Journal of Marine Medicine
Summer 2021, Volume 3, Issue 2
Pages: 97-106
10.30491/3.2.97

Role of Phlorotannins Derived from Brown Alga *Padina* sp. as a Protective Agent against Ultraviolet Radiation and Oxidative Stress

Soolmaz Soleimani [1], Sepideh Babaei Mahani Nezhad [1], Morteza Yousefzadi [1 *]

[1] *Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran*

Received: 29 April 2021 **Accepted:** 19 May 2021

Abstract

Background and Aim: Fluorotanens is one of the most important polyphenolic compounds in brown algae that can be used as an organic UV filter in sunscreen formulations. The aim of the present study was to isolate fluorotanen from the brown alga Padina sp. to evaluate its biological activities and the Sun Protection Factor.

Methods: In this experimental study, ethyl acetate and aqueous fractions were isolated from brown alga Padina sp. The total content of phlorotannins and the antioxidant and antibacterial activity of the fractions were studied as biological activity. Phlorotannins- rich fraction was used in the cream formulation and finally its Sun Protection Factor was measured.

Results: According to the finding, the total content of phlorotannins in the ethyl acetate fraction was higher than other fractions. Ethyl acetate fraction had the ability to inhibit ABTS free radical at the concentration of 3 mg/mL by 63.81±0.8%. In antibacterial activity, ethyl acetate fraction showed a greater effect on inhibiting the growth of gram-negative bacteria than gram-positive bacteria, while the aqueous fraction had no effect on inhibiting the growth of gram-negative and gram-positive bacteria. According to the European classification, the cream formulation containing 5% ethyl acetate fraction with SPF = 20.49 categorize in the high Sun Protection Factor class.

Conclusion: Findings from this study can be promising for the use of brown algae Padina sp. as a valuable source of sun protection compounds for medicinal and cosmetic applications.

Keywords: Phlorotannins, Bioactivity, Sunscreen, Sun protection factor.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-02-20]

[DOI: 10.30491/3.2.97]

*Corresponding author: Morteza Yousefzadi1, **Email**: Morteza110110@gmail.com
Address: Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

مجله طب دریا
دوره ۳، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰
صفحات: ۱۰۶-۹۷
10.30491/3.2.97

نقش فلوروتانن مشتق شده از جلبک قهوه‌ای *Padina* sp. به عنوان عامل محافظت‌کننده در برابر اشعه ماورای بنفش و استرس اکسیداتیو

سولماز سلیمانی [۱]، سپیده بابائی ماهانی‌نژاد [۱]، مرتضی یوسف‌زادی [۱*]

[۱] گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۲/۰۹ **پذیرش مقاله:** ۱۴۰۰/۰۲/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: فلوروتانن‌ها یکی از ترکیبات مهم پلی‌فنولی در جلبک‌های قهوه‌ای هستند که می‌تواند به عنوان فیلتر UV آلی در فرمولاسیون کرم ضدآفتاب مورد استفاده قرار گیرد. هدف از مطالعه حاضر جداسازی فلوروتانن از جلبک قهوه‌ای *Padina* sp. و ارزیابی فعالیت‌های بیولوژیکی آن و اندازه‌گیری ضریب حفاظت نوری بود.

روش‌ها: در مطالعه آزمایشگاهی، فراکشن‌های اتیل استاتی و آبی از جلبک قهوه‌ای *Padina* sp. جدا گردید. میزان فلوروتانن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی فراکشن‌ها به عنوان فعالیت زیستی مورد بررسی قرار گرفت. فراکشن غنی از فلورتانن در فرمولاسیون کرم استفاده و در نهایت ضریب حفاظت نوری آن اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: طبق نتایج به‌دست آمده، میزان فلوروتانن در فراکشن اتیل استاتی بالاتر بود. همچنین، فراکشن اتیل استاتی نشان داد که توانایی مهار رادیکال آزاد ABTS در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به میزان ۶۳/۸۱±۰/۸ درصد است. در فعالیت ضدباکتریایی، فراکشن اتیل استاتی تاثیر بیشتری بر مهار رشد باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت نشان داد، در حالی که فراکشن آبی هیچ گونه تاثیری در مهار رشد باکتری‌های گرم منفی و مثبت نداشت. بر طبق طبقه‌بندی اروپایی، فرمولاسیون کرم محتوی ۵ درصد فراکشن اتیل استاتی با SPF=۲۰/۴۹ در طبقه محافظت نوری بالا قرار می‌گیرد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌تواند نویدبخش استفاده از جلبک قهوه‌ای *Padina* sp. به عنوان منبع ارزشمند ترکیبات محافظ در مقابل نور خورشید برای کاربردهای دارویی و آرایشی باشد.

کلیدواژه‌ها: فلوروتانن، فعالیت زیستی، ضدآفتاب، فاکتور حفاظت نوری.

*نویسنده مسئول: **مرتضی یوسف‌زادی**. پست الکترونیک: Morteza110110@gmail.com
آدرس: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-02-20]

[DOI: 10.30491/3.2.97]

مقدمه

اپیدرم هر دو گونه گیاهان و جانوران، به ویژه لایه سلولی بیرونی، دارای مکانیسم‌های سازگارکننده‌ای است که نقش مهمی در محافظت از نور دارد، زیرا این لایه اولین مانع در برابر آسیب‌های محیطی است. قرار گرفتن در معرض بیش از حد تابش خورشید، به ویژه تابش اشعه ماورای بنفش خورشیدی موج میانی (UV-B؛ ۲۹۰–۳۲۰ نانومتر)، اصلی‌ترین علت سرکوب سیستم ایمنی، پیری زودرس، ملانوما و تومورهای خوش‌خیم و بدخیم پوست در انسان است (۱). بیماری‌های پوستی هنگامی رخ می‌دهد که پرتوهای UV-B ظرفیت آنتی‌اکسیدان اپیدرم پوست را تحت‌الشعاع خود قرار می‌دهد که باعث افزایش فوتودینامیکی رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو و آسیب‌های بعدی متعاقب آن می‌شود (۲). از آنجایی که مرگ و میر ناشی از سرطان‌های پوست انسان در حال افزایش است، یافتن اقدامات پیشگیرانه در برابر عکس‌برداری و توسعه سرطان پوست ضروری است. استفاده از کرم ضدآفتاب از دوران کودکی و استفاده خوراکی یا موضعی آنتی‌اکسیدان‌ها، راه‌های احتمالی برای کاهش خطر بیماری‌های پوستی است (۱). علاوه بر این، همانطور که اخیراً با فروش مواد مغذی و در کل استفاده از داروهای سنتی منعکس شده است، تولید محصولات طبیعی نشان‌دهنده یک روش جایگزین مناسب برای مراقبت‌های بهداشتی پیشگیرانه پوست است (۳).

جذب بیش از حد فوتون‌ها و اشعه ماورای بنفش باعث ایجاد اختلالات تخریبی در انسان از جمله تشکیل رادیکال‌های آزاد و آسیب DNA شامل دایمرهای سیکلوبوتان پیریمیدین و محصولات فتوشیمیایی می‌شود (۴). در مقایسه با جانوران، گیاه از مکانیسم‌های خاصی مانند فیتوهورمون‌ها (پلی آمین‌ها) و سنتز پلی‌فنول برای کاهش چنین آسیب‌هایی استفاده می‌کند. پلی‌فنول‌ها، که متعلق به خانواده بزرگی از ترکیبات تولید شده توسط گیاهان هستند، به عنوان متابولیت‌های ثانویه در نظر گرفته می‌شوند. این ترکیبات در بسیاری از تعاملات بین گیاهان و محیط، نقش اساسی ایفا می‌نمایند (۵). ساختار هسته‌ای فنول‌ها بر پایه حلقه‌های معطر است که یک یا چند جایگزین هیدروکسیل دارند. این ویژگی به پلی‌فنول‌ها اجازه می‌دهد که توانایی جذب کل طیف UV-B از طول موج‌ها و بخشی از طیف‌های UV-A وUV-C را داشته باشند (۱).

ترکیبات پلی‌فنولی از گیاهان زمینی معمولاً از اسید گالیک و الاژیک گرفته می‌شود، پلی فنول‌های موجود در جلبک‌های دریایی از مولکول‌های ساده مانند اسیدهای فنولی تا ترکیبات بسیار پیچیده به نام فلوروتانین متفاوت است (۶). پلی‌فنول‌های موجود در جلبک‌های قهوه‌ای توسط واحدهای تکرارکننده فلوروگلوسینول تشکیل شده‌اند. فلوروتانن متابولیت‌های ثانویه هستند که در حین رشد به عنوان اجزای اصلی دیواره سلولی جلبک یا به عنوان یک ماده شیمیایی دفاعی در پاسخ به شرایط استرس غیرزنده و بیوتیک، مانند اشعه ماورای بنفش، چرای دام، عفونت باکتریایی و همچنین در داخل بدن، سنتز می‌شوند (۷). تجمع این فنول‌های مبتنی بر فلوروگلوسینول به فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی در برابر آسیب اکسیداسیون به واسطه رادیکال‌های آزاد کمک می‌کند. آنها همچنین فعالیت‌های زیستی بالقوه دیگری مانند فعالیت ضدباکتری، ضددیابت، ضدویروسی، ضدسرطانی و ضدآلرژی را نشان می‌دهند (۸). میزان فلوروتانن بین گونه‌های جلبک‌های قهوه‌ای بسیار متفاوت است و می‌توانند ۲۵–۱۲٪ از توده جلبکی خشک را تشکیل دهد. غلظت آنها به عوامل مختلفی از جمله فصل، قرار گرفتن در معرض خورشید، شوری یا مکان جغرافیایی بستگی دارد (۹). اگرچه گزارش‌های زیادی در مورد عصاره خام جلبک‌های قهوه‌ای منتشر شده است (۱۰،۱۱)، اما مطالعات کمی برای تخمین زیست فعال بودن ترکیبات فنولی از جمله فلوروتانن در مورد عصاره نیمه خالص جلبک‌های قهوه‌ای انجام شده است (۱۲،۱۳).

کشور ایران به لحاظ موقعیت جغرافیایی و بهره‌مندی از منابع شمال و جنوب کشور، از وجود گونه‌های مختلف جلبکی بهره‌مند است، در این میان، خلیج‌فارس با دما و شوری بالا، زیستگاه منحصر به فردی به لحاظ تنوع ماکروجلبک‌ها است. جنس‌های پادینا، سارگاسوم، آکانتوفورا، هیپنئا و اینترومورفا از جمله جلبک‌های خلیج‌فارس هستند. Padina، متعلق به خانواده Dictyotaceae، یک ماکروجلبک قهوه‌ای است که در ناحیه جزرومدی رشد می‌کند و کم و بیش در استان‌های هرمزگان و سیستان و بلوچستان در تمام فصول به چشم می‌خورد. این ماکروجلبک سرشار از پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و ترکیبات فعال زیستی از جمله پلی فنول‌ها هستند. گزارش‌هایی در مورد فعالیت‌های زیستی متعددی از جمله مهار رادیکال آزاد، ضدباکتری، ضدآلزایمر و ضددیابت آنها منتشر شده است (۱۴،۱۵).

با توجه به مطالب گفته شده، مطالعه حاضر با هدف جداسازی فراکشن‌های غنی از فلوروتانن از جلبک قهوه‌ای *Padina* sp. و همچنین مطالعه فعالیت بیولوژیکی آنها و تهیه فرمولاسیون کرم با فلوروتانن و اندازه‌گیری ضریب حفاظت نوری فرمولاسیون‌ها در محیط آزمایشگاه انجام شد.

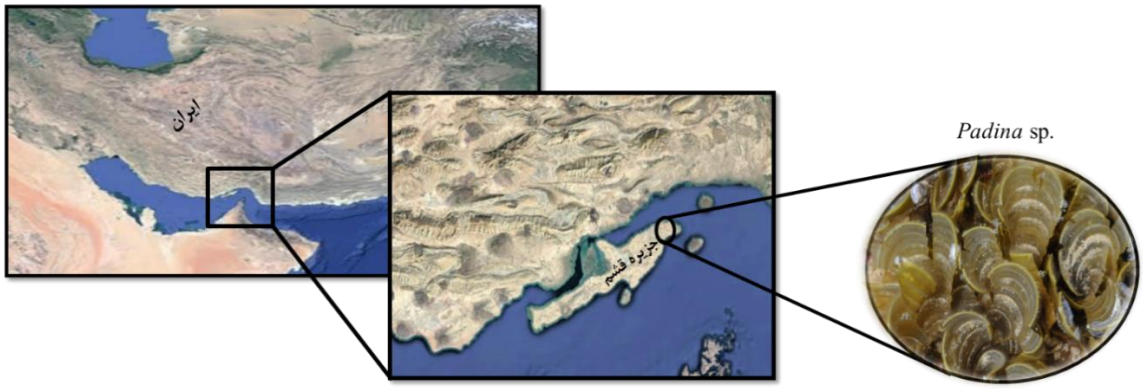
روش‌ها

نمونه برداری

ماکروجلبک *Padina* sp. در پاییز ۱۳۹۸ در استان هرمزگان، جزیره قشم (N "۵۷'۵۶°۲۶، E "۰۸'۱۶°۵۶)، در هنگام بیشینه جزرومد در امتداد خط ساحلی جمع‌آوری شد (شکل–۱). ماکروجلبک مورد استفاده در این مطالعه با کمک کلید شناسایی معتبر شناسایی شدند (۱۶). برای حذف شن، ماسه و اپی‌فیت‌ها، نمونه‌ها یک‌بار در آب دریا و سپس با آب مقطر شسته شدند. ماکروجلبک‌ها در دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز خشک و سپس آسیاب شدند.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-02-20]

[DOI: 10.30491/3.2.97]



شکل-۱. نقشه محل نمونه‌برداری ماکروجلبک قهوه‌ای در جزیره قشم خلیج فارس

استخراج فراکشن به روش کروماتوگرافی مایع- مایع

به‌منظور استخراج فراکشن‌های فلوروتانن، ۳۰ گرم پودر ماکروجلبک مورد مطالعه با ۳۰۰ میلی‌لیتر مخلوط آب/ اتانول (۵۰/۵۰) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط محیطی تاریک برای ۲ ساعت استیرر شد. پس از فیلتر کردن، مایع رویی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد روتاری شد تا به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسد. این عصاره به‌عنوان عصاره خام شناخته می‌شود.

عصاره خام به‌دست آمده در مرحله قبل (۱۰۰ میلی‌لیتر)، به ترتیب، جهت حذف لیپیدها با دی‌کلرومتان (۱:۱)، جهت حذف رسوبات با استون (۱:۳) و اتانول (۱:۳) شستشو داده شد. سپس حلال اتیل‌استات (۱:۱) روی باقی‌مانده ریخته شد. فراکشن‌های اتیل‌استاتی و آبی به کمک دستگاه روتاری (strike102، ایتالیا) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد جدا گردیدند و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شدند. لازم به ذکر است که در هر مرحله شستشو، حلال به کمک دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر و سپس در آب مقطر حل شد (۱۷).

اندازه‌گیری محتوی کل فلوروتانن

محتوی فلوروتانن فراکشن‌ها طبق روش رنگ‌سنجی ۲، ۴ دی متیل اکسی بنز الدهید (DMBA) اندازه‌گیری شد. در این روش، ابتدا محلول DMBA با حجم‌های برابر از معرف DMBA ۲ ٪ در استیک‌اسید (وزنی/حجمی) و هیدروکلریک اسید ۶ ٪ در استیک اسید (حجمی/حجمی) ساخته شد. در این آزمایش، ابتدا غلظت‌های مختلفی از فلوروگلوسینول (۴۶-۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌عنوان استاندارد تهیه گردید. در این روش ۵۰ میکرولیتر از غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فراکشن‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر از محلول DMBA مخلوط شد. مخلوط واکنش برای ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگه‌داری شد، سپس جذب محلول در طول موج ۵۱۵ نانومتر قرائت گردید. بلانک؛ ۵۰ میکرولیتر آب جایگزین نمونه شده و نمونه‌های کنترل؛ بدون محلول DMBA بودند (۱۸).

فعالیت زیستی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی فراکشن‌های اتیل‌استاتی و آبی با روش مهار رادیکال آزینو بیس اتیل تیازولین سولفونیک ($ABTS^{\bullet+}$) ارزیابی شد. به منظور تولید $ABTS^{\bullet+}$، ۷ میلی‌مولار پودر $ABTS^{\bullet+}$ و ۲/۴۵ میلی‌مولار پرسولفات پتاسیم در آب مقطر حل شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای محیط و در تاریکی نگه‌داری شد. محلول $ABTS^{\bullet+}$ با اتانول ۹۶٪ تا حدی رقیق شد که جذب آن در طول موج ۷۳۴ نانومتر، ۰/۷±۰/۰۲ شد. به آن ۰/۰۲ میلی‌لیتر از محلول فراکشن‌ها با غلظت‌های مختلف (۳-۲- ۱- ۰/۵- ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۱/۸ میلی‌لیتر محلول اتانولی $ABTS^{\bullet+}$ اضافه و مخلوط گردید. همچنین محلول $ABTS^{\bullet+}$ به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. بعد از ۶ دقیقه قرار دادن نمونه‌ها در دمای محیط، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که در کنترل، DMSO به‌جای محلول فراکشن و اتانول ۹۶٪ به عنوان بلانک استفاده گردید. برای رسم نمودار منحنی از آسکوربیک اسید با غلظت میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد (۱۹). درصد فعالیت مهار رادیکالی فراکشن‌ها براساس فرمول زیر به دست آمد:

درصد مهار رادیکال آزاد $=(A_c- A_s/ A_c) \times ۱۰۰$

در معادله بالا، A_s جذب مخلوط واکنش در زمان ۶ دقیقه و A_c جذب کنترل در زمان صفر است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول آسکوربیک اسید بر گرم وزن خشک عصاره (µmol/g) بیان شد (۱۹).

فعالیت ضدباکتریایی

فعالیت ضدباکتریایی فراکشن‌های اتیل‌استاتی و آبی با روش انتشار دیسک انجام شد. سویه‌های باکتریایی گرم مثبت *Micrococcus luteus* (ATCC 9341)، *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) و گرم منفی *Vibrio alginolyticus* (ATCC 17749) و *Escherichia coli* (ATCC 25922) از

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-02-20]
[DOI: 10.30491/3.2.97]

مؤسسه پاستور تهران تهیه شدند. به طور خلاصه، بعد از کشت فعال باکتری‌ها، جهت رشد آنها در محیط کشت نوترینت براث در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۴ ساعت انکوبه شد تا به غلظت ۰/۵ مک‌فارلند برسد. سپس، باکتری‌ها به کمک سوآپ استریل روی سطح پلیت‌های محتوی آگار کشیده شد. دیسک‌های با قطر ۶ میلی‌متر بر روی پلیت‌ها قرار گرفتند و ۲۰ میکرولیتر از هر یک از فراکشن‌ها با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی دیسک‌ها (۳ بار تکرار) تزریق شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد، قطرِ هالهِ مهارِ رشدِ باکتری‌ها اندازه‌گیری شد (۲۰).

فرمولاسیون کرم

کرم پایه محتوی (Glycerol and 1,2-Propanediol، Potassium hydroxide، Stearic acid، 1-Hexadecanol، Potassium cocoyl glycinate و Distilled glycerin monostearate) از داروخانه تهیه شد. ۲/۵ ٪ پودر اکسیدروی به کرم پایه اضافه و به مدت یک ساعت با همزن مکانیکی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد، این فرمولاسیون به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (فرمولاسیون ۱). در مرحله بعد، ۵ ٪ فراکشن اتیل استات به عنوان فیلتر زیستی به فرمولاسیون ۱ اضافه و برای یک ساعت دیگر در همان شرایط با همزن مکانیکی مخلوط شد (فرمولاسیون ۲). کرم پایه به عنوان فرمولاسیون ۳ در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت (۲۱).

اندازه‌گیری ضریب حفاظت نوری (SPF)

هر یک از فرمولاسیون‌های آماده شده را با غلظت ۲ mg/mL در اتانول حل کرده و از کاغذ صافی واتمن ۴۲ عبور داده، آنگاه توسط اسپکتروفتومتر، از ۳۲۰-۲۹۰ نانومتر، با فاصله ۵ نانومتر، اشعه به آن تابانده شده و جذب آن قرائت گردید. سپس از معادله‌ای که توسط Diffey و همکاران (۱۹۸۹) پیشنهاد شده، برای تعیین SPF استفاده گردید (۲۲). مقادیر استاندارد EE و I در جدول-۱ آمده است.

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه، تمامی آزمایشات در ۳ تکرار انجام شد و چگونگی همسان بودن پراش و پیروی داده‌ها از توزیع طبیعی توسط آزمون شاپیروویلک (Shapiro-Wilk test) بررسی گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و همچنین مقایسه میانگین به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح احتمال ۹۵ درصد توسط نرم‌افزار آماری SPSS 21 انجام شد. همچنین رسم نمودار با نرم‌افزار Excel 2013 صورت گرفت.

جدول-۱. مقادیری مورد استفاده در تعیین SPF توسط اسپکتروفتومتر (۲۲)

λ (nm)	$EE(\lambda)I(\lambda)$
۲۹۰	۰/۰۱۵۰
۲۹۵	۰/۰۸۱۷
۳۰۰	۰/۲۸۷۴
۳۰۵	۰/۳۲۷۸
۳۱۰	۰/۱۸۶۴
۳۱۵	۰/۰۸۳۹
۳۲۰	۰/۰۱۸۰

$$\mathbf{SPF} = CF \sum_{290}^{320} EE(\lambda)I(\lambda)\ abs(\lambda)$$

در معادله بالا CF برابر ۱۰، EE؛ اثرات اریتم زایی، I؛ شدت نور خورشید، λ؛ طول موج است.

نتایج

اندازه‌گیری محتوی کل فلوروتانن

محتوی فلوروتانن فراکشن اتیل‌استاتی استخراج شده از جلبک *Padina* sp. در میلی‌گرم فلوروگلوسینول بر گرم ماده خشک جلبک ۹/۲±۰/۷ محاسبه شد. محتوی فلوروتانن فراکشن آبی بسیار ناچیز و قابل چشم‌پوشی بود.

فعالیت زیستی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مقایسه درصد مهار رادیکال آزاد ABTS فراکشن‌های ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina* Sp. با آسکوربیک اسید (به عنوان کنترل مثبت) در شکل-۲ آمده است. از مقایسه بین دو فراکشن مورد آزمایش فراکشن اتیل‌استاتی در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین و فراکشن اتیل‌استاتی در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای کمترین میزان مهار رادیکال آزاد ABTS است. فراکشن‌های اتیل‌استاتی و آبی این ماکروجلبک در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای میزان قابل توجهی مهار رادیکال آزاد ABTS هستند. نتایج نشان داد که بین نمونه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌دار است (P≤۰/۰۵).

فعالیت ضدباکتریایی

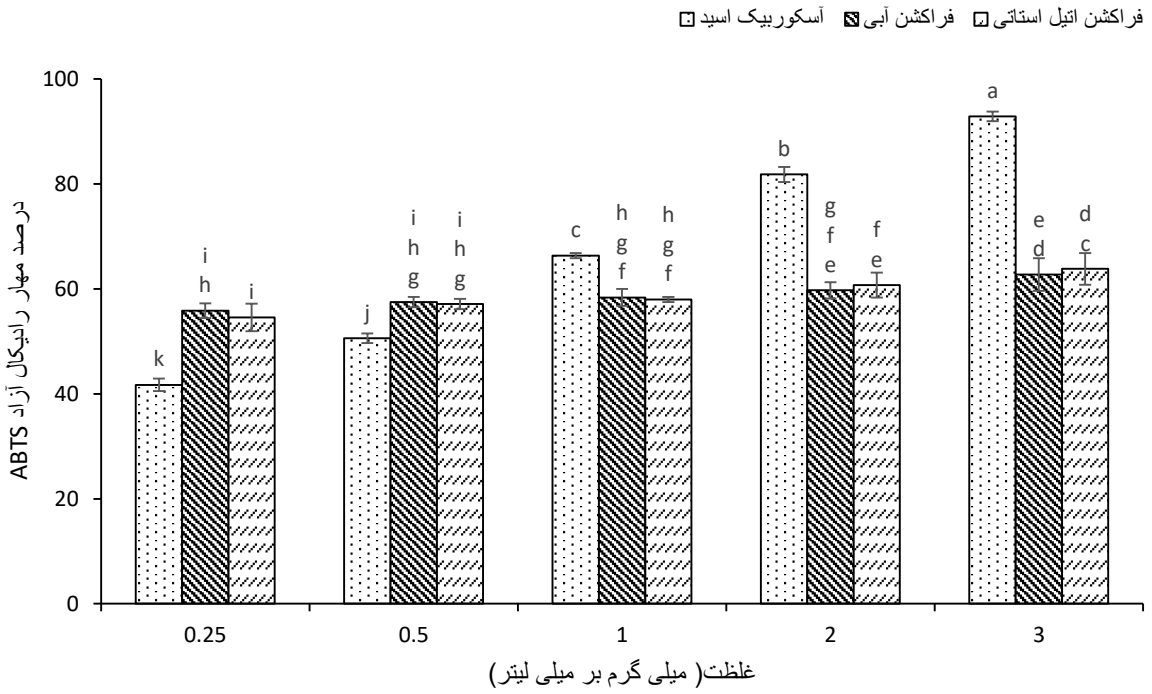
نتایج آزمون حساسیت به روش انتشار دیسک در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فراکشن‌های اتیل‌استاتی و آبی جلبک قهوه‌ای *Padina* Sp. در شکل ۳ ارائه شده است. فراکشن اتیل‌استاتی بیشترین مهار رشد را بر روی باکتری گرم منفی *E. coli* و کمترین مهار رشد را بر روی باکتری گرم مثبت *S. aureus* نشان داد. فراکشن آبی بر روی باکتری‌های مورد آزمایش هیچ‌گونه خاصیت ضدباکتریایی از خود نشان نداد. آمپی‌سیلین (به عنوان کنترل مثبت) بالاترین فعالیت ضدباکتریایی را در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-02-20]

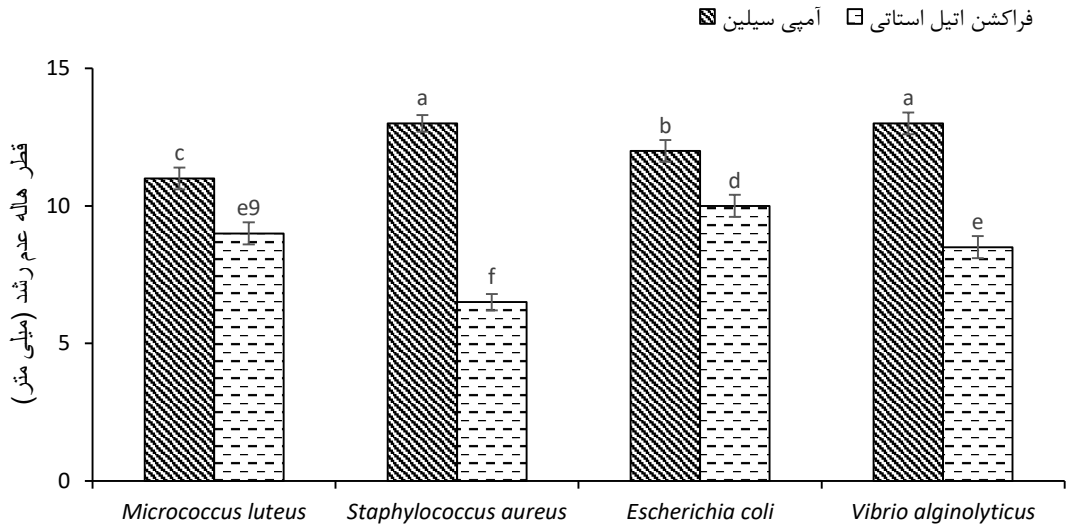
[DOI: 10.30491/3.2.97]

اندازه‌گیری ضریب حفاظت نوری

میزان حفاظت نوری فراکشن اتیل استات (فرمولاسیون ۲) با میزان حفاظت نوری کرم پایه (فرمولاسیون ۳) و کنترل منفی (فرمولاسیون ۱) در شکل ۴ مقایسه شده است. میزان حفاظت نوری فرمولاسیون محتوی فراکشن اتیل استاتی غنی از فلوروتانن ۲۰/۴۹ محاسبه شد. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که در بین فرمولاسیون‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P≤ ۰/۰۵).



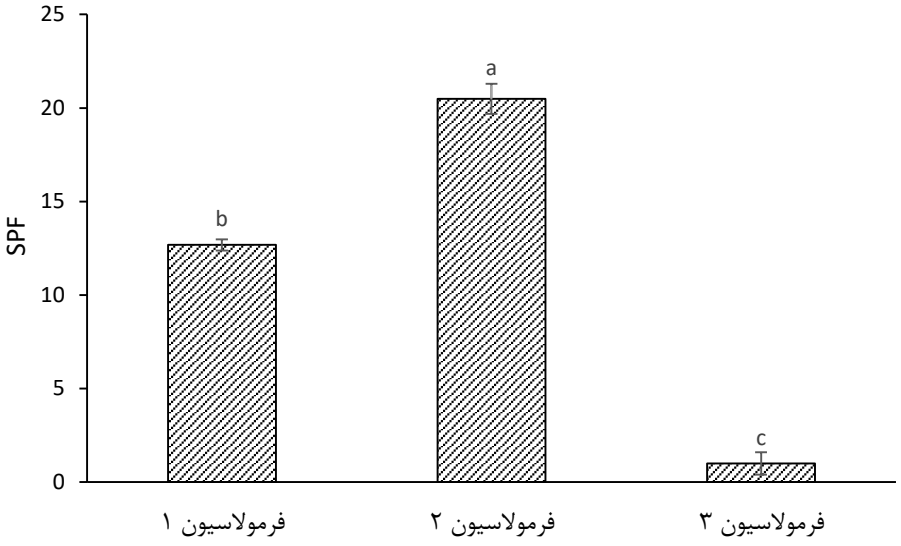
شکل-۲. درصد مهار رادیکال آزاد ABTS فراکشن‌های اتیل استاتی و آبی جلبک *Padina* sp. حروف ناهمسان اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهند.



شکل-۳. فعالیت ضدباکتریایی فراکشن اتیل استاتی جلبک *Padina* sp. و آمپی‌سیلین (به عنوان کنترل مثبت). حروف ناهمسان اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهند.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-02-20]

[DOI: 10.30491/3.2.97]



شکل-۴. مقایسه میزان حفاظت نوری فرمولاسیون‌های مختلف در آزمایشگاه. حروف ناهمسان اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهند.

بحث

ترکیبات پلی‌فنولی توانایی جذب نور و محافظت از پوست در برابر اشعه را دارند و می‌توانند نقش یک ماده محافظ در برابر سرطان پوست را ایفا نمایند (۳). Le Lann و همکاران، Montero و همکاران، Liu و همکاران و Obluchinskaya و همکاران میزان ترکیبات پلی‌فنولی، به ویژه فلورتانین را در جلبک‌های قهوه‌ای ارزیابی کردند و نشان دادند که مقدار این ترکیبات در فراکشن‌های اتیل استات یا در عصاره‌های نیمه قطبی بیشتر از سایر فراکشن‌ها و عصاره‌ها است (۸،۱۲،۲۱،۲۳)، بنابراین، به نظر می‌رسد که فلورتانین یک ترکیب نیمه قطبی تا قطبی است. نتایج این مطالعه نیز نشان داد که فراکشن اتیل‌استاتی دارای میزان بیشتری فلوروتانن نسبت به فراکشن آبی است که با نتایج سایر مطالعات انجام شده در این زمینه مطابقت دارد. محتوای پلی‌فنول‌ها و فلورتانن در جلبک‌های مختلف قهوه‌ای مختلف به موقعیت جغرافیایی و قرار گرفتن در معرض UVR بستگی دارد، با این حال، مطالعه فراکشن‌های نیمه خالص دارای مزایای مختلفی در مقایسه با ترکیبات خالص مانند ارائه تعادل بین غلظت ترکیبات فعال به دست آمده، بازده بالای استخراج، حفظ پتانسیل همکاری بین ترکیبات فعال و مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادی برای کاربردهای مختلف صنعتی، از جمله فرمولاسیون‌های لوازم آرایشی است (۱۲،۲۴).

مطالعات بسیاری بیان کردند که موثرترین فاکتور آنتی‌اکسیدان در جلبک‌های قهوه‌ای، ترکیبات پلی‌فنولی است که در این میان فلوروتانن و فوکوگزانتین قوی‌ترین هستند (۱۲،۲۱،۲۳). ترکیبات پلی‌فنولی در جلبک‌های دریایی در همبستگی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و وابسته به حلال و همچنین گونه جلبکی هستند که برای عصاره‌گیری استفاده می‌شوند. اتیل استات به عنوان یکی از حلال‌های مناسب برای جداسازی فراکشن غنی از فلوروتانن از جلبک‌های دریایی مطرح شده است (۸). مطالعات قبلی ما نشان داد که با افزایش میزان ترکیبات پلی‌فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد (۲۵-۲۹). اکسیداسیون به واسطه رادیکال‌های آزاد در ارگانیسم‌های هوازی رخ می‌دهد (۲۱). به عنوان یک تعریف کلی، آنتی‌اکسیدان هر ماده‌ای است که قادر به جلوگیری از اکسیداسیون باشد. با این حال، با محدود شدن استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی، علاقه به یافتن منابع طبیعی برای رویکردهای درمانی افزایش یافته است (۳۰). آنتی‌اکسیدان‌هایی که پاکسازی رادیکال آزاد را انجام می‌دهند، بسته به نوع ترکیب آنتی‌اکسیدان، رادیکال پایدار انتخاب شده و شرایط واکنش، رادیکال‌های آزاد را پیش از حمله به مولکول‌های بیولوژیک مهم بدن، از طریق انتقال هیدروژن یا انتقال الکترون و به دنبال آن انتقال پروتون، پاکسازی می‌کنند. آزمون آنتی‌اکسیدانی آزینو بیس اتیل تیازولین سولفونیک، رادیکال آزاد سنتزی است که پتانسیل آنتی‌اکسیدانی را در فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیبات قطبی و غیرقطبی اندازه‌گیری می‌کند. فعالیت مهار ABTS فراکشن اتیل استاتی غنی از فلوروتانن از جلبک قهوه‌ای *Padina* sp. با فعالیت مهار ABTS ترکیبات پلی‌فنولی استخراج شده با حلال اتانول از جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* کاملاً همپوشانی داشت (۳۱).

در باکتری‌های گرم‌منفی، غشای خارجی به عنوان یک سد در مقابل تعداد زیادی اجسام خارجی مانند آنتی‌بیوتیک عمل می‌کنند. باکتری‌های گرم‌منفی به دلیل داشتن لایه لیپوپلی‌ساکاریدی غشای خارجی و همچنین داشتن کانال‌های درگیر در حمل و نقل مواد، ذاتاً نسبت به مواد سمی و رنگ‌های آب‌دوست و آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت بیشتری دارند. نوع حلال مورد استفاده برای استخراج، بیشترین تأثیر را بر فعالیت ضدباکتریایی دارد. حلال‌هایی با قطبیت کمتر نتایج بهتری نسبت به حلال‌هایی با قطبیت بیشتر دارند. نتایج

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-02-20]
[DOI: 10.30491/3.2.97]

این مطالعه نشان داد که فراکشن اتیل استاتی به دلیل حضور فلوروتانن توانایی بیشتری در مهار رشد باکتری‌های گرم منفی دارد (شکل-۳). بسیاری از مطالعات فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف جلبک قهوه ای را گزارش کرده‌اند که این فعالیت مربوط به ترکیبات پلی‌فنولی است (۲۷). در حالی که مطالعات کمی در مورد فعالیت ضدباکتریایی فراکشن‌های غنی از فنول انجام شده است (۸،۳۲). همچنین، فراکشن اتیل استاتی *Halidrys siliquosa* دارای فعالیت ضدباکتری در مقابل *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (۸)، و فراکشن اتیل استاتی از *Ecklonia kurome* دارای فعالیت ضدباکتری در مقابل ۳۵ سویه از جمله *S. aureus* است (۳۳).

فلوروتانن‌های موجود در جلبک‌های دریایی عملکرد محافظتی ضدآفتاب دارند. قرار گرفتن بیش از حد پوست انسان در معرض اشعه ماورا بنفش منجر به تشکیل زودرس چین و چروک، خشکی، از بین رفتن کلاژن می‌شود و ممکن است از طریق جهش‌زایی به توسعه سرطان کمک کند. یک ماده ضدآفتاب ایده‌آل باید اشعه ماورای بنفش را منعکس، جذب و پخش کند، از پوست در برابر استرس اکسیداتیو و ایجاد سرطان محافظت کند (۳۴). با در نظر گرفتن داده‌های این مطالعه و پتانسیل بیولوژیکی فراکشن اتیل‌استاتی غنی از فلوروتانن حاصل از جلبک قهوه‌ای *Padina* sp.، ما یک فرمولاسیون کرم تهیه کردیم و میزان محافظت نوری آن را در آزمایشگاه مطالعه نمودیم. Ferrero برای تعیین کمیت و توصیف خصوصیات محافظت نوری فرمولاسیون‌های ضدآفتاب شاخص مطلق و نسبی را شناسایی کرده است (۳۵). یکی از شاخص‌های مطلق مورد استفاده در آزمایشگاه، فاکتور محافظت نوری (SPF) است. اثرات فرمولاسیون‌های ضدآفتاب در برابر اشعه ماورای بنفش با مقادیر SPF در شکل ۴ نشان داده شده است. فرمولاسیون ۳ که کرم پایه است، SPF = ۰/۹۸ را نشان داد. میزان SPF فرمولاسیون ۱ اهمیت اکسیدروی (به عنوان فیلتر فیزیکی) برای محافظت در مقابل اشعه ماورای بنفش را نشان می‌دهد، در حالی که اضافه کردن فراکشن اتیل استاتی (فرمولاسیون ۲) منجر به افزایش ۱/۵ برابری SPF در مقایسه با فرمولاسیون ۱ می‌شود. فیلترهای شیمیایی که اغلب در بسیاری از کرم‌های ضدآفتاب استفاده می‌شود، دارای عناصر سرطان‌زا هستند. در این میان می‌توان به بنزوفنون (Benzophenone)، آووبنزون (Avobenzone) و تری‌اتانول‌آمین (Triethanolamine) اشاره کرد. استفاده از فیلترهای شیمیایی برای محافظت در مقابل اشعه ماورای بنفش با غلظت ۲-۱۰ درصد توصیه می‌شود. در این مطالعه فراکشن اتیل استاتی غنی از فلوروتانن (به عنوان فیلتر زیستی) با غلظت ۵ درصد جایگزین فیلترهای شیمیایی در فرمولاسیون کرم ضدآفتاب شد (۱۳). طبق مونوگراف FDA، محصولات ضدآفتاب با ۲ ≤ SPF < ۱۲ دارای محافظت کم در برابر اشعه ماورای بنفش، ۱۲≤ SPF < ۳۰ محافظت متوسط و ۳۰ ≤ SPF محافظت بالایی دارند. بنابراین، مقدار ۲۰ ~ SPF نشان می‌دهد که فرمولاسیون مطابق طبقه‌بندی اروپایی و مونوگراف FDA در طبقه محافظت نوری بالا قرار می‌گیرد (http://www.thaicosmetic.org/documents/final-PresentationUVA.pdf).

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان ماکروجلبک *Padina* sp. را به عنوان یک ماکروجلبک قهوه‌ای غنی از فلوروتانن معرفی کرد که دارای پتانسیل زیستی از جمله مهار رادیکال آزاد، ضدباکتریایی و محافظت در مقابل اشعه ماورای بنفش است. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد این ماکروجلبک به عنوان یک فیلتر زیستی در فرمولاسیون کرم‌ها از جمله کرم ضدآفتاب به‌کار رود.

نتیجه‌گیری

جلبک قهوه‌ای *Padina* sp. غنی از فلورتانن است که به دلیل نیمه قطبی بودن فلوروتانن، مقادیر بالای این ترکیب در فراکشن اتیل استاتی مشاهده شد. نتایج این مطالعه تایید کرد که فراکشن اتیل استاتی دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال آزاد است و می‌تواند بدن را در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت کند. اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی فراکشن‌های مورد مطالعه به‌طور مستقیم به میزان فلوروتانن موجود در فراکشن ارتباط دارد. همچنین، استفاده از فراکشن اتیل‌استاتی در فرمولاسیون کرم در مقایسه با سایر فرمولاسیون‌های مورد مطالعه، حفاظت نوری بالاتری را نشان داد. نتایج به‌دست آمده می‌تواند نویدبخش استفاده از جلبک قهوه‌ای *Padina* sp. به عنوان منبع طبیعی و ارزشمند جایگزین ترکیبات شیمیایی محافظ در مقابل نور خورشید برای کاربردهای دارویی و آرایشی باشد.

تشکر و قدردانی: این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور با شماره طرح ۹۶۰۰۳۶۳۹ انجام پذیرفت. بدین وسیله نویسندگان از همکاری و مساعدت بی‌دریغ ایشان و تمامی عزیزانی که در مراحل انجام کار ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

نقش نویسندگان: همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-02-20]

[DOI: 10.30491/3.2.97]

منابع

1. Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru T, Horikawa T. UV-induced skin damage. Toxicology. 2003;189(1-2):21-39. doi:10.1016/S0300-483X(03)00150-1
2. Bennet D, Kang SC, Gang J, Kim S. Photoprotective effects of apple peel nanoparticles. International Journal of Nanomedicine. 2014; 9(2): 93-98. doi:10.2147/IJN.S54048
3. Saewan N, Jimtaisong A. Natural products as photoprotection. Journal of Cosmetic Dermatology. 2015;14(1):47-63. doi:10.1111/jocd.12123
4. Heo S, Hwang HS, Jeong Y, Na K. Skin protection efficacy from UV irradiation and skin penetration property of polysaccharide-benzophenone conjugates as a sunscreen agent. Carbohydrate Polymers. 2018; 195(6):534-41. doi:10.1016/j.carbpol.2018.05.010
5. Cotas J, Leandro A, Monteiro P, Pacheco D, Figueirinha A, Gonçalves AM, Silva GJ, Pereira L. Seaweed phenolics: From extraction to applications. Marine Drugs. 2020;18(8):384-391. doi:10.3390/md18080384
6. Dang TT, Bowyer MC, Van Altena IA, Scarlett CJ. Comparison of chemical profile and antioxidant properties of the brown algae. International Journal of Food Science & Technology. 2018;53(1):174-81. doi:10.1111/ijfs.13571
7. Li Y, Fu X, Duan D, Liu X, Xu J, Gao X. Extraction and identification of phlorotannins from the brown alga, Sargassum fusiforme (Harvey) Setchell. Marine Drugs. 2017;15(2):49-56. doi:10.3390/md15020049
8. Le Lann K, Surget G, Couteau C, Coiffard L, Cérantola S, Gaillard F, Larnicol M, Zubia M, Guérard F, Poupart N, Stiger-Pouvreau V. Sunscreen, antioxidant, and bactericide capacities of phlorotannins from the brown macroalga Halidrys siliquosa. Journal of Applied Phycology. 2016; 28(6):3547-59. doi:10.1007/s10811-016-0853-0
9. Mancuso F, Messina C, Santulli A, Laudicella V, Giommi C, Sarà G, Airoldi L. Influence of ambient temperature on the photosynthetic activity and phenolic content of the intertidal Cystoseira compressa along the Italian coastline. Journal of Applied Phycology. 2019;31(5):3069-76. doi:10.1007/s10811-019-01802-z
10. Bittkau KS, Neupane S, Alban S. Initial evaluation of six different brown algae species as source for crude bioactive fucoidans. Algal Research. 2020;45(2):101759. doi:10.1016/j.algal.2019.101759
11. Catarino MD, Silva A, Mateus N, Cardoso SM. Optimization of phlorotannins extraction from Fucus vesiculosus and evaluation of their potential to prevent metabolic disorders. Marine Drugs. 2019; 17 (3):162- 170. doi:10.3390/md17030162
12. Montero L, Sánchez-Camargo AP, García-Cañas V, Tanniou A, Stiger-Pouvreau V, Russo M, Rastrelli L, Cifuentes A, Herrero M, Ibáñez E. Anti-proliferative activity and chemical characterization by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry of phlorotannins from the brown macroalga Sargassum muticum collected on North-Atlantic coasts. Journal of Chromatography A. 2016;1428 (3):115-25. doi:10.1016/j.chroma.2015.07.053
13. Surget G, Stiger-Pouvreau V, Le Lann K, Kervarec N, Couteau C, Coiffard LJ, Gaillard F, Cahier K, Guérard F, Poupart N. Structural elucidation, in vitro antioxidant and photoprotective capacities of a purified polyphenolic-enriched fraction from a saltmarsh plant. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2015; 143:52-60. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.12.018
14. Rahman F, Alim A, Ahsan T, Islam T, Alam M, Hossain MN. Screening of potential bioactive compounds from Padina Gymnospora found in the coast of st. martin island of Bangladesh. Journal of Marine Biology and Aquaculture. 2021;6(1):1-7.
15. Maggio A, Alduina R, Oddo E, Piccionello AP, Mannino AM. Antibacterial activity and HPLC analysis of extracts from Mediterranean brown algae. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. 2020;5(1):1-8. doi:10.1080/11263504.2020.1829737
16. Mačić V, Antolić B, Žuljević A. A Checklist of the Benthic Marine Macroalgae in Montenegrin Coastal Waters. 2021;1-8. doi:10.1007/698_2020_720
17. Le Lann K, Jegou C, Stiger-Pouvreau V. Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: comparison of the frondose Sargassum muticum (Yendo) Fensholt and the cylindrical Bifurcaria bifurcata R. Ross. Phycological Research. 2008;56(4):238-45. doi:10.1111/j.1440-1835.2008.00505.x
18. Stiger-Pouvreau V, Jegou C, Cerantola S, Guérard F, Le Lann K. Phlorotannins in Sargassaceae species from Brittany (France): interesting molecules for ecophysiological and valorisation purposes. Advances in Botanical Research. 71: Elsevier; 2014. pp. 379-411. doi:10.1016/B978-0-12-408062-1.00013-5
19. Gülcin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Archives of Toxicology. 2012;86(3):345-91. doi:10.1007/s00204-011-0774-2
20. Gülcin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Archives of Toxicology. 2012;86(3):345-91. doi:10.1007/s00204-011-0774-2
21. Liu N, Fu X, Duan D, Xu J, Gao X, Zhao L. Evaluation of bioactivity of phenolic compounds from the brown seaweed of Sargassum fusiforme and development of their stable emulsion. Journal of Applied Phycology. 2018; 30 (3):1955-1970. doi:10.1007/s10811-017-1383-0
22. Diffey B, Robson J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. Journal of the Society of Cosmetic Chemists. 1989;40(3):127-33.
23. Obluchinskaya E, Daurtseva A, Pozharitskaya O, Flisyuk E, Shikov A. Natural deep eutectic solvents as alternatives for extracting phlorotannins from

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-02-20]

[DOI: 10.30491/3.2.97]

brown algae. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2019;53(3):243-7. doi:10.1007/s11094-019-01987-0
24. Monsalve-Bustamante YA, Puertas-Mejia MA, Mejia-Giraldo JC. Comparison of the photoprotective effect between hydrolyzed and aglycones flavonoids as sunscreen: A systematic review. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2020;10(1):116-23. doi:10.7324/JAPS.2020.101016
25. Soleimani S, Moein S, Yousefzadi M, Amrollahi Bioki N. Determination of in vitro antioxidant properties, anti-inflammatory effects and A-amylase inhibition of purple sea urchin extract of Echinometra mathaei from the Persian Gulf. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 2017;12(3): e36547. doi:10.5812/jjnpp.36547
26. Soleimani S, Pirian K, Zarei Jeliani Z, Arman M, Yousefzadi M. Bioactivity assessment of selected seaweeds from the Persian Gulf, Iran. Journal of Aquatic Ecology. 2018;7(3):25-38.
27. Soleimani S, Pirian K, Zarei Jeliani Z, Arman M, Yousefzadi M. Bioactivity assessment of selected seaweeds from the Persian Gulf, Iran. Journal of Aquatic Ecology. 2018;7(3):25-38.
28. Soleimani S, Yousefzadi M, Rezadoost H, Bioki NA. Identification and antioxidant of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from sea urchin pigments of Echinometra mathaei. Medicinal Chemistry Research. 2016;25(7):1476-83. doi:10.1007/s00044-016-1586-y
29. Zarei Jeliani Z, Soleimani S, Pirian K, Amiri Moghadam SH, Yousefzadi M. Analysis of Bioactive Compounds in Some Marine Seaweeds along the Coastline of Bandar Abbas, Iran. Journal of Phycological Research. 2020;4(1):444-57. doi:10.29252/JPR.4.1.444
30. Mitterer-daltoe M, Bordim J, Lise C, Breda L, Casagrande M, Lima V. Consumer awareness of food antioxidants. Synthetic vs. Natural. Food Science and Technology. 2021;41(1):208-12. doi:10.1590/fst.15120
31. Borazjani NJ, Tabarsa M, You S, Rezaei M. Improved immunomodulatory and antioxidant properties of unrefined fucoidans from Sargassum angustifolium by hydrolysis. Journal of Food Science and Technology. 2017;54(12):4016-25. doi:10.1007/s13197-017-2867-2
32. Lee JH, Eom SH, Lee EH, Jung YJ, Kim HJ, Jo MR, et al. In vitro antibacterial and synergistic effect of phlorotannins isolated from edible brown seaweed Eisenia bicyclis against acne-related bacteria. Algae. 2014;29(1):47. doi:10.4490/ALGAE.2009.24.1.047
33. Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga Ecklonia kurome. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2002;50(6):889-93. doi:10.1093/jac/dkf222
34. Stiger-Pouvreau V, Guerard F. Bio-inspired molecules extracted from marine macroalgae: a new generation of active ingredients for cosmetics and human health. Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules. 2018;2 (3):709-746. doi:10.1002/9783527801718.ch22
35. Ferrero L, Pissavini M, Dehais A, Marguerie S, Zastrow L. Importance of substrate roughness for in vitro sun protection assessment. International Journal of Cosmetic Science. 2007;29(1):59-68. doi:10.1111/j.1467-2494.2007.00340_2.x

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-02-20]

[DOI: 10.30491/3.2.97]