. Hosseinzadeh و همکاران ترپنوئیدها را از عصاره‌ی درمنه کوهی و درمنه ترکمنی جداسازی و شناسایی کرده‌اند (۳۰). با این حال، مطالعه فیتوشیمیایی جامع‌تر بر روی عصاره‌های انتخاب شده ممکن است اجزای فعال ضد قارچی را شناسایی کند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، ما دریافتیم که تعدادی از عصاره‌های درمنه کوهی، درمنه ترکمنی و درمنه کپه داغی دارای فعالیت ضد درماتوفیتی بودند. *اپیدرموفیتون فلوکوزوم* و *تریکوفیتون روبروم* به ترتیب حساسیت و مقاومت بالاتری نسبت به عصاره‌های درمنه نشان دادند. بر اساس نتایج غربالگری فیتوشیمیایی اولیه، عصاره‌های اتر نفتی، به عنوان عصاره‌های قوی‌تر نسبت به سایر عصاره‌های به کار رفته، غنی از ترپنوئیدها و استرول‌ها بودند. می‌توان گفت، این گونه‌های گیاهی ممکن است کاندیداهای مناسبی برای دستیابی به آنتی بیوتیک‌های جدید باشند که نیاز به بررسی‌های بیشتر دارند.

تقدیر و تشکّر

این مقاله، حاصل پایان‌نامه خانم شادی سلمانی با کد ۹۷۸۰۹ تحت عنوان بررسی برون تنی فعالیت ضد قارچی اندام‌های هوایی درمنه‌های کوهی، ترکمنی و کپه داغی بر تعدادی از درماتوفیت‌های شایع، در مقطع دکترای حرفه‌ای داروسازی در سال ۱۳۹۸ می‌باشد که با حمایت مالی کمیته تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (شماره کمک هزینه: ۹۷۸۰۹) اجرا شده است.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Arenas R, del Rocío Reyes-Montes M, Duarte-Escalante E, Frías-De-León MG, Martínez-Herrera E. Dermatophytes and Dermatophytosis. In: Mora-Montes HM, Lopes-Bezerra LM. Curr. Med. Mycol. 2017. 381-425. DOI: 10.1007/978-3-319-64113-3_13.

2- Martinez-Rossi NM, Bitencourt TA, Peres NTA, Lang EAS, Gomes EV, Quaresemin NR, et al. Dermatophyte resistance to antifungal Drugs: mechanisms and prospectus. Front. Microbiol. 2018; 9: 1108. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01108.

3- Kaul S, Yadav S, Dogra S. Treatment of Dermatophytosis in Elderly, Children, and Pregnant Women. Indian Dermatol Online J. 2017; 8(5): 310-8. DOI: 10.4103/idoj.IDOJ_169_17.

4- Hossain A. The Genus *Artemisia* (Asteraceae): A Review on its Ethnomedicinal Prominence and Taxonomy with Emphasis on Foliar Anatomy, Morphology, and Molecular Phylogeny. Proc. Pak. Acad. 2020; 57(1): 1-28. URL: https://www.paspk.org/wp-content/uploads/2020/10/LS-597.pdf.

5- Sharifi-Rad J, Herrera-Bravo J, Semwal P, Painuli S, Badoni H, Ezzat SM, et al. *Artemisia* spp.: An Update on its chemical composition, pharmacological and toxicological Profiles. Oxid Med Cell Longev. 2022; 2022: 5628601. DOI: 10.1155/2022/5628601.

6- Gruessner BM, Cornet-Vernet L, Desrosiers MR, Lutgen P, Towler MJ, Weathers PJ. It is not just artemisinin: *Artemisia* sp. for treating diseases including malaria and schistosomiasis. Phytochem Rev. 2019; 18(6): 1509-27. DOI: 10.1007/s11101-019-09645-9.

7- Rolta R, Sharma A, Sourirajan A, Mallikarjunan PK, Dev K. Combination between antibacterial and antifungal antibiotics with phytocompounds of *Artemisia annua* L: A strategy to control drug resistance pathogens. J Ethnopharmacol. 2021; 266: 113420. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113420.

8- Mahboubi M. *Artemisia sieberi* Besser essential oil and treatment of fungal infections. Biomed Pharmacother. 2017; 89: 1422-30. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.03.036.

9- Mojarrab M, Pourasadollah A, Motamed H, Ahmadi F, Hosseinzadeh L. Active fractions of dichloromethane extract of *Artemisia aucheri* inhibit proliferation of human breast cancer MCF-7 Cells via Induction of Apoptosis. J. Rep. Pharm. Sci. 2018; 7(3): 331-43. URL: https://www.jrpsjournal.com/article.asp?issn=2322-1232;year=2018;volume=7;issue=3;spage=331;epage=343;aulast=Mojarrab;type=0.

10- Joharian M, Mojarab M, Darvishi E, Khosravi H, Nazari V, Varnamkhasti BS, Mirsadeghi S. Green synthesis of biogenic Cu/Fe3O4 nanocomposite using the *Eriobotrya japonica* seed extract against pathogenic bacteria. J. Mol. Struct. 2022; 1264: 133229. DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.133229.

11- Gonelimali FD, Lin J, Miao W, Xuan J, Charles F, Chen M, et al. Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage Microorganisms. Front. Microbiol. 2018; 9:1639. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01639.

12- Leeyaphan C, Suiwongsa B, Komesmuneeborirak P, Kiratiwongwan R, Wongdama S, Prasong W, Supcharoenkul S, Bunyaratavej S. Effectiveness and safety of topical amphotericin B in 30% dimethyl sulfoxide cream versus 30% dimethyl sulfoxide cream for nondermatophyte onychomycosis treatment: A pilot study. Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol. 2022; 88(4): 494-9. DOI: 10.25259/IJDVL_359_2021.

13- Adu JK, Amengor CD, Kabiri N, Orman E, Patamia SA, Okrah BK. Validation of a Simple and Robust Liebermann–Burchard Colorimetric Method for the Assay of Cholesterol in Selected Milk Products in Ghana. Int. J. Food Sci. 2019; 2019: 9045938. DOI: 10.1155/2019/9045938.

14- Patil AS. Plant Secondary Metabolites: Isolation, Characterization & Biological Properties. First ed: New Delhi, Studera Press; 2020. PP. 86. URL: https://books.google.com/books/about/Plant_Secondary_Metabolites.html?id=VpTmDwAAQBAJMatvieieva N,

15- Matvieieva N, Drobot K, Duplij V, Ratushniak Y, Shakhovsky A, Kyrpa-Nesmiian T, et al. Flavonoid content and antioxidant activity of *Artemisia vulgaris* L. "hairy" roots. Prep Biochem Biotechnol. 2019; 49(1): 82-7. DOI: 10.1080/10826068.2018.1536994.

16- Sharma A, Gupta S. Protective manifestation of herbonanoceuticals as antifungals: A possible drug candidate for dermatophytic infection. Health Sci Rep. 2022; 5 (5): e775. DOI: 10.1002/hsr2.775.

17- Gasu EN, Ahor HS, Borquaye LS. Peptide extract from *Olivancillaria hiatula* exhibits broad-spectrum antibacterial activity. Biomed Res Int. 2018; 2018: 6010572. DOI: 6010572. 10.1155/2018/6010572.

18- Oliaee D, Boroushaki MT, Oliaee N, Ghorbani A. Evaluation of cytotoxicity and antifertility effect of *Artemisia kopetdaghensis*. Adv Pharmacol Sci. 2014; 2014: 745760. DOI: 10.1155/2014/745760.

19- Zhang Y, Li C, MengX, Zhao Y,Wang H and Zhang S. Ultrasonic assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. using monoether-based solvents. Green Chem. 2018; 20, 713-723. DOI: 10.1039/C7GC03191B.

20- Thangjam NM, Taijong, J. & Kumar, A. Phytochemical and pharmacological activities of methanol extract of *Artemisia vulgaris* L. leaves. Clin Phytosci. 2020; 72(6). DOI: 10.1186/s40816-020-00214-8.

21- Gharachorlou AA, Sadighi Shamami K. Study on Antifungal activity of *Artemisia* L. extract in Compared with Tryptophan against *Trichophyton mentagrophytes*. Bull Env Pharmacol Life Sci. 2013; 3(1): 37–41. URL: https://bepls.com/dec2013/8.pdf.

22- Hashem M. Antifungal properties of crude extracts of five Egyptian medicinal plants against dermatophytes and emerging fungi. Mycopathologia. 2011; 172(1): 37-46. DOI: 10.1007/s11046-010-9390-6.

23- Mahboubi M, Kazempour N. The anti-dermatophyte activity of *Allium hirtifolium* Boiss aqueous extract. J Mycol Med. 2015; 25(1): e10-4. DOI: 10.1016/j.mycmed.2014.10.010.

24- Massiha A, Muradov PZ. Comparison of antifungal activity of extracts of ten plant species and griseofulvin against human pathogenic dermatophytes. Zahedan J Res Med Sci. 2015; 17(10): e2096. DOI: 10.17795/zjrms-2096.

25- Avijgan M, Saadat M, Nilfrooshzadeh MA, Hafizi M. Antifungal effect of *Echinophora platyloba* extract on some common dermathophytes. J Med Plants 2005; 5(18): 10-6. URL: https://jmp.ir/browse.php?a_id=666&slc_lang=en&sid=1&printcase=1&hbnr=1&hmb=1.

26- Eloff JN. Quantification the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay guided fractionation. Int J Phytomedicine. 2004; 11(4): 370-1. DOI: 10.1078/0944711041495218.

27- Ahmadi F, Mojarrab M, Ghazi-Khansari M, Hosseinzadeh L. A semipolar fraction of petroleum ether extract of *Artemisia aucheri* induces apoptosis and enhances the apoptotic response to doxorubicin in human neuroblastoma SKNMC cell line. Res Pharm Sci. 2015; 10(4): 335-44. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4623622/.

28- Zacchino SA, Butassi E, Liberto MD, Raimondi M, Postigo A, Sortino M. Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. Phytomedicine. 2017; 37: 27-48. DOI: 10.1016/j.phymed.2017.10.018.

29- Marei G.K, Abdel Rasoul M.A, Samir A.M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. Pesticid Biochem Physiol. 2012; 103(1): 56–61. URL: 10.1016/j.pestbp.2012.03.004.

30- Hosseinzadeh L, Shokoohinia Y, Arab M, Allahyari E, Mojarrab M. Cytotoxic and apoptogenic sesquiterpenoids from the petroleum ether extract of *Artemisia aucheri* Aerial Parts. Iran J Pharm Res. 2019; 18(1): 391-9. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31089373/.