گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۸، دوره ۲۱، صفحه ۲۴۱-۲۳۷

بررسی اثرات ضدمیکروبی نانوذرات اکسید آهن سنتز شده با استفاده از عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس کازئی

پرستو ترابیان (MSc)[۱]، فرشته قندهاری (PhD) [۱*]، مهنوش فاطمی (PhD)[۲]

۱-گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاداسلامی، اصفهان، ایران
۲-گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاداسلامی، اصفهان، ایران

دریافت: ۹۷/۲/۱۱، اصلاح: ۹۷/۹/۳، پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۴

خلاصه

سابقه و هدف: باتوجه به مقاومت های دارویی تحقیق در مورد کشف مواد ضد میکروبی جدید ازجمله نانوذرات مورد توجه قرار گرفته است. در سنتز سبز از منابع بیولوژیک از قبیل باکتری‌ها برای ساخت نانوذرات فلزی استفاده می‌شود. در این تحقیق از عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس کازیی برای تولید نانوذره اکسید آهن استفاده و اثرات ضد میکروبی آن بر روی سویه های استاندارد اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس آرئوس بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تحقیقی عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس کازئی با محلول سولفات آهن ۳-۱۰ مولار مخلوط و به مدت ۳هفته در دمای$^{\circ}$c ۳۷ و در حضور ۵٪ دی‌اکسیدکربن انکوبه گردید. سنتز نانوذرات اکسید آهن به وسیله میکروسکوپ الکترونی و آنالیز پراش پرتو ایکس بررسی و اثرات ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده، با رقت های ۱۰ و ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بر روی سوش استاندارد استافیلوکوکوس آرئوس و اشرشیاکلی بررسی گردید.

یافته‌ها: سنتز کریستالهای نانو اکسید آهن باتوجه به آنالیز XRD تایید و اسکن میکروسکوپ الکترونی گذاره میانگین نانوذرات سنتز شده را حدود ۱۵ نانومتر و شکل آنها را کروی تعیین نمود. نتایج حاصل از اثرات ضد میکروبی نشان داد که نانوذرات اکسید آهن درغلظت ۱۰۰و۱۰۰۰ µg/ml اثر مهاری برابربا ۱۲/۰۳±۰/۳۲ و ۱۶±۰/۵ بر رشد استافیلوکوکوس آرئوس داشت وتنها در غلظت بالاتر معنی دار بود($p\leq$۰/۰۰۱). در حالیکه علیه باکتری اشرشیاکلی فاقد اثر مهاری بود.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که تولید نانوذرات اکسید آهن با استفاده از عصاره سیتوپلاسمی یک روش بیولوژیک ایمن در پزشکی و فارموکولوژی می‌باشد و شاید بتوان از آن به عنوان یک کاندیدای مناسب جهت درمان عفونت‌های میکروبی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: نانوذره اکسیدآهن، بیوسنتز نانوذرات، لاکتوباسیلوس کازئی، استافیلوکوکوس آرئوس.

مقدمه

امروزه پژوهشگران از سیستم‌های زیستی برای تولید نانوذرات، که دارای حداقل خطرات زیست محیطی بوده و روش‌های تولید ساده و سازگار با محیط زیست دارند، استفاده می‌کنند (۱). در این علم محققان ازمنابع بیولوژیک، شامل میکروارگانیسم‌ها، عصاره گیاهی و متابولیت‌های آنها استفاده می‌کنند (۲و۳). درسال‌های اخیر به دنبال استفاده گسترده از داروهای رایج برای درمان انواع بیماری‌ها به ویژه عفونت‌های میکروبی و سرطان‌ها، مشکلات متعددی ازجمله مقاومت دارویی و عوارض جانبی ناشی ازداروهای شیمی درمانی رو به گسترش است. آنتی بیوتیک‌ها دارای این ویژگی هستند که استفاده مکرر، آنها را از رده خارج می‌کند و همچنین این واقعیت با چالش‌هایی هم چون پیدا کردن داروهای آنتی بیوتیک جدید سبب شده که کشف آنتی بیوتیک جدید برای صنعت داروسازی علی-رغم نیازهای بالینی، اولویت پایینی داشته باشد. امروزه مقاومت میکروبی و عوارض ناشی از شیمی درمانی یک نگرانی مهم در بین پژوهشگران ایجاد کرده و ضرورتاً آنها را به سوی استفاده از داروهای جایگزین سوق داده است. بنابراین صنایع داروسازی تلاش خود را برای یافتن داروهای ایمن، غیرسمی و موثر برای درمان عفونت‌های باکتریایی و کاهش عوارض ناشی از شیمی درمانی متمرکز کرده است(۶-۴). هدف از این تحقیق تولید نانوذرات اکسید آهن با استفاده از عصاره باکتری لاکتوباسیلوس کازئی، به عنوان یک باکتری پروبیوتیک و تاثیر ان بر دو سوش استاندارد باکتری استافیلوکوک آرئوس و اشرشیاکلی می باشد.

مواد و روش ها

لاکتوباسیلوس کازیی با شناسه (PTCC 1608) از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. عصاره سیتوپلاسمی به روش freeze- thaw تهیه و به محلول آبی اکسید آهن ۳-۱۰ مولار اضافه شد و پس از تنظیم pH محلول در ۵/۶، به مدت ۳ هفته در دمای ۳۷$^{\circ}$C و در تاریکی انکوبه گردید (۷و۸). در پایان محلول واکنش توسط دستگاه خشک کن به پودر تبدیل و

▣ این مقاله حاصل پایان نامه پرستو ترابیان دانشجو رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحدفلاورجان می باشد.
*مسئول مقاله: دکتر فرشته قندهاری
آدرس: اصفهان، فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی. تلفن: ۰۳۱-۳۷۴۲۰۱۴۰
E-mail: Ghandehari@iaufala.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.37.2]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.237]

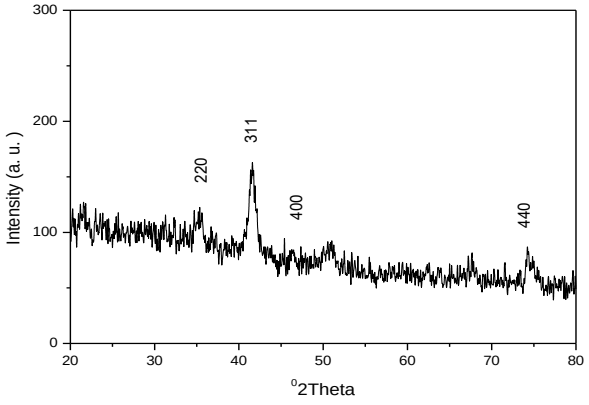
برای بررسی تولید نانو ذرات از دستگاه پراش پرتو ایکس مدل (Philips1×1800) استفاده شد. نمونه بر روی بستر شیشه‌ای قرار داده شد و اسکن با زاویه 2θ و محدوده ۲۰ تا ۸۰ درجه انجام شد. ولتاژ استفاده شده ۴۰KV و جریان ۳۰میلی آمپر بود. اندازه ذرات با ستفاده از رابطه دبای شرر و از طریق فرمول زیر محاسبه گردید(۹و۱۰):

$$D= 0.9\lambda/\beta\cos\theta$$

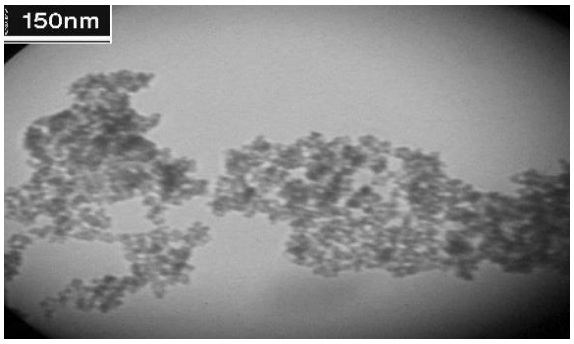
جهت بررسی شکل و اندازه نانو ذرات از میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل (Philips 208S 100Kv, Netherlands) استفاده شد(۱۰و۹). سوش استاندارد باکتری استافیلوکوک آرئوس (ATCC۲۵۹۲۳) و اشرشیاکلی (ATCC۲۵۹۲۲) خریداری شده از شرکت داروش تهران بر روی محیط کشت بلاد اگار و محیط کشت مک کانکی آگار کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°c انکوبه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک-فارلند به روش جارویی بر روی محیط کشت مولر هینتون اگار کشت داده و در سطح محیط چاهک‌های به قطر ۶ میلی متر حفر و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات تلقیح گردید. ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بیوتیک سفالکسین (۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه در دمای ۳۷ °c قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. تمام داده‌ها توسط آزمون آماری واریانس یک طرفه و تست measure Repeat، توسط نرم افزار SPSS۲۰۱۶ تجزیه و تحلیل شدند و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

رنگ محلول سولفات آهن بعد از احیاء یون آهن توسط عصاره سیتوپلاسمی از بی رنگ به سیاه تغییر یافت. شدت رنگ به دلیل ارتعاشات پلاسمون سطحی فعال در نانوذرات اکسید آهن می باشد. نمودار به دست آمده از پراش پرتو ایکس وجود نانوذرات اکسیدآهن را تائید نمود (شکل ۱). یافته های به دست آمده از پراش اشعه ایکس در زاویه اسکن 2θ و در درجه ۲۰ تا ۸۰ چهار پیک به ترتیب۲۲۰، ۳۱۱، ۴۰۰و ۴۴۰ نشان داد که با الگوی نمونه اکسیدآهن تطابق داشته و اندازه نانوذرات بعد از محاسبه با فرمول دبای شرر ۱۵ نانومتر به دست آمد که با اندازه آنالیز بدست آمده از XRD همخوانی داشت (شکل ۲). تصویر۲ نشان می‌دهد که شکل نانوذرات کروی و اندازه نانوذرات به طور متوسط بین ۱۰–۱۵ نانومتر است که با اندازه به دست آمده از آنالیز XRD هم خوانی دارد.

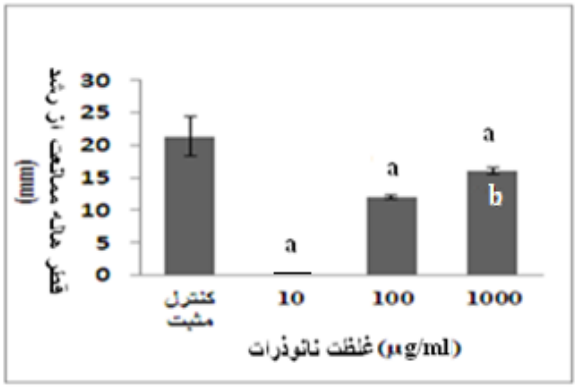


شکل ۱. منحنی پراش پرتوایکس ، اندازه نانو ذرات را ۱۵ نانومتر نشان داد



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی شکل نانو ذرات را کروی و میانگین اندازه آن را ۱۵– ۱۰ نانومتر نشان داد. Bar=150 nm

نتایج حاصل از اثرات ضد میکروبی به روش چاهک پلیت نشان داد که نانوذرات اکسید آهن دارای اثر مهاری بر رشد استافیلوکوکوس آرئوس می‌باشد در حالی‌که بر علیه باکتری اشرشیاکلی فاقد اثر مهاری است. نتایج بیانگر آن است که نانوذرات در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر ضدمیکروبی بر روی باکتری استافیلوکوکوس آرئوس نداشته در حالی که غلظتهای ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر اثر مهاری برابربا ۱۲/۰۳±۰/۳۲ و ۱۶±۰/۵ نشان داده است. نتایج حاصل از آنالیز آماری، اختلاف معنی‌داری ($p\leq۰/۰۰۱$) بین دو غلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر از نانو ذرات اکسیدآهن با گروه کنترل مثبت نشان داد. همچنین مقایسه غلظتهای ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات اکسید آهن بیانگر آن است که اختلاف معنی داری بین این دوغلظت وجود دارد($p\leq۰/۰۰۱$). این نتایج بیانگر آن است که اثرات ضدمیکروبی نانوذرات وابسته به دوز است و با افزایش غلظت نانوذرات، اثر ضد میکروبی افزایش می‌یابد (نمودار ۱)



نمودار ۱. مقایسه اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف نانوذرات بر علیه استافیلوکوکوس آرئوس. a بیانگر مقایسه غلظتهای۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ سنتز سبز نسبت به کنترل مثبت و حرف b زیر نمودار مقایسه غلظت ۱۰۰۰ نسبت به ۱۰۰ است. سطح معنی داری $p\leq۰/۰۰۱$ است.

بحث و نتیجه گیری

براساس نتایج به دست آمده در این تحقیق نانوذرات اکسید آهن از عصاره باکتری لاکتوباسیلوس کازئی سنتز گردید. نانوذرات اکسید آهن سنتز شده در این روش بسیار کوچک، با اندازه ۱۵–۱۰ نانومتر و کروی شکل می‌باشند. به نظر می‌رسد، وجود ترکیبات احیاکننده و آنزیم‌های خاص در عصاره سیتوپلاسمی باعث احیا یون‌های فلزی و تولید نانوذرات اکسید آهن می‌شود. در مطالعه انجام شده

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.37.2]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.237]

توسط Hilger و همکاران، نانوذرات نقره با اندازه ۱۵ نانومتر، کروی شکل، پایدار، کوچک با تاثیرپذیری بالا توسط مایع رویی باکتری لاکتوباسیلوس فرمانتوم سنتز گردید(۱۱). یکی از بزرگ‌ترین مشکلات پزشکی مقابله و حذف میکروارگانیسم‌هایی است که در طول زمان در مقابل داروهای شیمیایی موجود مقاوم شده‌اند. افزایش مقدار دوز مصرفی دارو برای مقابله با باکتری‌های مقاوم باعث افزایش خطر تجمع مواد شیمیایی در بدن، ایجاد عوارض جانبی و افزایش اثر مخرب آنها بر محیطزیست خواهد شد.

از این رو تحقیق در مورد کشف مواد ضد میکروبی جدید مورد توجه قرار گرفته است. نتایج تحقیق ما گویای این نکته است که نانوذرات اکسید آهن سنتز شده اثر ضدمیکروبی مناسبی بر روی استافیلوکوکوس آرئوس نشان داد. با افزایش غلظت نانو ذرات اکسید آهن قطر هاله عدم رشد افزایش یافته و نتایج حاصل از آنالیز آماری بیانگر آن است که پس از مقایسه دوغلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات با گروه کنترل مثبت، اختلاف معنی‌داری بین هر دو غلظت با گروه کنترل مثبت وجود دارد و با افزایش غلظت اثر مهاری روی باکتری استافیلوکوکوس آرئوس افزایش یافته است.

این در حالی است که این نانو ذرات بر روی باکتری اشرشیاکلی فاقد اثر مهاری بوده است. به نظر می‌رسد مکانیسم اثر مهاری نانوذرات اکسید آهن روی باکتری استافیلوکوکوس آرئوس به عنوان یک باکتری گرم مثبت با باکتری گرم منفی اشرشیاکلی تفاوت دارد. میزان سمیت سلولی نانوذرات اکسیدآهن وابستگی زیادی به نوع ارگانیسم وغلظت نانو ذرات دارد. در غلظت‌های اندک نانو ذرات می‌توانند به عنوان منابعی جهت تامین یون آهن مورد نیاز ارگانیسم عمل کرده و رشد را بهبود بخشند (۱۳و۱۲). نتایج حاصل از پژوهش حاضر با نتایج انجام شده توسط Nhiem و همکارانش بیانگر آن است که باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس آرئوس نسبت به نانو ذرات اکسید آهن سنتز شده حساس‌تر از باکتری گرم منفی اشرشیاکلی است(۱۴). باکتری‌های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای موکوپپتید بوده، در حالی‌که باکتری‌های گرم منفی فقط لایه نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آن‌ها لیپوپروتئین و لیپوپلی‌ساکارید است این باکتری‌ها از یک طرف یک غشاء خارجی در اطراف دیواره سلولی خود دارند و از طرف دیگر دارای آنزیم‌هایی در فضای پری پلاسمیک می‌باشند که قادرند مولکول های خارجی را تجزیه کنند به همین دلیل آنها را در برابر مواد ضدباکتریایی مقاوم‌تر می‌سازد. با این حال در مطالعه Khatami و همکاران برخلاف مطالعه حاضرنانوذرات آهن اثر بیشتری بر روی باکتری اشرشیاکلی نشان داد و این تفاوت شاید به دلیل اختلاف در شکل، سایز و غلظت نانو ذرات و روش آزمایش باشد (۱۵). به طور کلی در مورد مکانیسم‌های احتمالی میان‌کنش‌های نانو مواد با ماکرومولکول‌های بیولوژیکی، اختلاف بین بار منفی میکروارگانیسم و بار مثبت نانوذرات، به صورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانوذرات عمل کرده و باعث اتصال نانوذرات به سطح سلول شده و در نهایت تعداد زیادی از این تماس‌ها منجر به اکسید شدن مولکول‌های سطحی میکروب‌ها و مرگ سریع آنها می‌شوند (۱۶). نانو ذرات مبتنی بر شیمی سبز را شاید بتوان جهت درمان عفونت‌های میکروبی بعنوان جایگزینی مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها در پزشکی استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان که با در اختیار گذاشتن امکانات لازم مرا در اجرای هر چه بهتر این تحقیق یاری کردند، تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.37.2]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.237]

Evaluating Antibacterial Effect of Green Synthesis Oxide Iron Nanoparticles Using Cytoplasmic Extract of Lactobacillus casei

P. Torabian (MSc)[1], F. Ghandehari (PhD)*[1], M. Fatemi (PhD)[2]

1.Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, I.R.Iran

2.Department of Biology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 237-41

Received: May 1st 2018, Revised: Nov 24th 2018, Accepted: Feb 3rd 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: With regard to the drug resistance, special attention has been placed on researches for discovering new antimicrobial substances such as nanoparticles. In green synthesis biological resources such as bacteria and yeast are used for producing metal nanoparticles. In this research, we used the Lactobacillus casei extract as a biological source for producing iron oxide nanoparticles and antibacterial effects of these nanoparticles against the standard strains of Escherichia coli and Staphylococcus aureus were investigated.

METHODS: for synthesis of green iron oxide nanoparticles, cytoplasmic extract of Lactobacillus casei and iron sulfate solution 10-3M were mixed and incubated for 3 weeks at 37 ° C in the presence of 5% carbon dioxide. Synthesis of iron oxide nanoparticles were evaluated using X-ray diffraction pattern and Transmission electron microscopy. Antibacterial effects of nanoparticles with dilution of 10, 100 and 1000 micro-grams per milliliter on two standard strains of Escherichia coli and Staphylococcus aureus were evaluated.

FINDINGS: Synthesis of iron oxide crystals was confirmed by XRD analysis. Based on transmission electron microscopy the average of nanoparticles was about 15 nm with a spherical shape. Antimicrobial effect of nanoparticles showed that at concentration of 100 and 1000 µg/ml has an inhibitory effect on the growth on Staphylococcus aureus equal to 12.03±0.32 and 16±0.5, respectively. The only concentration that showed significant effect was 1000µg/ml ($p \leq 0.001$). While are ineffective against Escherichia coli.

CONCLUSION: The results of this study indicated that producing iron oxide nanoparticles using cytoplasmic extract of Lactobacillus casei is a biologically safe method and very noteworthy in medicine and pharmacology and may be considered as a good candidate for the treatment of bacterial infections.

KEY WORDS: *Iron Oxide Nanoparticles, Lactobacillus Casei, Staphylococcus Aureus*.

Please cite this article as follows:

Torabian P, Ghandehari F, Fatemi M. Evaluating Antibacterial Effect of Green Synthesis Oxide Iron Nanoparticles Using Cytoplasmic Extract of Lactobacillus casei. J Babol Univ Med Sci. 2019;21:237-41.

***Corresonding Author: F. Ghandehari (PhD)**

Address: Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, I.R.Iran

Tel: +98 31 37420140

E-mail: Ghandehari@iaufala.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.37.2]

[DOI: 10.22088/jbums.21.1.237]

References

1.Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkat G and Mukhrjee P. The use of microorganism for the formation of metal nanoparticles and their application. Appl Microbial Biotechnol. 2006; 69(5); 485-92.

2.Nithya R, Rangunathan R. Synthesis of Silver nanoparticles using probiotic microbe and its antibacterial effect against multidrug resistant bacteria. Afr J Biotech. 2012; 11(49):11013-21.

3.Kasthuri J, Veerapandian S, Rajendiran N. Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agent. Colloids Surf B Biointerfaces. 2009;68(1):55-60.

4.Chavoshi Frooshani M, Imani Fooladi A, Saadatmand S. Antimicrobial Effects of Bacterial Cell Debris and Supernatant of Lactobacillus casei Isolated from Yoghurt Against Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11(3):208-17. [In Persian].

5.Li G, He D, Qian Y, Guan B, Gao S, Cui Y, et al. Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using Aspergillus terreus. Int J Mol Sci. 2012; 13(1): 466-76.

6.Bonyadi F, Tookmechi A, Moheb Aliyan H. An overview of probiotics and their role in cancer management. J Mazandaran Univ Med Sci. 2014; 24(112):128-40. [In Persian]

7.Wang Z, Zhang L, Tan T. High cell density fermentation of Saccharomyces cerevisiae GS2 for selenium-enriched yeast production. Korean J Chem Engin. 2010; 27(6): 1836-40.

8.Sriwongsitanont S, Ueno M. Effect of freeze-thawing and polyethylene glycol (PEG) lipid on fusion and fission of phospholipid vesicles. Chem Pharm Bull. 2004; 52(5):641-2.

9.Omidi B, Hashemi J, Bayat M, Larijani K. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Lactobacillus fermentum. Bull Env Pharmacol Life Sci. 2014; 3(12): 186-92.

10.Mollazadeh Mogaddam K. An introduction to microbial metal nanoparticle preparation method. J Yong Invest. 2010; 19(19): 18-24.

11.Hilger I. In vivo applications of magnetic nanoparticle hyperthermia. Int J Hyperthermia. 2013; 29(8): 823-34.

12.Vazquez- Munoz R, Avalos-Borja M, Castro- Longoria E. Ultrastructural analysis of Candida albicans when exposed to silver nanoparticles. PLoS One. 2014;9(10):e108876..

13.Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Povey M, York D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). J Nanopartic Res. 2007;9(3):479-89.

14.Tran N, Mir A, Mallik D, Sinha A, Nayar S, Webster TJ. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on Staphylococcus aureus. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:277-83.

15.Khatami M, Aflatoonian M, Azizi H, Mosazade F, Hoshmand A, Nobre M, Poodineh FM, Khatami M, Khraazi S, Mirzaeei H. Evaluation of Antibacterial Activity of Iron Oxide Nanoparticles Against Escherichia coli. Int J Basic Sci Med. 2017; 2(4):166-9.

16.Emamifar A, Kadivar M, Shahedi M, Soleimanian-zad S. Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of Lactobacillus plantarum in orange juice. Food Control. 2011; 22(3-4): 408-13.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.37.2]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.237]