Preparation of a gel from rosemary extract and zinc oxide nanoparticles and determination of its antibacterial effectiveness for acne

Dr. Samer Housheh*

(Received 30 / 6 / 2024. Accepted 19 / 8 / 2024)

□ ABSTRACT □

Phytotherapy has been used over the centuries, and interest in it has increased recently. Rosemary extracts contain many active substances of various medical importance, including antibacterial activity. Additionally, zinc oxide nanoparticles have great antibacterial capabilities due to their small size, which can stimulate various mechanisms to eliminate germs. On the other hand, acne affects a large number of teenagers and adults, and both *Propionibacterium acnes* and *Staphylocoocus aureus* are among the most common bacterial strains affecting people with acne.

During this study, essential oils were extracted from rosemary leaves and analyzed using GC/MS. It was found that the essential oil of rosemary leaves contains a high content of triterpenoids, monoterpenoids, and phenolic diterpenes, including 32 compounds. Zinc oxide nanoparticles were also prepared chemically and their specifications were verified using a scanning electron microscope to confirm the formation of the nanoparticles. Essential oil and zinc oxide nanoparticles were used to prepare a gel that was uniform, easy to apply, and had a pH suitable for application on the skin. The bacteriological study confirmed the effectiveness of the gel in inhibiting the growth of both *P. acnes* and *S. aureus*, as the diameter of the inhibition zone was 17.32±0.92 mm and 23.56±0.67 mm for *P. acnes* spores and *S. aureus* spores, respectively. As a result, the prepared gel using the essential oil of rosemary leaves and zinc oxide nanoparticles can be considered an alternative natural formula to combat acne.

Keywords: Essential Oil, Rosemary, Zinc Oxide Nanoparticles, Acne, Gel, Antibacterial.

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

***Assistant Professor, Pharmaceutical chemistry and quality control department, Faculty of Pharmacy, Wadi International Private University, Homs, Syria**

تحضير جل من خلاصة إكليل الجبل وجسيمات أكسيد الزنك النانوية وتحديد فعاليته المضادة للجراثيم المسببة لحب الشباب

د. سامر هوشه*

(تاريخ الإيداع 30 / 6 / 2024. قبل للنشر في 19 / 8 / 2024)

□ ملخّص □

استخدم العلاج الطبيعي على مر العصور، وقد ازداد الاهتمام به في الآونة الأخيرة. تحتوي خلاصات إكليل الجبل على العديد من المواد الفعالة ذات الأهمية الطبية المتعددة ومنها الفعالية المضادة للجراثيم، كما تتميز الجسيمات النانوية بقدرات كبيرة مضادة للجراثيم نظرًا لصغر حجمها، والتي يمكن أن تحفز آليات مختلفة للقضاء على الجراثيم. بالمقابل يصيب حب الشباب عدد كبير من المراهقين والبالغين وتعتبر كل من جراثيم البروبيونية العدّيّة *Propionibacterium acnes* وجراثيم العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* من أكثر السلالات الجرثومية الشائعة عند المصابين بحب الشباب.

تم خلال هذه الدراسة استخلاص الزيوت العطرية من أوراق إكليل الجبل وتحليلها باستخدام GC/MS، حيث تبين أن الزيت العطري لأوراق إكليل الجبل يتضمن محتوىً عالٍ من المشتقات التربينية triterpenoids, monoterpenoids, phenolic diterpenes تشمل على 32 مركب. كذلك تم تحضير جسيمات أكسيد الزنك النانوية بالطريقة الكيميائية والتأكد من مواصفاتها من خلال المجهر الالكتروني الماسح للتأكد من تشكل الجسيمات النانوية. استعمل الزيت العطري وجسيمات أكسيد الزنك النانوية لتحضير جل تميز بتجانسه وسهولة تطبيقه ودرجة حموضة مناسبة للتطبيق على الجلد. أما الدراسة الجرثومية فقد بينت فعالية الجل في تثبيط نمو كل من جراثيم *P. acnes* وجراثيم *S. aureus*، حيث بلغ نصف قطر هالة التثبيط 0.92±17.32 مم لجراثيم *P. acnes* و 0.67±23.56 مم لجراثيم *S. aureus*. بالنتيجة يمكن اعتبار الجل المحضر باستعمال الزيت العطري لأوراق إكليل الجبل وجسيمات أكسيد الزنك النانوية بمثابة تركيبة طبيعية بديلة لمكافحة حب الشباب.

الكلمات المفتاحية: الزيت العطري، إكليل الجبل، جسيمات أكسيد الزنك النانوية، حب الشباب، جل، مضاد جراثيم.

حقوق النشر :مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

* **مدرس، قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية، كلية الصيدلة، جامعة الوادي الدولية الخاصة، حمص، سورية**

مقدمة

العلاج بالنباتات phytotherapy هو طريقة العلاج التي تستخدم النباتات في مجملها أو مكوناتها الفعالة لأغراض طبية لعلاج أو الوقاية من عدد كبير من الأمراض. استخدم هذا النوع من العلاجات في التقاليد الطبية المختلفة على مر القرون، مثل الطب الهندي القديم، والطب الصيني التقليدي [1]، وقد ازداد الاهتمام به في الآونة الأخيرة. من بين النباتات العديدة ومكوناتها الفعالة التي تمت دراستها، يعتبر نبات إكليل الجبل Rosmarinus officinalis L الذي ينتمي للفصيلة الشفوية Lamiaceae. ينمو هذا النبات بكثرة في حوض البحر الأبيض المتوسط ويستخدم كنبات عطري في تحضير بعض أنواع الطعام، كما تتميز خلاصاته بالعديد من الفوائد الحيوية وتستخدم تجارياً في العديد من الدول كمضادات أكسدة طبيعية ومواد حافظة مضادة لنمو الجراثيم [2]. تحتوي خلاصات إكليل الجبل على العديد من المواد الفعالة ذات الأهمية الطبية المتعددة ومنها الفعالية المضادة للجراثيم، ومن أهم هذه المواد الفعالة حمض الروزمارينيك rosmarinic acid، وهو مشتق من حمض الكافيين caffeic acid [3]، ثنائي التربينات الفينولية phenolic diterpenes، ومركبات الفلافونوئيد flavonoids [4]، وزيت إكليل الجبل العطري (essential oil, EO)، الذي يتكون من أكثر من مائة مركب كيميائي [5, 6].

تعد جسيمات أكسيد الزنك النانوية (ZnO–NPs) إحدى المواد النانوية لأكسيد المعدن وهي مركب غير عضوي قيّم ومتعدد الاستخدامات نظرًا لخصائصه الفيزيائية والكيميائية الفريدة [7]. تم تصنيع هذه الجسيمات على نطاق واسع واستخدامها في العديد من المنتجات الطبية والتجميلية مثل المراهم ومستحضرات التجميل وواقيات الشمس [8]. تظهر جسيمات أكسيد الزنك النانوية قدرات كبيرة مضادة للجراثيم نظرًا لصغر حجمها، والتي يمكن أن تحفز آليات مختلفة للقضاء على الجراثيم بمجرد دخولها داخل الخلية الجرثومية، حيث تولد بعض أنواع الأكسجين التفاعلية (Reactive oxygen species, ROS)، وتطلق شوارد الزنك [9, 10].

يصيب حب الشباب حوالي 85% من المراهقين وقد تستمر حتى مرحلة البلوغ وأحد أكثر الأمراض التي تصيب الإنسان انتشاراً. تُعزى الفيزيولوجيا المرضية لحب الشباب إلى عوامل بارزة مختلفة مثل تحفيز نشاط الغدد الدهنية بوساطة الهرمونات الأندروجينية، وفرط الكيراتين الجريبي، وعدم التوازن الهرموني، والالتهاب والعدوى البكتيرية الخارجية. وتعتبر كل من جراثيم البروبيونية العدّيّة *Propionibacterium acnes* والعنقوديات الذهبية *Staphylocoocus aureus* من أكثر السلالات الجرثومية الشائعة عند المصابين بحب الشباب [11].

تهدف هذه الدراسة إلى صياغة جل يحتوي على خلاصة إكليل الجبل وجسيمات أكسيد الزنك النانوية ومن ثم تقييم الخواص الفيزيوكيميائية للجل المحضر وفعاليته المضادة لجراثيم *Propionibacterium acnes* وجراثيم *Staphylocoocus aureus*.

طرائق البحث ومواده

تحضير العينة النباتية

تم جمع أوراق إكليل الجبل الطازجة من منطقة ريف طرطوس في شهر أيار وتجفيفها في الظلام بعيداً عن الرطوبة وأجريت الدراسة التجريبية في مختبرات كلية الصيدلة بجامعة الوادي الدولية الخاصة. تم استخلاص الزيوت العطرية باستخدام جهاز كلافنجر وحفظت العينات بعد الاستخلاص في أوعية عاتمة محكمة الإغلاق وبدرجة حرارة منخفضة [12]. تم بعدها تحليل

مكونات الزيت العطري باستخدام GC/MS (Shimadzu –GCMS–QP2010 Plus device) مجهز بعمود META–5X column (30.0 m X 0.32 mm X 0.25 mm) واستخدم الهيليوم كغاز حامل بسرعة تدفق 1.27 مل/دقيقة وتم اتباع برنامج حراري يبدأ بدرجة حرارة 40ْ مئوية لمدة 8 دقائق ومن ثم ترتفع درجة الحرارة بمعدل 2ْمئوية كل دقيقة حتى الوصول إلى الدرجة 250ْ مئوية وتم تثبيت درجة الحرارة 250ْ مئوية لمدة 30 دقيقة، حيث تم تحديد أهم المكونات الفعالة وتراكيزها في الزيت العطري باستخدام طاقة تأين 70 eV.

تحضير جسيمات الزنك النانوية

تم تحضير جسيمات الزنك النانوية بالطريقة الكيميائية، وذلك من خلال حل 10 غرام من خلات الزنك ثنائية الهيدرات (Sigma–Aldrich) في 75 مل ماء مقطر باستخدام محرك المغناطيسي كهربائي لمدة 15 دقيقة حتى تمام الانحلال. بعد ذلك تمت إضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم (80%) إلى محلول خلات الزنك دفعة واحدة مع الاستمرار بالتحريك. أخيراً، تمت إضافة الإيثانول المطلق تدريجياً إلى المزيج السابق حتى الوصول إلى درجة حموضة 10. تم جمع المسحوق الأبيض المترسب بعد التثفيل في الأنابيب وتم ترميده بدرجة حرارة 300 م لمدة 1 ساعة [13, 14]. تم تصوير عينة من المسحوق الأبيض بواسطة المجهر الالكتروني الماسح للتأكد من تشكل الجسيمات النانوية.

تحضير الجل

تم استخدام الطريقة الميكانيكية الباردة لتحضير الجل وفقاً لطريقة Prabu وزملائه [15]. حيث تم استخدام بوليمرين هما Carbopol–940 وهيدروكسي بروبيل ميثيل السليلوز (HPMC) من مصدر ألماني Basf. حيث تم توزيع 2 غرام من كل بوليمر بشكل موحد على سطح 80 مل من الماء منزوع الشوارد. تُرك الخليط طوال الليل حتى يكتمل امتصاص البوليمرات وتوزعها في الماء. أضيفت جسيمات الزنك النانوية بتركيز 15 ملغ/مل وأضيفت خلاصة أوراق إكليل الجبل بنسبة 3% (وزن/وزن)، حيث ضبطت التراكيز من المواد الفعالة للوصول إلى درجة حموضة مقبولة، مظهر متجانس، استقرار الجل المحضر، وسهولة التطبيق [6]. أخيراً، تمت إضافة 2 غرام من الغليسرين (Sigma–Aldrich) وتم إتمام الحجم إلى 100 مل باستخدام الماء منزوع الشوارد.

تقييم الخواص الفيزيوكيميائية للجل

تم تحديد الخواص الفيزيائية للجل من خلال الفحص العياني لعدة عوامل أساسية وهي اللون والمظهر والتجانس [16]. أما فيما يخص الخواص الكيميائية فقد تم تحديد درجة حموضة الجل باستخدام مقياس درجة الحموضة الرقمي (metrohm 744 ph meter switzerland)، وإجراء اختبار اللزوجة باستخدام جهاز اللزوجة (viscosity meter (Fungilab, India)) واختبار المد من خلال وضع طبقة رقيقة من الجل بين شريحتين يبلغ محيطهما 6 سم ومن ثم تحديد الزمن اللازم لحركة الشريحة العلوية خلال مسافة محددة وذلك بعد تطبيق ثقل على الشريحة العلوية بالاستناد إلى العلاقة [17]:

$$S = m\frac{l}{t}$$

حيث S هو قيمة قابلية المد، m الوزن المطبق على الشريحة العلوية، l طول الصفيحة المستعملة، t الزمن اللازم لتحرك الصفيحة العلوية على كامل محيط الصفيحتين.

تقييم الفعالية المضادة للجراثيم للجل

تم استخدام جراثيم *Propionibacterium acnes* وجراثيم *Staphylococcus aureus* في هذه الدراسة وهما أكثر السلالات الجرثومية الشائعة عند المصابين بحب الشباب. تمت زراعة سلالة *P. acne* في ظروف لا هوائية في الأغار المدمى، وسلالة *S. aureus* في أغار مولر–هينتون (MH) [18]. تم نقل مستعمرة واحدة من كل سلالة على حدة وتعليقها في محلول ملحي حتى الوصول إلى تركيز نهائي قدره 0.5 ماكفارلاند من خلال قياس شدة العكارة.

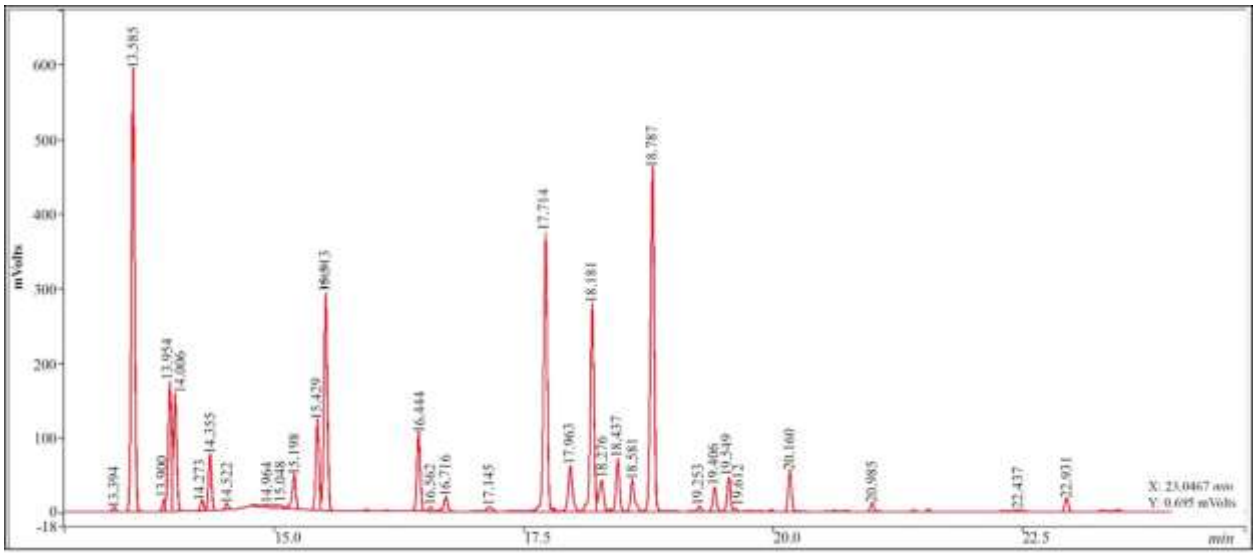
من أجل تقييم الفعالية المضادة للجراثيم، تم نشر معلق الجراثيم المحضر سابقاً ضمن أوساط زرعية من أغار مولر–هينتون ثم تم إجراء حفرة بقطر 6 سم ضمن الوسط الزرعي وملئها بكمية 0.2 مل من الجل المحضر (تم إجراء 3 مكررات) أو 0.2 من جل شاهد سلبي يحتوي على كل مكونات الجل عدا خلاصة إكليل الجبل وجسيمات أكسيد الزنك النانوية، كما تمت المقارنة مع أقراص الصادات الحيوية (*Amoxicillin لجراثيم P. acnes* و Norfloxacin لجراثيم *S. aureus* وفقاً لتوصيات CLSI). أخيراً تم حضن الأوساط الزرعية لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 درجة مئوية. تم إجراء ثلاث مكررات وقياس نصف قطر هالة التثبيط (مم) [19].

النتائج والمناقشة

توصيف الزيت العطري وجسيمات أكسيد الزنك النانوية

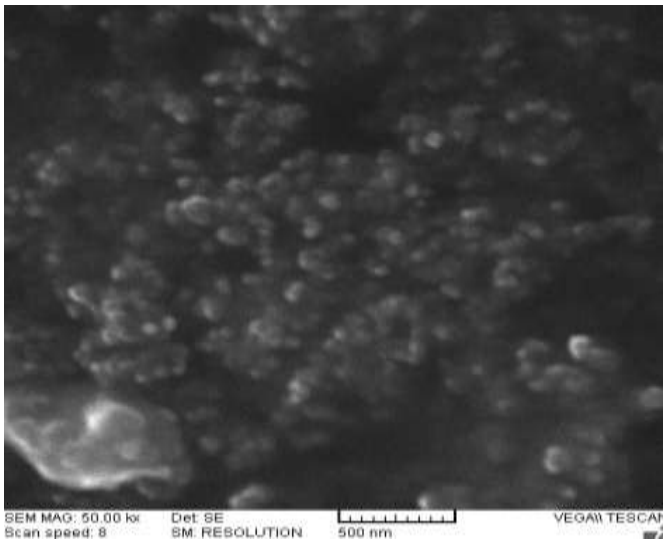
أظهر طيف الكروماتوغرافيا الغازية المقرونة بمطيافية الكتلة (GC/MS) الموضح في الشكل (1) أن الزيت العطري لأوراق إكليل الجبل يتضمن محتوى عالي من triterpenoids, monoterpenoids, phenolic diterpenes تشمل على 32 مركب أكثرها تركيزاً:

1,8–cineole (49.32%), camphor (8.71%), α–pinene (11.89%), borneol (6.41%), camphene (4.45%)



الشكل 1: طيف الكروماتوغرافيا الغازية المقرونة بمطيافية الكتلة (GC/MS) لخلاصة أوراق إكليل الجبل.

كما يُظهر المجهر الإلكتروني الماسح شكل وأبعاد جسيمات أكسيد الزنك النانوية (الشكل 2)، وهذان الأمران يتعلق بهما أمور عدة أثناء التصنيع منها الملح المستخدم وتركيزه وزمن التفاعل ودرجة حرارة الترميد. حيث بلغ وسطي أبعاد جسيمات أكسيد الزنك النانوية 32 nm.



الشكل 2: صورة المجهر الالكتروني الماسح لجسيمات أكسيد الزنك النانوية.

تقييم الخواص الفيزيوكيميائية للجل

من خلال الفحص العياني للجل المحضر تبين أن الجل شفاف، متجانس القوام، لا يحتوي على ترسبات أو تكتلات، ولونه أصفر شاحب كما يبدو في الشكل 3.

الشكل 3: جل خلاصة إكليل الجبل وجسيمات أكسيد الزنك النانوية.

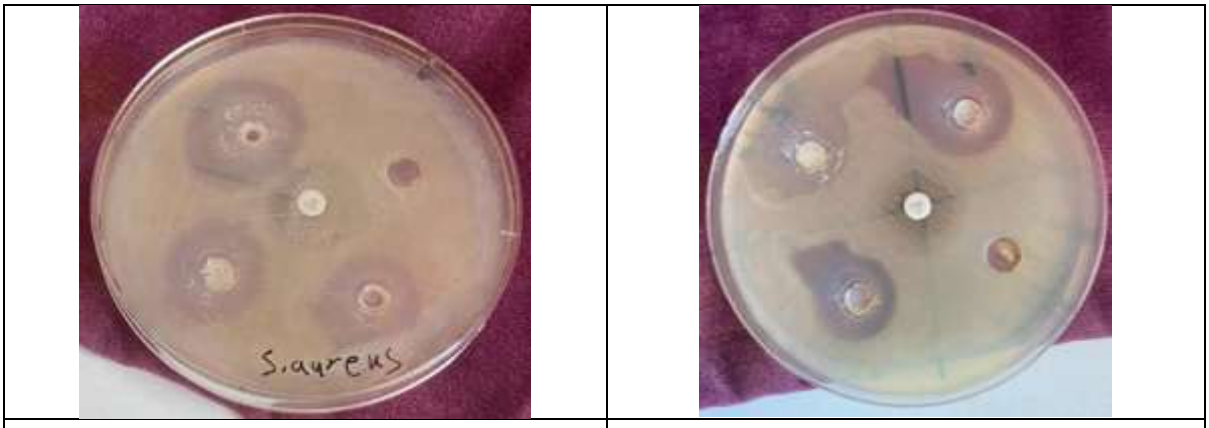
بلغت درجة حموضة الجل المحضر 5.9 وهي قيمة مناسبة للمستحضرات التي يتم تطبيقها على الجلد حيث تنص الدساتير الدوائية على أن تتراوح درجة حموضة المستحضرات الجلدية بين 4.2 و 6.5، مما يؤكد أن الجل المحضر مناسب للاستخدام الموضعي والاختراق ويضمن الحفاظ على الفلورا الجلدية والترطيب الجيد [20].

تؤثر الخواص الريولوجية للجل على القوام النهائي للجل وعلى معدل انتشار الدواء منه، وأظهرت النتائج أن لزوجة الجل المحضر بلغت 13920±19.39 سنتي بواز وهي قيم مناسبة تضمن سهولة التطبيق الدقيق للجل على الجلد من خلال التدفق والانتشار الجيدين. بالإضافة إلى ذلك، تعد هذه اللزوجة المنخفضة مؤشرًا على مرونة الجل عند تطبيق قوى الضغط، مما يؤمن سهولة تدفقه من الوعاء إلى منطقة التطبيق وعودته مرة أخرى إلى الوعاء عند تحرير الضغط [21].

بالإضافة إلى ما سبق يجب أن يتمتع المواد الجل بقابلية انتشار ومد جيدة تلبي الجودة المثالية في الاستخدام الموضعي، حيث أن قابلية مد الجل تساعد في التطبيق الموحد للجل على الجلد. بالإضافة إلى ذلك، يُعتقد أن هذا عنصر أساسي في التزام المريض بالعلاج [22]. يعبر اختبار المد على مدى سهولة انتشار الجل عند الاستخدام الموضعي، حيث بينت النتائج أن الجل المحضر يمتلك قابلية مد جيدة بلغت 43 غرام . سم/ثانية.

تقييم الفعالية المضادة للجراثيم للجل

إن التطبيق العلاجي المستمر للمضادات الحيوية يسبب في عدم فعاليتها ضد جراثيم *P. acnes* وجراثيم *S. aureus* بسبب تطور مقاومة المضادات الحيوية [23]. لذا قد يكون لاستخدام العلاجات الطبيعية لحب الشباب فائدة سريرية بالنظر إلى الظهور المتزايد للجراثيم التي تظهر مقاومة للمضادات الحيوية التقليدية. تم تقييم الفعالية المضادة للجراثيم لكل من جراثيم *P. acnes* وجراثيم *S. aureus* للجل المحضر إجراء من خلال قياس نصف قطر هالة التثبيط بالمليمتر، حيث بلغ نصف قطر هالة التثبيط 17.32±0.92 مم لجراثيم *P. acnes* و 23.56±0.67 مم لجراثيم *S. aureus* (الشكل 4).



A	B

الشكل 4: نصف قطر هالة التثبيط للجل المحضر على كل من جراثيم البروبيونية العدّيّة *Propionibacterium acnes* (A) وجراثيم العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* (B)

إن الآليات المسؤولة عن الفعالية المضادة للجراثيم لجسيمات أكسيد الزنك النانوية لا تزال غير واضحة. إلا أنه قد تم افتراض أن هذه الجسيمات قد تعبر غشاء الجراثيم من خلال الاختراق أو الامتصاص الخلوي، وبالتالي قد تتسرب محتويات السيتوبلازم وتؤدي إلى القضاء على الخلية الجرثومية [24]. كما بينت الدراسات أن جسيمات أكسيد الزنك النانوية قد تعزز إنتاج ROS، أو قد تحرر أيونات Zn التي تسبب ضررًا للمادة الوراثية أو الميتوكوندريا أو البروتينات أو غيرها من المكونات الخلوية الرئيسية الضرورية لحياة الجراثيم [25]. أما الزيت العطري لأوراق إكليل الجبل فقد

أثبتت الدراسات أنها المكونات الفعالة في هذا الزيت العطري تتفاعل مع غشاء الخلية الجرثومية، مما يؤثر على توليد الأحماض الدهنية والمادة الوراثية والمواد المغذية بالإضافة إلى نقل الإلكترونات وتسرب المكونات الخلوية ونقل الأحماض الدهنية. بالإضافة إلى ذلك، تسبب في تداخل البروتينات مع الغشاء الخلوي مما يؤدي إلى فقدان بنية الغشاء ووظيفته [26]. كما تؤكد الدراسات أن جميع المكونات الفعالية في الزيت العطري تمتلك نشاطاً مضاداً للجراثيم، إلا أن borneol هو الأكثر فعالية، يليه camphor، أما 1,8–cineole, α–pinene فتأثيرها المضاد للجراثيم هو الأضعف نسبياً [27].

الاستنتاجات والتوصيات

- أثبت الجل المحضر فعالية جيدة مثبطة لنمو جراثيم البروبيونية العدّيّة *Propionibacterium acnes* (A) وجراثيم العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*.
- أبدى الجل المحضر خواص فيزيوكيميائية مناسبة للاستخدام الموضعي والاختراق وتضمن سهولة تطبيقه.
- يمكن اعتبار الجل المحضر باستعمال الزيت العطري لأوراق إكليل الجبل وجسيمات أكسيد الزنك النانوية بمثابة تركيبة طبيعية بديلة لمكافحة حب الشباب.
- تحضير جسيمات أكسيد الزنك النانوية بالطريقة الخضراء بدلاً من الطريقة الكيميائية وتحديد الفرق في الخواص والفعالية للجسيمات المحضرة.
- استعمال خلاصات نباتية أخرى لتحضير الجل ودراسة الخواص الفيزيوكيميائية للجل المحضر وخواصه البيولوجية.
- دراسة الفعالية المضادة للجراثيم للجل المحضر على سلالات جرثومية أخرى تصيب الجلد، مثل الجراثيم التي تنتشر في حالات الإصابة بالحروق أو الجروح الواسعة والمفتوحة.
- إجراء بعض الفحوصات الأخرى الخاصة بالجل لتحديد الثبات الحراري والعمر على الرف.
- اختبار الجل المحضر على مرضى مصابين بحب الشباب.

Reference

1. Falzon CC, Balabanova A. Phytotherapy. Prim. Care Clin. Off. Pract. 2017;44:217-227.
2. de Oliveira JR, Camargo SEA, de Oliveira LD. Rosmarinus officinalis L. (Rosemary) as Therapeutic and Prophylactic Agent. J. Biomed. Sci. 2019;26:5.
3. Nabavi S, Tenore G, Daglia M, Tundis R, Loizzo M, Nabavi S. The Cellular Protective Effects of Rosmarinic Acid: From Bench to Bedside. Curr. Neurovasc. Res. 2015;12:98-105.
4. del Baño MJ, Lorente J, Castill J, Benavente-García O, Marín MP, del Río JA, Ortuño A, Ibarra I. Flavonoid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of Rosmarinus officinalis. Postulation of a Biosynthetic Pathway. J. Agric. Food Chem. 2004;52:4987-4992.
5. Tuttolomondo T, Dugo G, Ruberto G, Leto C, Napoli EM, Cicero N, Gervasi T, Virga G, Leone R, Licata M, et al. Study of Quantitative and Qualitative Variations in Essential Oils of Sicilian Rosmarinus officinalis L. Nat. Prod. Res. 2015;29:1928-1934.

6. Hussein B, Oubari MA, Oubari OA, Aziz R, Alajlani M. Formulation and evaluation of a topical gel containing Rosemary oil for the treatment of acne vulgaris. Int J Herb Med 2023;11(4):23-30.
7. Agnieszka KR, Jesionowski T. Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. Materials 2014;7:2833-2881.
8. Eixenberger JE, Anders CB, Hermann RJ, Brown RJ, Reddy KM, Punnoose A, Wingett DG. Rapid Dissolution of ZnO Nanoparticles Induced by Biological Buffers Significantly Impacts Cytotoxicity. Chem. Res. Toxicol. 2017;30:1641-1651.
9. Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, Hasan H, Mohamad D. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. Nano-Micro Lett. 2015;7:219-242.
10. Motelica L, Vasile BS, Ficai A, Surdu AV, Ficai D, Oprea OC, Andronescu E, Mustățea G, Ungureanu EL, Dobre AA. Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles Loaded with Essential Oils. Pharmaceutics 2023;15(10):2470.
11. Coenye T, Peeters E, Nelis HJ. Biofilm formation by Propionibacterium acnes is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. Res Micro Biol. 2007;158:386-392.
12. Yeddes W, Ouerghemmi I, Hammami M, Gadhoumi H, Affes TG, Nait Mohamed S, Aidi-Wannes W, Witrowa-Rajchert D, Saidani-Tounsi M, Nowacka M. Optimizing the Method of Rosemary Essential Oils Extraction by Using Response Surface Methodology (RSM)-Characterization and Toxicological Assessment. Sustainability 2022;14(7):3927.
13. Hasnidawani JN, Azlina, HN, Norita H, Bonnia NN, Ratim S, Ali ES. Synthesis of ZnO Nanostructures Using Sol-gel method Procedia Chemistry 2016;19:211-216.
14. Tan YY, Wong LS, Nyam KL, Wittayanarakul K, Zawawi NA, Rajendran K, Djearamane S, Dhanapal ACTA. Development and Evaluation of Topical Zinc Oxide Nanogels Formulation Using Dendrobium anosmum and Its Effect on Acne Vulgaris. Molecules 2023;28(19):6749.
15. Prabu SL, Umamaheswari A, Rajakumar S, Bhuvaneswari P, Muthupetchi S. Development and evaluation of gel incorporated with synthesized silver nanoparticle from Ocimum gratissimum for the treatment of acne vulgaris. Am. J. Adv. Drug Deliv. 2017;5:107-117.
16. Chellathurai BJ, Anburose R, Alyami MH, Sellappan M, Bayan MF, Chandrasekaran B, Chidambaram K, Rahamathulla M. Development of a Polyherbal Topical Gel for the Treatment of Acne. Gels 2023;9(2):163.
17. Bakhrushina EO, Anurova MN, Zavalniy MS, Demina NB., Bardakov AI, Krasnyuk II. Dermatologic gels spreadability measuring methods comparative study. Int J App Pharm. 2022;14(1):164-168.
18. Ahle CM, Stodkilde K, Poehlein A, Bömeke M, Streit WR, Wenck H, Reuter JH, Hüpeden J, Brüggemann H. Interference and co-existence of staphylococci and cutibacterium acnes within the healthy human skin microbiome. Commun. Biol. 2022;5:923.
19. Khalili H, Soltani R, Negahban S, Abdollahi A, Gholami K. Reliability of Disk Diffusion Test Results for the Antimicrobial Susceptibility Testing of Nosocomial Gram-positive Microorganisms: Is E-test Method Better? Iran J Pharm Res. 2012;11(2):559-63.
20. Das S, Wong AB. Stabilization of ferulic acid in topical gel formulation via nanoencapsulation and pH optimization. Sci. Rep. 2020;10:12288.

21. Obaidat RM, Tashtoush BM, Bayan MF, TAl Bustami R, Alnaief M. Drying using supercritical fluid technology as a potential method for preparation of chitosan aerogel microparticles. AAPS PharmSciTech. 2015;16:1235-1244.
22. Ilango KB, Gowthaman S, Seramaan KI, Chidambaram K, Bayan MF, Rahamathulla M, Balakumar C. Mucilage of *Coccinia grandis* as an efficient natural polymer-based pharmaceutical excipient. Polymers 2022;14:215.
23. Kayiran MA, Karadag AS, Al-Khuzaei S, Chen W, Parish LC. Antibiotic Resistance in Acne: Mechanisms, Complications and Management. Am. J. Clin. Dermatol. 2020;21: 813-819.
24. Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Daskalakis N, Jeuken L, Povey M, O'neill AJ, York DW. Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against E. coli. J. Nanopart. Res. 2009;12:1625-1636.
25. Siddiqi KS, Rahman AU, Tajuddin Husen A. Properties of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Activity Against Microbes. Nanoscale Res. Lett. 2018;13:141.
26. Soliman MM, Elsaba YM, Soliman MSA et al. Composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. and Artemisia monosperma L. leaf essential oils and methanolic extracts from plants grown in normal and saline habitats in Egypt. Sci Rep 2024;14:7342.
27. Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibañez E, Señoráns FJ, Reglero G. Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. J Food Prot. 2005;68(4):790-5