



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology

E-ISSN: 3060-7647

15th Year, Vol. 15, No. 57, 2026 pp. 59-72

Received: 12/01/2026

Accepted: 21/04/2026

(Research Paper)

Synthesis and characterization of nano-liposomes loaded with clove essential oil and investigation of their antibacterial and antifungal effects

Armita Aryanmanesh

Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

a.aryanmanesh@sci.ui.ac.ir

Abolghasem Abbasi Kajani 

Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

agh.abbasi@bio.ui.ac.ir

Abstract

Nowadays, the development of new antimicrobial agents to replace antibiotics, especially biological compounds, is of great interest. In this study, the synthesis of nanoliposomes loaded with clove essential oil and their use as antibacterial and antifungal agent were investigated. For this purpose, liposomes were synthesized using the ethanol injection method with lecithin as a precursor in the presence of clove essential oil. Their physicochemical properties were characterized using transmission electron microscopy (TEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), dynamic light scattering (DLS) and zetasizer analysis. Then, their antimicrobial effects were evaluated against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria, as well as *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Aspergillus flavus* fungi. Nanoliposomes loaded with clove essential oil showed high colloidal stability, with a zeta potential of -58.5 and no sedimentation was observed even after 6 months. TEM imaging showed that the nanoparticles had a hemispherical and homogeneous shape with a size range of 100-200 nm. Nanoliposomes showed high biocompatibility, with 73.8% and 81.3% of human fibroblast cells remaining viable after incubation with 200 µg/mL of the initial and clove essential oil-loaded nanoliposomes, respectively. Although nanoliposomes loaded with clove essential oil showed limited antibacterial effect against *S. aureus* and *E. coli* strains, they showed a potent antifungal effect on *A. niger*, *A. terreus* and *A. flavus*, with complete growth inhibition of fungal mycelia at concentrations of 2, 2, and 1 mg/mL, respectively. Based on the results, clove essential oil-loaded nanoliposomes can be a suitable antifungal agent for food and pharmaceutical applications.

Keywords: Nanoliposomes, Clove essential oil, Antibacterial, Antifungal.

¹ Corresponding Author

[3060-7647/](https://doi.org/10.22108/bjm.2026.148096.1665) © 2026 The Authors



Introduction

Infectious diseases continue to pose a major challenge to global health, ranking as the second leading cause of mortality worldwide. The widespread use of antibiotics has contributed to a crisis of multidrug resistance among bacterial pathogens, prompting the World Health Organization (WHO) to designate antimicrobial resistance as one of humanity's most pressing health threats. Rising concerns about multidrug resistance have spurred research efforts toward innovative therapeutic modalities, particularly those leveraging bioactive compounds derived from natural sources. Plant-derived essential oils, rich in antimicrobial constituents, have emerged as promising alternatives to conventional antibiotics, exerting their effects through mechanisms such as disrupting cellular membranes, inhibiting protein synthesis, and interfering with DNA replication.

Among these, clove essential oil (CEO) has considered attention, due to its rich composition of bioactive phenolics (e.g., eugenol and eugenol acetate), terpenes (e.g., beta-caryophyllene and alpha-humulene), and hydrocarbons. The valuable properties of CEO, including antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, and insecticidal activities, make it versatile for various applications such as cosmetics, food preservation, and pharmaceuticals. However, CEO's inherent volatility and susceptibility to degradation under environmental stressors such as light and heat, compromise its efficacy and longevity. Encapsulation technologies address these limitations by enhancing stability, bioavailability, and controlled release, thereby increasing the practical utility of essential oils across various sectors.

The unique physicochemical properties of nanomaterials enable novel strategies for breaching microbial barriers, including bacterial cell walls, efflux pumps, and biofilms. Among different nanoparticles, nanoliposomes have garnered significant attention as carriers for bioactive agents. These vesicular structures, composed of phospholipids derived from biocompatible sources such as lecithin, can encapsulate both hydrophilic and hydrophobic compounds, protecting them from oxidative degradation. Their biocompatibility, biodegradability, and non-immunogenicity make them ideal for food and medical applications. Among various methods for synthesizing nanoliposomes, ethanol injection is favored due its simplicity, cost-effectiveness, and scalability.

In this study, nanoliposomes were synthesized by ethanol injection and loaded with CEO. The resulting nanoliposomes were then characterized for their physicochemical properties using advanced techniques such as transmission electron microscopy (TEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), dynamic light scattering (DLS), and Zetasizer analysis. Subsequently, the antimicrobial efficacy of these CEO-loaded nanoliposomes was evaluated against bacterial strains (*E. coli* and *S. aureus*) and fungal species (*A. niger*, *A. terreus*, and *A. flavus*). Cytotoxicity assessments on human fibroblast cells highlighted their biocompatibility, suggesting their potential as antifungal agents for the food and pharmaceutical industries.

Materials & Methods

Ethanol (99%), dimethyl sulfoxide (99.9%), and L-alpha lecithin (97%) were purchased from Merck (Germany). The bacterial and fungal culture media were purchased from Condalab (Spain). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Sigma (Germany). RPMI-1640 medium, trypsin, fetal bovine serum, and penicillin-streptomycin solution were purchased from Gibco. Cefixime antibiotic powder was donated by Farabi Pharmaceutical Company.

Clove essential oil was extracted from dried clove bud powder via hydrodistillation. Briefly, 10 g of bud powder were ultrasonicated with 100 mL of distilled water for 30 min, then subjected to distillation in a Clevenger apparatus at 150 °C for 4 h.

For synthesis of nanoliposomes and CEO loading, a solution of 400 mg lecithin in 4 mL ethanol was ultrasonicated for 5 min and stirred at 200 rpm for 3 h. Subsequently, 400 mg of CEO was added and stirred for 15 min. This mixture was then injected into 20 mL of distilled water under stirring, continuing for 2 h to form liposomes. Ethanol was evaporated using a rotary evaporator at 150 °C for 2 h, resulting in a final sample with a concentration of 20 mg/mL and an organic-to-aqueous phase ratio of 1:5.

The morphology and size of nanoliposomes were assessed by depositing a diluted sample on a carbon-coated grid, drying, and imaging with a Philips EM208S TEM (Netherlands). Hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI), and Zeta potential of the nanoliposomes were measured using a Malvern Nano ZSP zeta sizer (UK). Surface functional groups were characterized by FTIR spectroscopy (Jasco FT/IR-6300, Japan) using KBr-pelletized samples in the 400–4000 cm⁻¹ range.

Cytotoxicity of the samples was evaluated using the MTT assay on human fibroblast cells. Cells (10,000 per well) were seeded in 96-well plates with 200 μ L RPMI-1640 medium and incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 24 h. Nanoliposomes (both pre- and post-loading) at concentrations of 0, 10, 50, 100, and 200 μ g/mL were added and incubated for 48 h. The medium was then replaced with 100 μ L of fresh medium containing 0.5 mg/mL MTT, followed by incubation for 4 h. The resulting formazan crystals were dissolved in 100 μ L DMSO. Absorbance was measured at 570 nm, and cell viability was calculated relative to untreated controls.

Antibacterial activity of samples was evaluated against *E. coli* (ATCC 25922) and *S. aureus* (ATCC 25923) using the agar well diffusion method in triplicate. Bacterial colonies were inoculated in 15 mL Luria-Bertani broth, incubated at 37 °C with shaking at 150 rpm for 24 h, and then diluted to an OD₆₃₀ of 0.08–0.13. One mL of this suspension was spread on Mueller-Hinton agar plates. Subsequently, 100 μ L of cefixime (1000 μ g/mL) or CEO-loaded nanoliposomes (2400, 3000, 3600 μ g/mL) were added into the individual wells (6 mm diameter). After 18 h incubation at 37 °C, the diameters of the inhibition zones were measured.

Antifungal activity was evaluated against *A. niger* (ATCC 1015), *A. terreus* (ATCC 20541), and *A. flavus* (ATCC 200026) by the contact toxicity method on potato dextrose agar (PDA). CEO-loaded nanoliposomes (0.5, 1, 2 mg/mL) were incorporated into molten PDA, poured into plates, and a 1×1 cm fungal colony plug was placed in the center of each plate. Then, plates were incubated at 35 °C for 5–7 days, mycelial growth was measured orthogonally, and inhibition percentage was calculated as: [(control growth - treated growth)/control growth] × 100.

The statistical analyses involved triplicate experiments, with data expressed as mean $\pm$ standard deviation. One-way ANOVA assessed significance at a 99% confidence interval.

Discussion of Results & Conclusions

Stable colloidal CEO-loaded nanoliposomes were prepared with 20 mg/mL lecithin and active ingredient at an organic-to-aqueous ratio of 1:5. These formulations were stable for 6 months at room temperature without sedimentation, underscoring the efficacy of the ethanol injection method for large scale production. TEM imaging revealed semi-spherical and uniform nanoparticles in the size range of 100–200 nm, ideal for enhanced permeability and microbial interaction. FTIR spectra confirmed surface functional groups (hydroxyl, carbonyl, carboxyl) contributing to negative charge, corroborated by a zeta potential of -58.5 mV, which imparts colloidal stability via electrostatic repulsion. DLS indicated a hydrodynamic diameter of 125 nm and PDI of 0.2, signifying monodispersity and suitability for biomedical applications.

Cytotoxicity assays confirmed high biocompatibility, with unloaded nanoliposomes maintaining 73.8% fibroblast viability at 200 μ g/mL, which increased to 81.3% post-CEO loading, suggesting CEO's protective or synergistic effects.

Antibacterial evaluations showed dose-dependent effects. A significant inhibition ($p < 0.01$) against *S. aureus* was observed only at 3600 μ g/mL, with an 8.3 ± 0.6 mm zone of inhibition— comparable to cefixime's 9.1 ± 1.3 mm at 1000 μ g/mL. No activity was observed against *E. coli*, potentially due to the outer membrane barrier of Gram-negative bacteria or insufficient CEO release kinetics. This finding contrasts with previous reports of enhanced antibacterial potency of encapsulated essential oils, such as thyme, against *E. coli*, indicating a need for surface modifications or adjuvants to improve bacterial targeting.

Interestingly, CEO-loaded nanoliposomes showed dose-dependent inhibition of mycelial growth, *A. flavus* achieved 100% inhibition at 1 mg/mL, while *A. niger* and *A. terreus* required 2 mg/mL for complete suppression. At lower doses, inhibitions ranged 59.4–85%, highlighting species-specific sensitivities, with *A. flavus* most vulnerable.

In conclusion, CEO-loaded nanoliposomes, synthesized via a facile method, exhibit robust antifungal activity against *Aspergillus* spp., minimal cytotoxicity, and prolonged stability, positioning them as eco-friendly alternatives for combating fungal infections in food and pharma sectors. This underscores nanotechnology's role in revitalizing natural antimicrobials amid resistance crises, advocating for further translational research.

سنتز و مشخصه‌یابی نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک و بررسی اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی آنها

آرمینا آریمنش

گروه زیست‌فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
a.aryanmanesh@sci.ui.ac.ir

ابوالقاسم عباسی کجانی

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 آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌ویژه ترکیبات با منشأ زیستی بسیار شایان توجه است؛ بنابراین در این پژوهش، سنتز نانولیپوزوم‌ها و بارگذاری اسانس میخک درون آنها و استفاده به‌عنوان یک عامل ضدباکتری و ضدقارچ به‌ترتیب روی محیط‌های کشت مولر هنتون آگار و PDA بررسی شد. بدین منظور، لیپوزوم‌ها با استفاده از لستیتین به‌عنوان 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. نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک، پایداری کلونیدی بالایی با پتانسیل زتای ۵۸/۵- نشان دادند؛ چنان‌که پس از ۶ ماه رسوبی دیده نشد. تصویربرداری TEM نشان داد نانوذرات، شکلی نیمه‌کروی و همگون با اندازه بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر دارند. نانولیپوزوم‌ها زیست‌سازگاری بالایی نشان دادند؛ چنان‌که ۷۳/۸ و ۸۱/۳ درصد از سلول‌های فیروپلاست انسانی پس از گرماگذاری با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از به‌ترتیب نانولیپوزوم‌های اولیه و بارگذاری شده با اسانس میخک همچنان زنده ماندند. نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک، اثر ضدباکتریایی محدودی روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* نشان دادند؛ اما اثر ضدقارچ برجسته‌ای روی *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس ترئوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* داشتند؛ چنان‌که به‌ترتیب در غلظت‌های ۲، ۱ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (وزنی حجمی) لیپوزوم‌ها سبب مهار کامل رشد میسلیم قارچ‌ها شدند. بر پایه نتایج، نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک می‌توانند یک عامل ضدقارچ مناسب برای کاربردهای غذایی و دارویی باشند.

واژه‌های کلیدی: نانولیپوزوم، اسانس میخک، ضدباکتری، ضدقارچ

* نویسنده مسئول مکاتبات

آریمنش، آرمینا، عباسی کجانی، ابوالقاسم. سنتز و مشخصه‌یابی نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک و بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی آنها: زیست

شناسی میکروبی، ۱۴۰۵؛ ۱۵(۵۷): ۵۹-۷۲. doi: 10.22108/bjm.2026.148096.1665



مقدمه

بیماری‌های عفونی، از جمله مشکلات مهم سلامت در قرن حاضر هستند؛ چنان‌که پس از بیماری‌های قلبی عروقی، دومین عامل مرگ‌ومیر در جهان به شمار می‌روند (۱). استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های عفونی، به گسترش مقاومت چنددارویی باکتری‌ها منجر شده است؛ به‌طوری‌که سازمان بهداشت جهانی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک را به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های سلامت بشر معرفی کرده است. بنابراین، نیاز به روش‌های درمانی جدید برای این بیماری‌ها بسیار درخور توجه و پژوهش قرار گرفته است (۲).

ترکیبات گیاهی از طریق سازوکارهایی 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 سازوکارهای گوناگونی همچون اختلال در غشای سلولی، مهار سنتز پروتئین و تداخل با تکثیر DNA، اثرات ضد میکروبی نشان می‌دهند و به‌عنوان جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها شایان توجه قرار گرفته‌اند (۴). اسانس میخک، به دلیل داشتن ترکیبات زیست‌فعال گوناگون همچون فنول‌ها (اوژنول و اوژنول استات)، ترپن‌ها (بتا-کاریوفیلین 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 تجزیه‌پذیر است که بر کیفیت و زیست‌فعالی آن اثر می‌گذارد. کپسوله کردن به‌عنوان یک راهبرد امیدوارکننده برای حل این چالش در

نظر گرفته می‌شود که می‌تواند ماندگاری اسانس را افزایش دهد و پایداری فیزیکوشیمیایی و کاربرد آن را در زمینه‌های مختلف بهبود بخشد (۶، ۷). از اسانس‌های کپسوله‌شده به‌طور معمول در سامانه‌های غذایی برای افزایش پایداری، پوشاندن طعم‌های نامطلوب و آزادسازی کنترل‌شده استفاده می‌شود (۸). نانومواد، با توجه به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی منحصر به فردشان، روش‌های جدید و کارآمدی را برای عبور از غشاها و دیواره‌های باکتریایی، پمپ‌های خروج و تشکیل بیوفیلم فراهم می‌کنند. در این زمینه، به دسته‌های گوناگونی از نانومواد همچون نانوذرات فلزی، لیپوزوم‌ها و نانوذرات پلیمری توجه ویژه‌ای شده است (۹). نانوسامانه‌های دارورسانی، به دلیل پتانسیل آنها در بهبود فراهمی زیستی دارو و کارایی هدف‌گیری بررسی شده‌اند (۲).

در میان نانوسامانه‌های گوناگون، لیپوزوم‌ها به‌عنوان یک حامل امیدوارکننده برای ترکیبات زیست‌فعال 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 کنترل‌شده 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 است، روش تزریق اتانول به دلیل مزیت‌های متعددی از جمله سادگی، پیاده‌سازی سریع و تکرارپذیری بسیار شایان 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.

مواد و روش‌ها

مواد

اتانول (۹۹ درصد)، دی‌متیل سولفوکسید (۹۹/۹ درصد) و ال-آلفا لستین (۹۷ درصد) از شرکت مرک (آلمان)

مشخصه‌یابی لیپوزوم‌ها

برای بررسی شکل و اندازه نانوذرات، یک قطره از نمونه کلونیدی 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 کلونیدی، از دستگاه زتا سائزر مدل Nano ZSP ساخت شرکت Malvern انگلستان استفاده شد. برای شناسایی گروه‌های عاملی سطح نانوذرات، نمونه‌ها به‌صورت قرص فشرده در ترکیب با پتاسیم بروماید درآمدند و با دستگاه طیف‌سنج FTIR مدل FT/IR-6300 ساخت شرکت جاسکوی ژاپن در محدوده عدد موجی ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر بررسی شدند.

بررسی سمیت لیپوزوم‌های بارگذاری‌شده با

اسانس میخک

میزان سمیت سلولی لیپوزوم‌ها پیش و پس از بارگذاری با اسانس میخک 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 سانتی‌گراد در فشار ۵ درصد دی‌اکسید کربن در انکوباتور مرطوب، غلظت‌های گوناگون نانوذرات (شامل ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌طور 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک، افزوده و دوباره برای ۴ ساعت در شرایط مشابه گرماگذاری شد. سپس محیط کشت چاهک‌ها جدا شد و بلورهای فورمازان باقی‌مانده در کف چاهک‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید، حل و جذب هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نسبت سلول‌های

خریداری شد. محیط‌های کشت باکتریایی و قارچی از شرکت کندالب (اسپانیا) خریداری شد. ۳- (۴،۵-دی‌متیل تیازول-۲-ایل)-۲-دی‌فنیل ترازولیوم 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 گییکو از فروشگاه‌های داخل کشور خریداری شد. پودر آنتی‌بیوتیک سفکسیم اهدایی از طرف شرکت داروسازی فارابی بود.

اسانس گیری 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 سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انجام شد (۱۲).

سنتز لیپوزوم‌ها و بارگذاری اسانس میخک

۴۰۰ میلی‌گرم لسیتین 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 سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفت تا اتانول به‌طور کامل تبخیر و حذف شود. بدین ترتیب، غلظت لسیتین و ماده مؤثره، ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نسبت فاز آلی به آبی ۱ به ۵ به دست آمد (۱۳).

بررسی ویژگی‌های ضدقارچی لیپوزوم‌های

بارگذاری شده با اسانس میخک

ویژگی‌های ضدقارچی نمونه‌ها روی سه گونه قارچ *آسپرژیلوس نایجر* (ATC 1015)، *آسپرژیلوس ترئوس* (ATCC 20541) و *آسپرژیلوس فلاووس* (ATCC 20026) با 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 سانتی‌گراد به مدت ۵ تا ۷ روز (با توجه به گونه قارچی) گرماگذاری شدند تا اسپوره‌های قارچی پدیدار شوند. برای انجام آزمون سمیت تماسی، غلظت‌های گوناگونی (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک به محیط کشت PDA، افزوده و به‌خوبی ترکیب و استریل شد و پیش از جامدشدن، در پلیت‌ها توزیع شد. پلیت حاوی محیط کشت بدون نانوذرات نیز به‌عنوان گروه کنترل تهیه شد. سپس یک برش با اندازه ۱×۱ سانتی‌متر از پلیت حاوی کلنی فعال قارچی با استفاده از لوپ، جدا و در مرکز هر پلیت جای‌گذاری شد. پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد 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:

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

نتایج

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 فیزیکوشیمیایی مطلوب، یکی از پیش‌نیازهای اصلی برای

زنده، از تقسیم‌کردن میزان جذب سلول‌های تیمار شده بر میزان جذب سلول‌های کنترل (بدون تیمار) محاسبه شد.

بررسی ویژگی‌های ضدباکتریایی لیپوزوم‌های

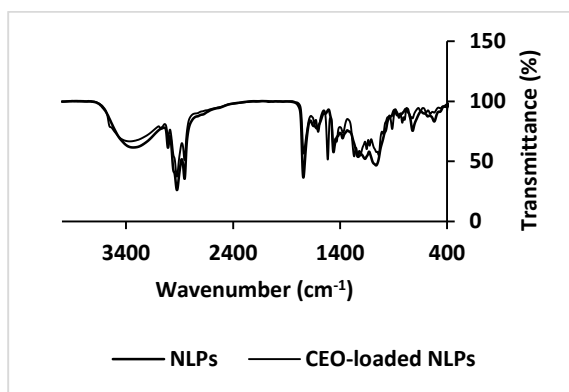
بارگذاری شده با اسانس میخک

ویژگی‌های ضدباکتریایی نانوذرات روی دو سویه باکتری *اشریشیا 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 میلی‌لیتر محیط کشت مایع لوریا برتانی در ارلن در شرایط استریل، تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت درون شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 میلی‌لیتر از کشت رقیق‌شده به محیط کشت جامد مولر هینتون آگار، افزوده و به‌طور کامل پخش شد. در پایان، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر روی هر پلیت ایجاد شد و در هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بیوتیک سفکسیم (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و غلظت‌های گوناگون نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک (۲۴۰۰، ۳۰۰۰ و ۳۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌صورت جداگانه، افزوده و پس از ۱۸ ساعت گرماگذاری در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله‌ها اندازه‌گیری شد (۱۴).

مطالعات آماری

آزمایشات در سه تکرار، انجام و نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) سه تکرار مستقل بیان شد. از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) برای بررسی آماری نتایج، استفاده و فاصله اطمینان ۹۹ درصد برای معنی‌داربودن اختلافات در نظر گرفته شد.

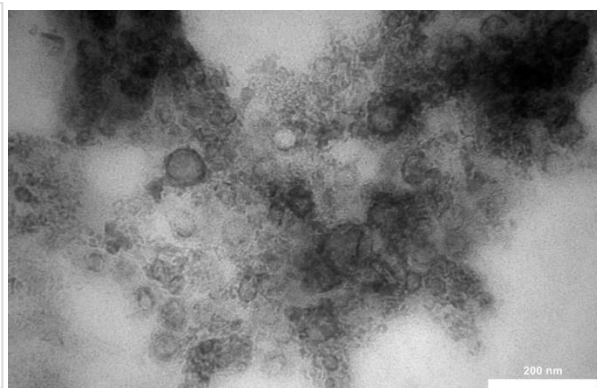
نانومتر دارند (شکل ۱). بررسی و مقایسه شیمی سطح لیپوزوم‌ها پیش و پس از بارگذاری با اسانس با روش طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، وجود تفاوت بارز بین آنها و وجود گروه‌های عاملی گوناگون از جمله هیدروکسیل، کربونیل و کربوکسیل را نشان داد که عامل اصلی بار سطحی لیپوزوم‌ها هستند (شکل ۱). بر پایه آزمون DLS، متوسط 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 کلئیدی بالای آنها را نشان می‌دهد و با نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه تطابق دارد.



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانولیپوزوم‌های بارگذاری‌شده با اسانس میخک (راست) و طیف مادون قرمز تبدیل فوریه نانولیپوزوم‌ها 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).

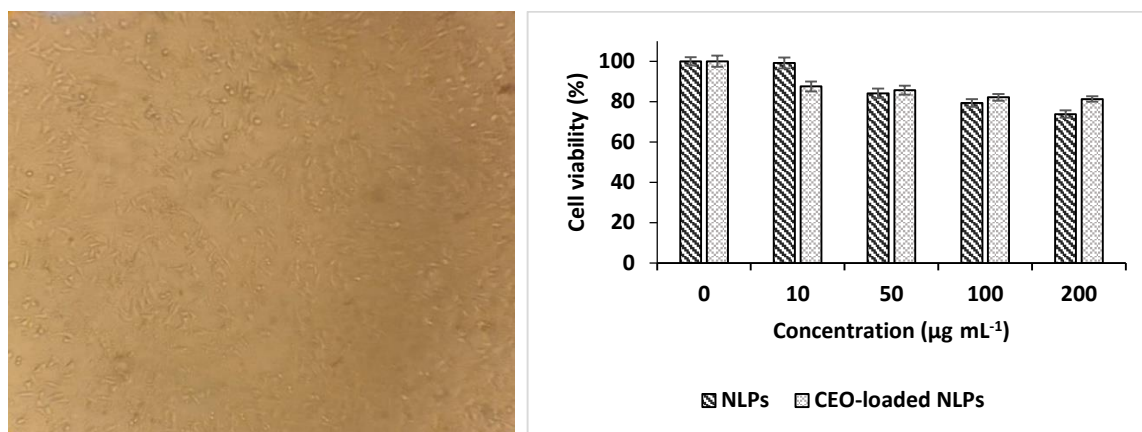
تمام کاربردهای زیست‌پزشکی است؛ بنابراین، در گام اول تلاش شد با تغییر غلظت اسانس در مخلوط واکنش سنتز، شرایط بهینه برای ساخت لیپوزوم‌های کلئیدی پایدار با بیشینه ظرفیت بارگذاری اسانس به دست آید. در نهایت، غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر لسیتین و ماده مؤثره و نسبت فاز آلی به آبی ۱ به ۵ به عنوان ترکیب بهینه واکنش به دست آمد. در این شرایط، لیپوزوم‌های کلئیدی تا ۶ ماه پایداری خود را در دمای اتاق کاملاً حفظ کردند و هیچ گونه رسوبی دیده نشد. تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری از لیپوزوم‌های بارگذاری‌شده با اسانس میخک نشان داد اغلب نانوذرات، نیمه کروی بودند و اندازه‌ای بین ۱۰۰ تا ۲۰۰



بارگذاری اسانس میخک، سمیت سلولی لیپوزوم‌ها در غلظت‌های بالا حتی کاهش یافت؛ به طوری که در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، ۸۱/۳ درصد از سلول‌ها همچنان زنده ماندند. بررسی مورفولوژی سلول‌ها پس از تیمار نیز نتایج آزمون MTT را تأیید کرد؛ به طوری که تفاوت چشمگیری در مورفولوژی سلول‌های فیروبلاستی پس از تیمار با لیپوزوم‌های بارگذاری‌شده با اسانس میخک دیده نشد (شکل ۲). این نتایج بر زیست‌سازگاری بالای لیپوزوم‌ها پیش و پس از بارگذاری با اسانس میخک اشاره دارد.

بررسی سمیت لیپوزوم‌های بارگذاری‌شده با اسانس میخک

بررسی سمیت سلولی لیپوزوم‌ها پیش و پس از بارگذاری با اسانس میخک روی رده سلولی فیروبلاست انسان نشان داد که لیپوزوم‌های ابتدایی، بسیار زیست‌سازگار هستند؛ به طوری که پس از ۴۸ ساعت تماس با بیشترین غلظت نانوذرات (۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، ۷۳/۸ درصد از سلول‌ها همچنان زنده ماندند و در کمترین غلظت نانوذرات (۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، بیش از ۹۹ درصد از سلول‌ها همچنان زنده بودند (شکل ۲). جالب توجه اینکه پس از



شکل ۲- مورفولوژی سلول‌های فیروپلاستی (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.

جدول ۲- درصد بازدارندگی رشد میسلیم قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس ترئوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* پس از تیمار با غلظت‌های گوناگون (میلی گرم بر میلی لیتر) 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

بررسی ویژگی‌های ضدقارچی لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک

نتایج آزمون ضد قارچ نشان دادند لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک، به‌طور مؤثری از رشد میسلیم قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس ترئوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* جلوگیری می‌کنند. در میان سه گونه بررسی شده، بیشترین اثر ضدقارچی روی گونه *آ. فلاووس* دیده شد؛ به‌طوری‌که در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر لیپوزوم‌ها، رشد قارچ به‌طور کامل باز داشته شد. در دو گونه دیگر، نیاز به غلظت بیشتری از لیپوزوم‌ها بود و در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک، رشد قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس ترئوس* به‌طور کامل مهار شد.

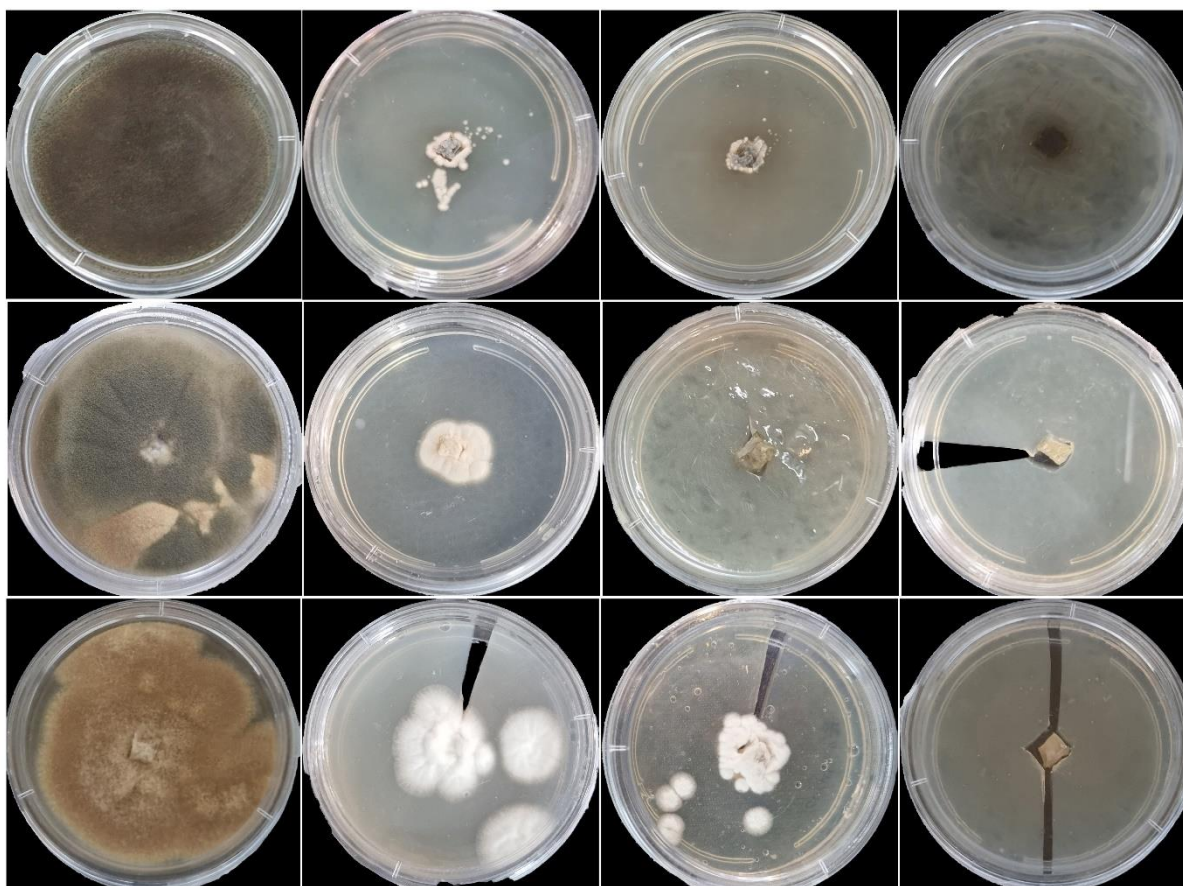
بررسی ویژگی‌های ضدباکتریایی لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک

بررسی هاله عدم رشد باکتری‌ها پس از تیمار با غلظت‌های گوناگون لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک نشان داد نانوذرات، فعالیت ضدباکتریایی وابسته به دوز دارند و تنها در غلظت ۳۶۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر فعالیت ضدباکتریایی معنی‌داری ($p < 0.01$) با قطر هاله $8/3 \pm 0/6$ میلی متر روی باکتری *اس. اورئوس* نشان داد. در همین شرایط، در هیچ یک از غلظت‌ها، فعالیت ضدباکتریایی روی باکتری *ای. کلی* دیده نشد.

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

Table 1. The inhibition zone diameter (mm) for cefixime antibiotic (right column) and different concentrations (µg 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 ± 0.6**	0	0	9.1 ± 1.3
<i>E. coli</i>	0	0	0	7.3 ± 0.9



شکل ۳- نتایج آزمون سمیت تماسی غلظت‌های گوناگون (از راست به چپ ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر نانولیپوزوم‌های بارگذاری‌شده با اسانس میخک روی قارچ‌های *A. niger* (بالا)، *A. flavus* (وسط)، و *A. terreus* (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).

بحث و نتیجه‌گیری

اسانس‌ها که بیشتر از مونوترپن‌ها و فیل‌پروپن‌ها تشکیل شده‌اند، توسط 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 هردو ترکیبات آب‌دوست و آب‌گریز، زیست‌سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و عدم ایمنی‌زایی، برای جابه‌جایی ترکیبات زیست‌فعال اسانس‌ها مناسب هستند (۱۷). لستین، یک ترکیب غذایی طبیعی از فسفاتیدهای کولین، اتانول‌آمین و اینوزیتول است که به‌طور کلی ایمن (GRAS) شناخته می‌شود. لستین، یکی از اجزای مهم بافت

عصبی و فسفولیپید غالب در غشای بیشتر پستانداران است که به‌صورت تجاری از دانه‌های روغنی گیاهی همچون سویا، کلزا و تخمه آفتابگردان و منابع حیوانی همچون زرده تخم‌مرغ، شیر و بافت مغز به دست می‌آید (۱۳). قیمت پایین لستین نیز یک مزیت بزرگ برای کاربرد گسترده آن در صنایع غذایی است؛ چنان‌که لستین سویا با خلوص متوسط را برای ساخت نانولیپوزوم‌های خوراکی مناسب دانسته‌اند (۱۱). 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 (۱۸)؛ بنابراین، ساخت لیپوزوم‌های بر پایه لستین با روش تزریق اتانل برای

برهم‌کنش‌ها را گزارش کرده است. مطالعات مولکولی و بیوشیمیایی بیشتر می‌تواند به یافتن روش‌های کارآمدتر برای مقابله با عفونت‌های قارچی منجر شود.

Sebaaly et al. (2015) 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 لیپوزوم‌های چندلایه‌ای و کروی شکل نانومتری را نشان داد که از تخریب اوژنول در معرض پرتوی ماوراء بنفش جلوگیری کرده و از فعالیت آنتی‌اکسیدانی اوژنول محافظت کرده‌اند (۲۵).

Sebaaly et al. (2015) در مطالعه‌ای 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 لیپوزوم‌های همگن، پایدار، با اندازه نانومتری و چندلایه با فسفولیپید بالا، میزان بالای بارگذاری اوژنول و راندمان بالای کپسوله‌کردن اجزای اسانس میخک به دست آمد (۲۶).

همچنین چندین گزارش نیز درباره‌ی سنتز نانوذرات کیتوسان حاوی اسانس میخک، با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی و ضدقارچی وجود دارد (۱۵، ۲۷)؛ 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 می‌شود.

بارگذاری اسانس‌های گیاهی، به نظر می‌تواند روشی مناسب برای کاربرد گسترده در صنایع غذایی و کشاورزی باشد. پژوهش‌های پیشین نیز نشان داده‌اند کپسوله‌کردن اسانس‌های گیاهی به صورت نانولیپوزوم، می‌تواند پایداری و خصوصیات زیستی آنها از جمله سمیت تدخینی علیه شپشه آرد را افزایش دهد و به طور بالقوه در مدیریت آفات استفاده شود (۱۹). افزایش فعالیت ضدباکتریایی اسانس آویشن شیرازی در برابر باکتری /شریشیا کلی پس از کپسوله‌کردن در نانولیپوزوم‌ها نیز گزارش شده و استفاده از ترکیبات طبیعی کپسوله‌شده در نانولیپوزوم‌ها به عنوان عوامل نگهدارنده قوی، نه تنها در صنایع غذایی بلکه در فرآورده‌های پزشکی و آرایشی معرفی شده است (۲۰).

نتایج این پژوهش نیز نشان دادند نانولیپوزوم‌های ساخته شده بر پایه لستین، بسیار سازگار بوده و سمیت ناچیزی روی سلول‌های فیروبلاستی داشته‌اند. 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 به دست آمد. هرچند نانولیپوزوم‌های حاصل، ویژگی‌های ضدباکتریایی مطلوبی نشان ندادند که پژوهش بیشتر برای رفع این محدودیت را ضروری می‌کند. اصلاح سطح نانولیپوزوم‌ها با ترکیبات ضدباکتریایی مناسب می‌تواند در این زمینه مفید باشد.

به هر حال، نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس میخک اثر ضدقارچ برجسته‌ای روی قارچ‌های آسپرژیلوس داشتند که بر پتانسیل بالای آنها در نقش عامل ضدقارچ اشاره دارد. این نتایج با گزارش‌های پیشین درباره‌ی افزایش اثر ضدقارچ اسانس میخک (۲۱) و دیگر اسانس‌های گیاهی کپسوله‌شده در لیپوزوم‌ها (۲۲، ۲۳) همخوانی دارد. یک مطالعه جدید (۲۴) نیز برهم‌کنش‌های زیاد لیپیدها با سلول‌های قارچی و پستانداران و تأثیر درجه اشباع لیپید بر میزان این

References

- [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. *Future 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; 561:161-170. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.022>
- [18] 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>
- [19] 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>
- [20] Khatibi S.A., Misaghi A., Moosavy M., Basti A.A., Koohi 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>
- [21] 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>
- [22] 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>
- [23] 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; 22. <https://B2n.ir/ut7024>
- [24] 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>
- [25] 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>
- [26] 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; 23:126-138. <https://doi.org/10.3109/08982104.2015.1057849>

- [27] 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; 236:116075. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116075>