

سنتر و مشخصه‌یابی نانو لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک و بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی آنها

آرمینا آرین‌منش: دانشجوی کارشناسی ارشد ریز زیست‌فناوری، گروه زیست‌فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، a.aryanmanesh@sci.ui.ac.ir

ابوالقاسم عباسی کجانی*: استادیار گروه زیست‌فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، agh.abbasi@bio.ui.ac.ir

چکیده

امروزه توسعه عوامل ضد میکروبی جدید برای جایگزینی آنتی بیوتیک‌ها، بویژه ترکیبات با منشأ زیستی، بسیار مورد توجه است. بنابراین در این پژوهش، سنتر نانولیپوزوم‌ها و بارگذاری اسانس میخک درون آنها و استفاده بعنوان یک عامل ضد باکتری و ضد قارچ به ترتیب روی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار و PDA، بررسی شد. بدین منظور، لیپوزوم‌ها با استفاده از لسیتین بعنوان پیش‌ماده با روش تزریق اتانول در حضور اسانس میخک، سنتز شدند و ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی آنها با روش‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)، پراکندگی نور پویا (DLS) و زتا سایزر، بررسی شد. سپس اثرات ضد میکروبی آنها روی باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، و قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس ترئوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* بررسی شد. نانو لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک، پایداری کلئیدی بالایی با پتانسیل زتای ۵/۵۸- نشان دادند؛ چنان که پس از ۶ ماه، رسوبی دیده نشد. تصویربرداری TEM نشان داد که نانوذرات، شکلی نیمه کروی و همگون با اندازه بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر دارند. نانو لیپوزوم‌ها، زیست‌سازگاری بالایی نشان دادند چنان که ۷۳/۸ و ۸۱/۳ درصد از سلول‌های فیروپلاست انسانی پس از گرماگذاری با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از به ترتیب نانولیپوزوم‌های اولیه و بارگذاری شده با اسانس میخک، همچنان زنده ماندند. هرچند نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک، اثر ضد باکتریایی محدودی روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* نشان دادند اما اثر ضد قارچ برجسته‌ای بر روی *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس ترئوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* داشتند؛ چنان که به ترتیب در غلظت‌های ۲، ۲، و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (وزنی حجمی) لیپوزوم‌ها سبب مهار کامل رشد میسلیم قارچ‌ها شد. بر پایه نتایج، نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک می‌تواند یک عامل ضد قارچ مناسب برای کاربردهای غذایی و دارویی باشد.

واژه‌های کلیدی: نانولیپوزوم، اسانس میخک، ضد باکتری، ضد قارچ.

بیماری‌های عفونی، از جمله مشکلات مهم سلامت در قرن حاضر هستند؛ چنان که پس از بیماری‌های قلبی عروقی، دومین عامل مرگ و میر در جهان به شمار می‌رود (۱). استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های عفونی، به گسترش مقاومت چند دارویی باکتری‌ها منجر شده است؛ چنان که سازمان بهداشت جهانی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک را به عنوان یکی از بزرگترین چالش‌های سلامت بشر معرفی کرده است. بنابراین، نیاز به روش‌های درمانی جدید برای این بیماری‌ها، بسیار مورد توجه و پژوهش قرار گرفته است (۲).

ترکیبات گیاهی از طریق ساز و کارهایی همچون تشکیل کمپلکس با آنزیم‌های خاص یا مهار مستقیم آنزیم‌ها، اثرات سمی بر ساختار و یکپارچگی غشا، خاموش کردن رادیکال‌های آزاد، تحریک سلول‌های کشنده طبیعی در انسان، و تعدیل غلظت استروئید، می‌توانند اثرهای زیستی گوناگونی داشته باشند (۳). اسانس‌های گیاهی، سرشار از ترکیباتی هستند که از طریق ساز و کارهای گوناگونی همچون اختلال در غشای سلولی، مهار سنتز پروتئین و تداخل با تکثیر DNA، اثرات ضد میکروبی نشان می‌دهند و به عنوان جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند (۴). اسانس میخک، به دلیل داشتن ترکیبات زیست فعال گوناگون همچون فنول‌ها (اوژنول و اوژنول استات)، ترپن‌ها (بتا-کاروفیلین و آلفا-هومولن) و هیدروکربن‌ها، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، و ضد حشره از خود نشان می‌دهد که کاربردهای گوناگونی در صنایع آرایشی، غذایی و دارویی دارند (۵).

با این حال اسانس میخک همچون دیگر اسانس‌ها در تماس با نور و دمای بالا، بسیار ناپایدار و تجزیه پذیر است که بر کیفیت و زیست فعالی آن اثر می‌گذارد. کپسوله کردن به عنوان یک راهبرد امیدوارکننده برای حل این چالش، در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند ماندگاری اسانس را افزایش دهد و پایداری فیزیکی شیمیایی و کاربرد آن را در زمینه‌های مختلف بهبود بخشد (۶، ۷). از اسانس‌های کپسوله شده به طور معمول در سامانه‌های غذایی برای افزایش پایداری، پوشاندن طعم‌های نامطلوب و آزادسازی کنترل شده، استفاده می‌شود (۸). نانومواد، با توجه به ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی منحصر به فردشان، روش‌های جدید و کارآمدی را برای عبور از غشاها و دیواره‌های باکتریایی، پمپ‌های خروج و تشکیل بیوفilm فراهم می‌کنند. در این زمینه، دسته‌های گوناگونی از نانومواد همچون نانوذرات فلزی، لیپوزوم‌ها و نانوذرات پلیمری، مورد توجه ویژه هستند (۹). نانو سامانه‌های دارورسانی، به دلیل پتانسیل آنها در بهبود فراهمی زیستی دارو و کارایی هدف‌گیری، مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۲).

در میان نانو سامانه‌های گوناگون، لیپوزوم‌ها به عنوان یک حامل امیدوارکننده برای ترکیبات زیست فعال گوناگون، از جمله اسانس‌ها، ویتامین‌ها، و اسیدهای چرب، در نظر گرفته می‌شوند. کپسوله کردن اسانس‌ها در لیپوزوم‌ها سبب محافظت آنها در برابر تخریب اکسیداتیو و آزادسازی کنترل شده آنها در بدن انسان می‌شود. همچنین لیپوزوم‌ها به دلیل ویژگی‌های زیستی متمایز خود، کاربردهای متعددی در صنایع دارویی و غذایی دارند (۱۰). در میان روش‌های گوناگونی که تاکنون برای سنتز لیپوزوم‌ها پیشنهاد شده، روش تزریق اتانول به دلیل مزیت‌های متعددی از جمله سادگی، پیاده‌سازی سریع و

تکرارپذیری، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۱). در این پژوهش، لیپوزوم‌ها با روش تزریق اتانول سنتز و با اسانس میخک بارگذاری شدند. پس از مشخصه‌یابی لیپوزوم‌ها، اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی آنها بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد:

اتانول (۹۹ درصد)، دی‌متیل سولفو کسید (۹۹/۹ درصد)، و ال-آلفا لستین (۹۷ درصد) از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. محیط‌های کشت باکتریایی و قارچی، از شرکت کندالب (اسپانیا) خریداری شد. ۳- (۵،۴-دی‌متیل تiazول-۲-ایل)-۲،۵-دی‌فیل تترازولیوم برومید (ام‌تی‌تی)، از شرکت سیگما (آلمان) خریداری شد. محیط کشت آر پی ام آی-۱۶۴۰، تریپسین، سرم جنین گاوی، و ترکیب آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین-استرپتومایسین تولیدی شرکت گیکو از فروشگاه‌های داخلی کشور خریداری شد. پودر آنتی‌بیوتیک سفکسیم، اهدایی از طرف شرکت داروسازی فارابی بود.

۲-۲- اسانس‌گیری گیاه میخک

اسانس میخک با روش تقطیر با آب از پودر خشک جوانه گیاه میخک تهیه شد. بدین منظور، ۱۰ گرم پودر میخک به همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون بالن به مدت ۳۰ دقیقه تحت امواج فراصوت قرار گرفت. سپس فرایند اسانس‌گیری در دستگاه کلونجر در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت انجام شد (۱۲).

۲-۳- سنتز لیپوزوم‌ها و بارگذاری اسانس میخک

۴۰۰ میلی‌گرم لستین به همراه ۴ میلی‌لیتر اتانول در یک شیشه بشر افزوده شد و تحت امواج فراصوت برای ۵ دقیقه و همزنی با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ ساعت، در اتانول حل شد. سپس ۴۰۰ میلی‌گرم اسانس میخک به آن افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه، همزده شد تا کاملاً حل شود. نمونه حاصل با سرنگ و با فشار به شیشه دیگری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر تحت همزنی افزوده شد و همزنی برای ۲ ساعت دیگر ادامه یافت تا لیپوزوم‌ها سنتز شوند. در نهایت، نمونه لیپوزوم تحت روتاری در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت قرار گرفت تا اتانول به طور کامل تبخیر و حذف شود. بدین ترتیب، غلظت لستین و ماده موثره، ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و نسبت فاز آلی به آبی ۱ به ۵ به دست آمد (۱۳).

۲-۴- مشخصه‌یابی لیپوزوم‌ها

برای بررسی شکل و اندازه نانوذرات، یک قطره از نمونه کلئیدی روی گرید کربنی مخصوص پوشش یافته و خشک شد و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل EM208S شرکت فیلیپس هلند بررسی شد. برای اندازه‌گیری قطر هیدرودینامیکی و پتانسیل زتای نانوذرات کلئیدی، از دستگاه زتا سائزر مدل Nano ZSP ساخت شرکت Malvern انگلستان استفاده شد. برای شناسایی گروه‌های عاملی سطح نانوذرات، نمونه‌ها به صورت قرص فشرده در ترکیب با پتاسیم

بروماید در آمدند و با دستگاه طیف سنج FTIR مدل FT/IR-6300 ساخت شرکت جاسکوی ژاپن در محدوده عدد موجی ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی متر، بررسی شدند.

۲-۵- بررسی سمیت لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک

میزان سمیت سلولی لیپوزوم‌ها پیش و پس از بارگذاری با اسانس میخک بر روی رده سلولی فیروبلاست انسان با روش MTT بررسی شد. بدین منظور، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت به همراه ده هزار سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه افزوده شد و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در فشار ۵ درصد دی اکسید کربن در انکوباتور مرطوب، غلظت‌های گوناگون نانوذرات (شامل ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به طور جداگانه به سلول‌ها در چاهک‌های گوناگون، افزوده و دوباره برای ۴۸ ساعت در همان شرایط گرماگذاری شد. سپس محیط کشت و نانوذرات جدا شدند و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه به همراه MTT (با غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر) به هر چاهک افزوده شد و دوباره برای ۴ ساعت در شرایط مشابه، گرماگذاری شد. سپس محیط کشت چاهک‌ها جدا شد و بلورهای فورمازان باقی مانده در کف چاهک‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفو کسید حل شد و جذب هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر، اندازه گیری شد. نسبت سلول‌های زنده، از تقسیم کردن میزان جذب سلول‌های تیمار شده بر میزان جذب سلول‌های کنترل (بدون تیمار)، محاسبه شد.

۲-۶- بررسی ویژگی‌های ضدباکتریایی لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک

ویژگی‌های ضدباکتریایی نانوذرات بر روی دو سویه باکتری /شریشیا کلی (ATCC 25922) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) با استفاده از آزمون‌های انتشار در چاهک آگار در سه تکرار بررسی شد. بدین منظور، ابتدا کلونی‌های باکتریایی در ۱۵ میلی لیتر محیط کشت مایع لوریا برتانی در ارلن در شرایط استریل تلقیح شدند و به مدت ۲۴ ساعت درون شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دور ۱۵۰ دور در دقیقه، گرماگذاری شدند. سپس کشت‌های باکتری با محیط کشت مایع لوریا برتانی رقیق شدند تا جذب آنها در طول موج ۶۳۰ نانومتر به ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ برسد. سپس یک میلی لیتر از کشت رقیق شده به محیط کشت جامد مولر هیتون آگار، افزوده و بطور کامل پخش شد. در پایان، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی متر روی هر پلیت ایجاد و در هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بیوتیک سفکسیم (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و غلظت‌های گوناگون نانو لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک (۲۴۰۰، ۳۰۰۰، و ۳۶۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به صورت جداگانه افزوده شد و پس از ۱۸ ساعت گرماگذاری در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله‌ها اندازه گیری شد (۱۴).

۲-۷- بررسی ویژگی‌های ضد قارچی لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک

ویژگی‌های ضد قارچی نمونه‌ها بر روی سه گونه قارچ آسپرژیلوس نایجر (ATC 1015)، آسپرژیلوس ترئوس (ATCC 20541) و آسپرژیلوس فلاووس (ATCC 200026) بوسیله آزمون سمیت تماسی روی محیط کشت جامد PDA بر پایه گزارش‌های پیشین (۱۵، ۱۶) بررسی شد. ابتدا گونه‌های قارچی روی محیط کشت PDA کشت شدند و در دمای ۳۵

درجه سلسیوس به مدت ۵ تا ۷ روز (بسته به گونه قارچی) گرماگذاری شدند تا اسپورهای قارچی پدیدار شوند. برای انجام آزمون سمیت تماسی، غلظت‌های گوناگونی (۰/۵، ۱، ۲ میلی گرم بر میلی لیتر) از لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک به محیط کشت PDA افزوده و به خوبی ترکیب و استریل شد و پیش از جامد شدن، در پلیت‌ها توزیع شد. پلیت حاوی محیط کشت بدون نانوذرات نیز به عنوان گروه کنترل تهیه شد. سپس یک برش با اندازه ۱×۱ سانتی متر از پلیت حاوی کلنی فعال قارچی با استفاده از لوپ جدا شد و در مرکز هر پلیت جایگذاری شد. پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس برای ۵ تا ۷ روز گرماگذاری شدند و در این مدت، رشد میسلیم در دو جهت عمود بر هم اندازه‌گیری و میانگین آن محاسبه شد و در پایان، درصد بازدارندگی رشد میسلیم با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد بازدارندگی رشد میسلیم} = \frac{(\text{قطر رشد کلنی در پلیت حاوی نانوذرات} - \text{قطر رشد کلنی در پلیت کنترل})}{\text{قطر رشد کلنی در پلیت کنترل}} \times 100$$

۲-۸- مطالعات آماری:

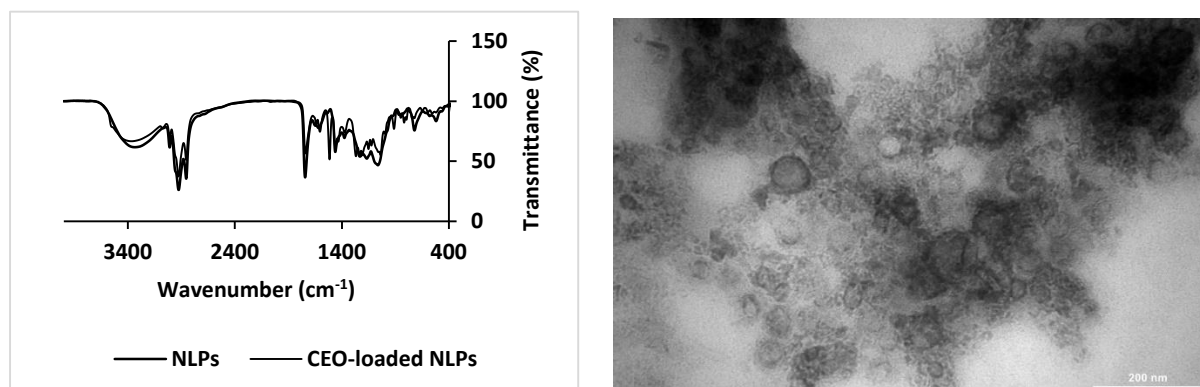
آزمایشات در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) سه تکرار مستقل بیان شد. از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) برای بررسی آماری نتایج استفاده شد و فاصله اطمینان ۹۹ درصد برای معنی دار بودن اختلافات در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

۳-۱- سنتز و مشخصه‌یابی لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک

در اختیار داشتن یک روش سنتز آسان و کارآمد برای تولید انبوه لیپوزوم‌هایی با اندازه مناسب و ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی مطلوب، یک از پیش‌نیازهای اصلی برای تمام کاربردهای زیست‌پزشکی است. بنابراین در گام اول تلاش شد تا با تغییر غلظت اسانس در مخلوط واکنش سنتز، شرایط بهینه برای ساخت لیپوزوم‌های کلوئیدی پایدار با بیشینه ظرفیت بارگذاری اسانس بدست آید. در نهایت، غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر لسیتین و ماده موثره، و نسبت فاز آلی به آبی ۱ به ۵ به عنوان ترکیب بهینه واکنش بدست آمد. در این شرایط، لیپوزوم‌های کلوئیدی تا ۶ ماه پایداری خود را در دمای اتاق کاملاً حفظ کردند و هیچگونه رسوبی دیده نشد. تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری از لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک نشان داد که اغلب نانوذرات، نیمه کروی بوده و اندازه‌های بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر دارند (شکل ۱). بررسی و مقایسه شیمی سطح لیپوزوم‌ها پیش و پس از بارگذاری با اسانس با روش طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، وجود تفاوت بارز بین آنها و وجود گروه‌های عاملی گوناگون از جمله هیدروکسیل، کربونیل و کربوکسیل را نشان داد که عامل اصلی بار سطحی لیپوزوم‌ها هستند (شکل ۱). بر پایه آزمون DLS، متوسط قطر آب‌پوشی لیپوزوم‌ها ۱۲۵ نانومتر و شاخص

پراکندگی (PDI) آنها ۰/۲ بود که بر توزیع اندازه مطلوب آنها دلالت دارد. همچنین، پتانسیل زتای لیپوزوم‌ها ۵۵- بود که پایداری کلوئیدی بالای آنها را نشان می‌دهد و با نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه تطابق دارد.

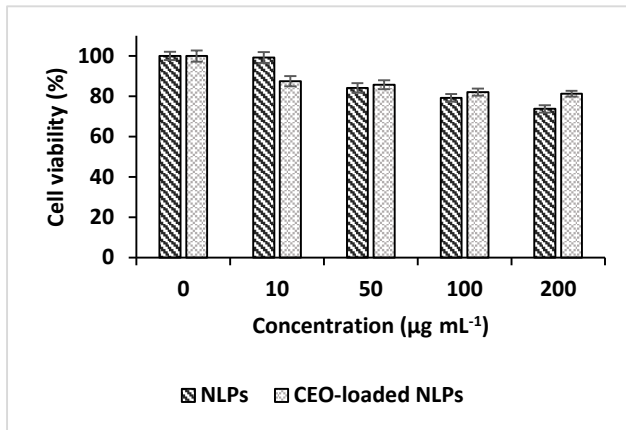


شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانو لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک (راست) و طیف مادون قرمز تبدیل فوریه نانو لیپوزوم‌ها پیش و پس از بارگذاری با اسانس میخک (چپ).

Figure 1. TEM image of CEO-loaded NLPs (right) and FTIR spectra of NLPs before and after loading with CEO (left).

۲-۳- بررسی سمیت لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک

بررسی سمیت سلولی لیپوزوم‌ها پیش و پس از بارگذاری با اسانس میخک بر روی رده سلولی فیروبلاست انسان نشان داد که لیپوزوم‌های ابتدایی، بسیار زیست‌سازگار هستند چنان که پس از ۴۸ ساعت تماس با بیشترین غلظت نانوذرات (۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، ۷۳/۸ درصد از سلول‌ها همچنان زنده ماندند و در کمترین غلظت نانوذرات (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، بیش از ۹۹ درصد از سلول‌ها همچنان زنده بودند (شکل ۲). جالب توجه اینکه پس از بارگذاری اسانس میخک، سمیت سلولی لیپوزوم‌ها در غلظت‌های بالاتری کاهش یافت چنان که در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۸۱/۳ درصد از سلول‌ها همچنان زنده ماندند. بررسی مورفولوژی سلول‌ها پس از تیمار نیز نتایج آزمون MTT را تأیید کرد چنان که تفاوت قابل توجهی در مورفولوژی سلول‌های فیروبلاستی پس از تیمار با لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک، دیده نشد (شکل ۲). این نتایج بر زیست‌سازگاری بالای لیپوزوم‌ها پیش و پس از بارگذاری با اسانس میخک اشاره دارد.



شکل ۲- مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاستی (راست) و نتایج آزمون MTT (چپ) پس از تیمار با لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک.

Figure 2. Morphology of fibroblast cells (right) and the results of MTT assay (left) after treatment with CEO-loaded NLPs.

۳-۳- بررسی ویژگی‌های ضد باکتریایی لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک

بررسی هاله عدم رشد باکتری‌ها پس از تیمار با غلظت‌های گوناگون لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک نشان داد که نانوذرات، فعالیت ضد باکتریایی وابسته به دوز دارند و تنها در غلظت ۳۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فعالیت ضد باکتریایی معنی‌داری ($p < 0.01$) با قطر هاله 8.3 ± 0.6 میلی‌متر روی باکتری *S. aureus* نشان داد. در همین شرایط، در هیچیک از غلظت‌ها، فعالیت ضد باکتریایی روی باکتری *E. coli* دیده نشد.

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد (میلی‌لیتر) برای آنتی‌بیوتیک سفکسیم (ستون سمت راست) و غلظت‌های گوناگون نانو لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر) روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی*.

Table 1. The inhibition zone diameter (mm) for cefixime antibiotic (right column) and different concentrations ($\mu\text{g mL}^{-1}$) of CEO-loaded nanoliposomes on *S. aureus* and *E. coli* bacteria.

Concentration \ Species	3600	3000	2400	1000
<i>S. aureus</i>	$8.3 \pm 0.6^{**}$	0	0	9.1 ± 1.3
<i>E. coli</i>	0	0	0	7.3 ± 0.9

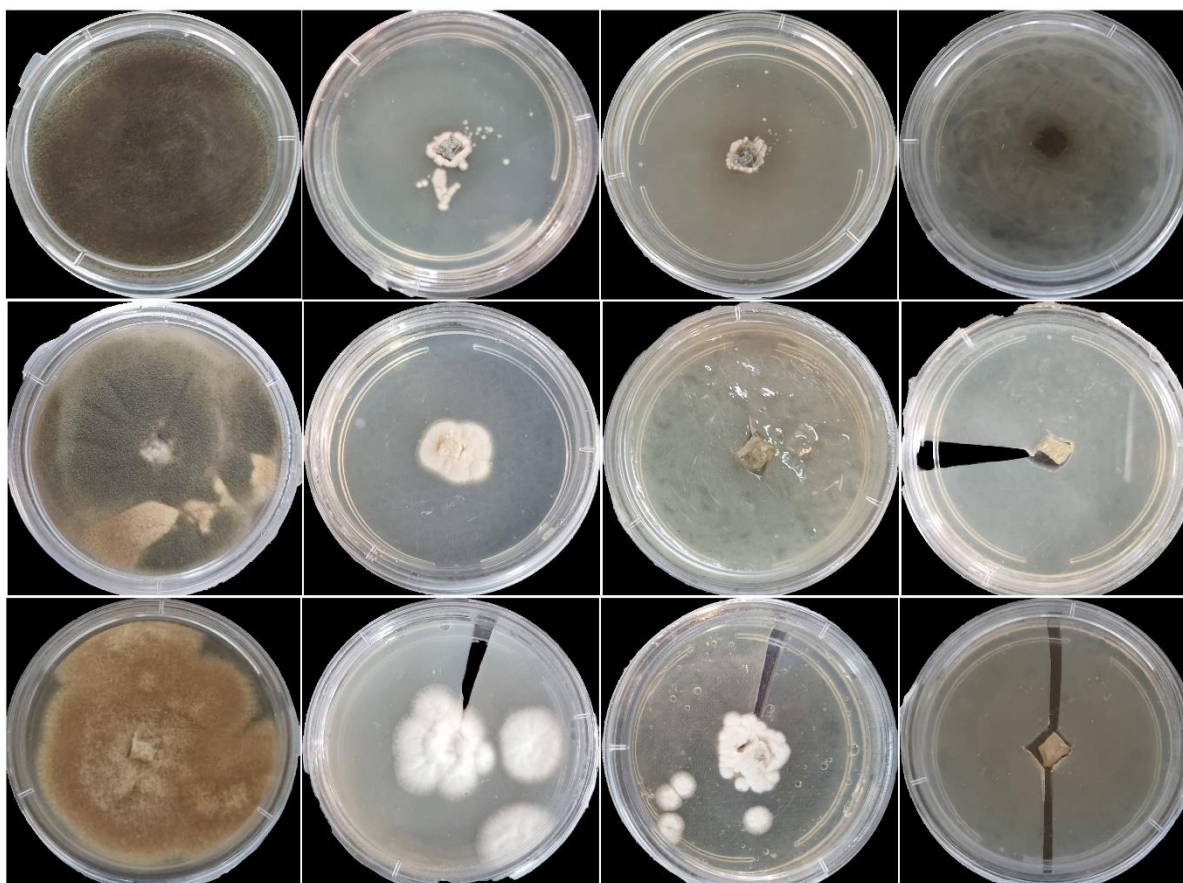
۳-۴- بررسی ویژگی‌های ضد قارچی لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک

نتایج آزمون ضد قارچ نشان داد که لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک، به طور موثری از رشد میسلیم قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و آسپرژیلوس فلاووس جلوگیری می‌کنند. در میان سه گونه مورد بررسی، بیشترین اثر ضد قارچی روی گونه آ. فلاووس دیده شد چنان که در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر لیپوزوم‌ها، رشد قارچ به طور کامل باز داشته شد. در دو گونه دیگر مورد بررسی، نیاز به غلظت بیشتری از لیپوزوم‌ها بود و در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک، رشد قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس ترئوس به طور کامل مهار شد.

جدول ۲- درصد بازدارندگی رشد میسلیم قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و آسپرژیلوس فلاووس پس از تیمار با غلظت‌های گوناگون (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک.

Table 2. The inhibition percentage of mycelium growth in *A. niger*, *A. flavus*, and *A. terreus* after treatment with different concentrations (mg mL^{-1}) of CEO-loaded nanoliposomes.

Concentration Species	0	0.5	1	2
<i>A. niger</i>	0	82.3 ± 0.9	85 ± 0.7	100
<i>A. flavus</i>	0	71.9 ± 0.5	100	100
<i>A. terreus</i>	0	59.4 ± 1.9	68.3 ± 1.6	100



شکل ۳- نتایج آزمون سمیت تماسی غلظت‌های گوناگون (از راست به چپ ۲، ۱، ۰/۵، و ۰ میلی گرم در میلی لیتر نانو لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک بر روی قارچ‌های *آ. نایجر* (بالا)، *آ. فلاووس* (وسط)، و *آ. ترئوس* (پایین)).

Figure 3. The results of contact toxicity of different concentrations (0, 0.5, 1, and 2 mg mL⁻¹) of CEO-loaded NLPs on *A. niger* (up), *A. flavus* (middle), and *A. terreus* (down).

۴- بحث و نتیجه گیری

اسانس‌ها، که بیشتر از مونوترپن‌ها و فنیل پروپن‌ها تشکیل شده‌اند، بوسیله گیاهان معطر برای مقابله با عوامل بیماری‌زای مختلف، سنتز می‌شوند. کپسوله کردن ترکیبات اسانس‌های گیاهی که اغلب ناپایدار و فرار هستند، حلالیت و پایداری شیمیایی آنها را بهبود می‌بخشد. لیپوزوم‌ها به دلیل توانایی حمل هر دوی ترکیبات آبدوست و آبگریز، زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری، و عدم ایمنی‌زایی، برای جابجایی ترکیبات زیست‌فعال اسانس‌ها، مناسب هستند (۱۷). لسیتین، یک ترکیب غذایی طبیعی از فسفاتیدهای کولین، اتانول‌آمین و اینوزیتول است که به طور کلی ایمن (GRAS) شناخته می‌شود. لسیتین، یکی از اجزای مهم بافت عصبی و فسفولیپید غالب در غشای بیشتر پستانداران است که بصورت تجاری از دانه‌های روغنی گیاهی همچون سویا، کلزا و تخمه آفتابگردان و منابع حیوانی همچون زرده تخم مرغ، شیر و بافت مغز بدست می‌آید (۱۳). قیمت پایین لسیتین نیز یک مزیت بزرگ برای کاربرد گسترده آن در صنایع غذایی است، چنان که لسیتین

سویا با خلوص متوسط را برای ساخت نانولیپوزوم‌های خوراکی، مناسب دانسته‌اند (۱۸). از سوی دیگر، روش تزریق اتانل، به دلیل سادگی، سرعت، تکرارپذیری و اینکه سبب تخریب لیپید یا تغییرات اکسیداتیو نمی‌شود، یک روش ایده‌آل برای افزایش سنتز لیپوزوم‌ها در مقیاس انبوه و تجاری است (۱۹). بنابراین، ساخت لیپوزوم‌های بر پایه لسیتین با روش تزریق اتانل برای بارگذاری اسانس‌های گیاهی، به نظر می‌تواند روشی مناسب برای کاربرد گسترده در صنایع غذایی و کشاورزی باشد. پژوهش‌های پیشین نیز نشان داده‌اند که کپسوله کردن اسانس‌های گیاهی به صورت نانولیپوزوم، می‌تواند پایداری و خصوصیات زیستی آنها از جمله سمیت تدخینی علیه شیشه آرد را افزایش داده و به طور بالقوه در مدیریت آفات استفاده شود (۲۰). افزایش فعالیت ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی در برابر باکتری *اشریشیا کلی* پس از کپسوله کردن در نانولیپوزوم‌ها نیز گزارش شده و استفاده از ترکیبات طبیعی کپسوله شده در نانولیپوزوم‌ها به عنوان عوامل نگهدارنده قوی، نه تنها در صنایع غذایی، بلکه در فرآورده‌های پزشکی و آرایشی معرفی شده است (۲۱).

نتایج این پژوهش نیز نشان داد که نانو لیپوزوم‌های ساخته شده بر پایه لسیتین، بسیار زیست‌سازگار بوده و سمیت ناچیزی روی سلول‌های فیروپلاستی داشتند. همچنین بر پایه نتایج این پژوهش، یک روش کارآمد و سریع برای ساخت نانو لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس‌های گیاهی با پایداری کلوئیدی بالا و توزیع اندازه مناسب، بدست آمد. هرچند نانو لیپوزوم‌های حاصل، ویژگی‌های ضد باکتریایی مطلوبی نشان ندادند که پژوهش بیشتر برای رفع این محدودیت را ضروری می‌سازد. اصلاح سطح نانو لیپوزوم‌ها با ترکیبات ضد باکتریایی مناسب می‌تواند در این زمینه مفید باشد.

بهرحال، نانو لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک اثر ضد قارچ برجسته‌ای روی قارچ‌های *آسپرژیلوس* داشتند که بر پتانسیل بالای آنها در نقش عامل ضد قارچ، اشاره دارد. این نتایج با گزارش‌های پیشین درباره افزایش اثر ضد قارچ اسانس میخک (۲۲) و دیگر اسانس‌های گیاهی کپسوله شده در لیپوزوم‌ها (۲۳، ۲۴)، همخوانی دارد. یک مطالعه جدید (۲۵) نیز برهم کنش‌های زیاد لیپیدها با سلول‌های قارچی و پستانداران و تأثیر درجه اشباع لیپید بر میزان این برهم کنش‌ها را گزارش کرده است. مطالعات مولکولی و بیوشیمیایی بیشتر می‌تواند به یافتن روش‌های کارآمدتر برای مقابله با عفونت‌های قارچی منجر شود.

Sebaaly و همکارانش نیز از لیپوزوم‌هایی که با روش تزریق اتانول و ترکیب فسفولیپید طبیعی سویا و کلسترول ساختند، برای بهبود پایداری اسانس میخک و اوژنول، استفاده کردند. دسته‌های لیپوزومی از نظر اندازه، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا، سرعت بارگذاری، راندمان کپسوله‌سازی و مورفولوژی مشخص و مقایسه شدند. آزمایش‌های مشخصه‌یابی، تشکیل لیپوزوم‌ها چند لایه‌ای و کرومی شکل نانومتری را نشان داد که از تخریب اوژنول در معرض پرتوی ماوراء بنفش، جلوگیری کرده و از فعالیت آنتی اکسیدانی اوژنول محافظت کردند (۲۶).

Sebaaly و همکارانش در مطالعه ای دیگر نیز لیپوزوم‌های حاوی اسانس میخک و اوژنول را با استفاده از روش تزریق اتانول در مقیاس بزرگ (۳ لیتر) سنتز کردند. آنها گزارش کردند که لیپوزوم‌های همگن، پایدار، با اندازه نانومتری و چند

لایه با فسفولپید بالا، نرخ بالای بارگذاری اوژنول و راندمان بالای کپسوله کردن اجزای اسانس میخک به دست آمد (۲۷).

همچنین چندین گزارش نیز درباره سنتز نانوذرات کیتوسان حاوی اسانس میخک، با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی و ضد قارچی وجود دارد (۱۵، ۲۸) اما بر پایه بررسی‌های ما، بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس میخک در نانولیپوزوم‌ها گزارش نشده است.

قدردانی:

از حمایت‌های مالی دانشگاه اصفهان، کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

۵- منابع

1. Tabibzadehtehrani P., Nazari M., Rastgoo P., Seyed N., Heydarikarsaf R., Hadiani A., et al. Bacterial-based drug delivery systems: A new way to combat infectious disease. *Med Drug Discov*; 2025; 26: 100205. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2025.100205>
2. Zong T.X., Silveira A.P., Morais J.V., Sampaio M.C., Muehlmann L.A., Zhang J., et al. Recent Advances in Antimicrobial Nano-Drug Delivery Systems. *Nanomaterials*; 2022; 12: 11. <https://doi.org/10.3390/nano12111855>
3. Mangalagiri N.P., Panditi S.K., Jeevigunta N.L. Antimicrobial activity of essential plant oils and their major components. *Heliyon*. 2021; 7: 4. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06835>
4. El-Demerdash A.S., Alfaraj R., Farid F.A., Yassin M.H., Saleh A.M., Dawwam G.E. Essential oils as capsule disruptors: enhancing antibiotic efficacy against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 2024; 15: 1467460. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1467460>
5. Liñán-Atero R., Aghababaei F., García S.R., Hasiri Z., Ziogkas D., Moreno A., et al. Clove Essential Oil: Chemical Profile, Biological Activities, Encapsulation Strategies, and Food Applications. *Antioxidants*. 2024; 13(4): 1–38. <https://doi.org/10.3390/antiox13040488>
6. Zhang Y., Lu J., Cui K., Wang H., Su J., Zhang W., et al. The encapsulation strategies of clove essential oil enhance its delivery effect in food preservation applications. *Food Chemistry*. 2025; 484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144465>
7. Rodrigues D., Ambrosi A., Di M. Encapsulated essential oils: A perspective in food preservation. *Futur Foods*. 2022; 5: 100126. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100126>

8. Barman B., Budama-kilinc Y., Kutlu G., Karimidastjerd A., Khiabani A.H., Gok B., et al. Impact of Encapsulated Thyme , Clove , and Sage Essential Oils on the Antioxidant , Physicochemical , DNA Binding , and Cleaving Properties of Chewing Gum. *ACS Omega*. 2025; 10: 30512–30524. <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c02317>
9. Obeid M.A., Alyamani H., Alenaizat A., Tunç T., Aljabali A.A., Alsaadi M.M. Nanomaterial-based drug delivery systems in overcoming bacterial resistance: Current review. *Microbial Pathogenesis*. 2025; 203. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107455>
10. Maiti T.K., Parvate S., Dixit P., Singh J., Reddy V.J., Bhuvanesh E., et al. Liposome for encapsulation of essential oil and fatty acids. In: *Liposomal Encapsulation in Food Science and Technology*. 2022; 113–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823935-3.00003-5>
11. Charcosset C., Juban A., Valour J.P., Urbaniak S., Fessi H. Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices. *Chem Eng Res Des*. 2015; 94: 508–15. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.09.008>
12. Wenqiang G, Shufen L. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chem*. 2007;101:1558–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.009>
13. Li J., Nan J., Wu H., Jin H., Zhao Q., Yang L. Middle purity soy lecithin is appropriate for food grade nanoliposome: Preparation , characterization , antioxidant and anti-inflammatory ability. *Food Chem*. 2022; 389: 132931. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132931>
14. Niu J., Lin Q., Li X., McClements D.J., Ji H., Jin Z., et al. Pickering emulsions stabilized by essential oil-tannin-chitosan particles: Microstructure, stability, antibacterial activity, and antioxidant activity. *Food Hydrocoll*. 2024; 154. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110145>
15. Mahmoudi D., Abbasi Kajani A., Rabbani Khorasgani M. Synthesis, characterization, antioxidant and antimicrobial activities, and computational studies of chitosan nanoparticles loaded with vitamin E and clove essential oil. *Sci Rep*. 2025; 15(1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-18135-2>
16. Mottaki M., Jafari S.M., Hosseini S.M., Sadeghi A., Heydari-Delfard F. Pickering emulsions stabilized by chitosan nanoparticles and loaded with clove essential oil as a green biopesticide: A case study on controlling fungal growth in oranges. *Postharvest Biol Technol*. 2025; 219. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2024.113234>
17. Hammoud Z., Gharib R., Fourmentin S., Elaissari A., Greige-gerges H. New findings on the incorporation of essential oil components into liposomes composed of lipid S100 and cholesterol. *Int J Pharm*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.022>

18. Charcosset C., Juban A., Valour J. Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method : Effect of scale-up and injection devices. *Chem Eng Res Des.* 2014; 94: 508–15. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.09.008>
19. Aguilar-Pérez K.M., Medina D.I., Parra-Saldívar R., Iqbal H.M.N. Nano-Size Characterization and Antifungal Evaluation of Essential Oil Molecules-Loaded Nanoliposomes. *Molecules* 2022; 27, 5728. <https://doi.org/10.3390/molecules27175728>
20. Faraji Z., Shakarami J., Varshosaz J., Jafari Sh. Essential Oils Encapsulation into Nanoliposome and Novel Application of Nanoliposome as a Storage Pesticide. *Journal of Nano Research,* 2020; 62, 96-107. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JNanoR.62.96>
21. Khatibi S.A., Misaghi A., Moosavy M., Basti A.A., Koochi M.K., Khosravi P., et al. Encapsulation of *Zataria multiflora* Bioss. Essential Oil into Nanoliposomes and *in Vitro* Antibacterial Activity Against *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Process. Preserv.* 2016; 1-10. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12955>
22. Hasheminejad N., Khodaiyan F., Safari M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. *Food Chem.* 2019;275:113–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.085>
23. Aslan M., Ertaş N., Demir M.K. Storage stability, heat stability, controlled release and antifungal activity of liposomes as alternative fungal preservation agents. *Food Biosci.* 2023; 51. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102281>
24. Yazici M., Duman G., Aslan I., Durucan A., Şahin F. The antifungal activity of liposomal ointment formulation of essential oil of *Satureja hortensis*. *Current Opinion in Biotechnology.* 2011. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.05.345>
25. LaMastro V., Campbell K.M., Gonzalez P., Meng-Saccoccio T., Shukla A. Antifungal liposomes: Lipid saturation and cholesterol concentration impact interaction with fungal and mammalian cells. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2023; 111(5): 644–59. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37501>
26. Sebaaly C., Jraij A., Fessi H., Charcosset C., Greige-gerges H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food Chem.* 2015;178:52–62. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.067>
27. Sebaaly C., Greige-gerges H., Agusti G., Fessi H., Charcosset C. Large-scale preparation of clove essential oil and eugenol-loaded liposomes using a membrane contactor and a pilot plant. *J Liposome Res.* 2015;2104:1–13. <https://doi.org/10.3109/08982104.2015.1057849>
28. Hadidi M., Pouramin S., Adinepour F., Haghani S., Jafari S.M. Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. *Carbohydr Polym.* 2020; 116075. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116075>